

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE

PAR
FANNIE ST-GELAIS

EFFET DE LA VIROÏSINE SUR L'ACTINE : UNE ÉTUDE EN
CALORIMÉTRIE DIFFÉRENTIELLE À BALAYAGE,
MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE
ET DICHROÏSME CIRCULAIRE.

JANVIER 2001

205-2

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

RÉSUMÉ

L'actine est une protéine très abondante qui joue deux rôles dans la cellule. Elle est impliquée dans la motilité musculaire et non musculaire. C'est aussi un des composants du cytosquelette, c'est-à-dire l'armature rigide qui donne la forme à la cellule et sert de point d'ancrage aux organites. L'actine existe sous deux formes : la forme monomérique, appelée actine G, et la forme polymérisée en longs filaments, appelée actine F. De nombreuses fonctions cellulaires dépendent de la transformation réversible de l'actine G en actine F.

Il existe des substances capables de bloquer l'actine, soit sous forme G, soit sous forme F. Parmi ces substances, on trouve la viroïsine qui est un peptide cyclique extrait du champignon *Amanita virosa*. Ce peptide a la propriété de maintenir l'actine sous forme polymérisée. La protéine devient alors plus résistante à de nombreux agents chaotropiques. Par contre, aucune action de la viroïsine sur l'actine G n'a été rapportée dans la littérature.

Dans un travail préliminaire, nous avons tout d'abord mis en évidence que la viroïsine se lie aussi à l'actine G. L'objectif de notre travail est de préciser le mécanisme d'action de la viroïsine sur l'actine G.

Les résultats suivants ont été obtenus :

- La calorimétrie différentielle à balayage (DSC) a permis de montrer que la viroïsine modifie de façon importante le thermogramme de l'actine G. En absence de viroïsine, le thermogramme de l'actine G se caractérise par une transition de phase unique dont la température de transition (T_m) est de 64°C et l'enthalpie calorimétrique $\Delta H = 5600$ kJ/mol. En présence de viroïsine, le T_m passe à 78°C, et le ΔH à 29 100 kJ/mol, ce qui montre que la viroïsine se lie aussi à l'actine G et la rend plus stable à la dénaturation thermique. L'affinité de la viroïsine pour l'actine est forte car l'effet de la viroïsine est détectable pour des rapports molaires actine : viroïsine de 1 pour 0,25. L'action de la viroïsine augmente avec sa concentration, mais ne montre pas de saturation, du moins jusqu'à un rapport molaire de 1 pour 6, qui est le plus

grand que nous avons essayé. Ces premiers résultats suggèrent que la viroïsine pourrait induire la polymérisation de l'actine, car le thermogramme de l'actine G en présence de viroïsine a des valeurs de T_m et de ΔH semblables à ceux de l'actine F.

- Cependant, la viscosimétrie montre que la viroïsine n'augmente pas la viscosité d'une solution d'actine G. En conséquence, la viroïsine n'induit pas la polymérisation de l'actine en longs filaments.
- Lorsque l'actine G polymérise en actine F, il se produit un changement de conformation du monomère qui entraîne une modification de l'environnement de la Cys374. Cette modification peut être mise en évidence en fixant à la Cys374 une sonde fluorescente le N-pyrenyl-iodoacétamide. Lors de la polymérisation de l'actine, la fluorescence de cette sonde est alors augmentée de 10 fois. La viroïsine, ajoutée à de l'actine G ne change pas la fluorescence

de la sonde liée à la Cys374. Nous pouvons donc en conclure que la viroïsine n'induit pas la polymérisation de l'actine en actine F.

- L'étude, par dichroïsme circulaire, de l'effet de la température sur les structures secondaires de l'actine G, confirme que l'actine G est plus stable à la chaleur en présence de viroïsine. Par contre, la viroïsine ne change pas la composition en structures secondaires de l'actine G, et par conséquent, n'induit pas la formation d'actine F.
- La microscopie électronique montre que, en présence de viroïsine, les préparations contiennent plusieurs agrégats peu structurés ainsi que quelques rares filaments qui ressemblent à de l'actine F.

De ces résultats, nous pouvons conclure que la viroïsine se lie à l'actine G et rend cette protéine plus stable à la chaleur, sans induire la formation d'actine F.

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier mon directeur de recherche, le Dr. Claude Gicquaud. Le Dr. Gicquaud est passé maître dans l'art de transmettre son vaste savoir à ses étudiants, et cela, de gré ou de force. Il est doué de qualités qui font de lui un excellent superviseur, il est entre autre très dévoué et disponible. Il fut bien agréable et formateur de travailler avec lui au cours des dernières années.

Je tiens également à remercier le Dr. Marc Beauregard pour m'avoir permis d'utiliser son spectropolarimètre et pour m'avoir aidé dans l'analyse des résultats de CD. Merci au Dr. Agnès Lejeune pour son aide avec la microscopie électronique et pour son support moral.

Merci à Isabelle Fournier et à Alain Doucet qui m'ont respectivement aidé avec la calorimétrie et le dichroïsme circulaire.

Je tiens aussi à remercier les gens de mon entourage qui m'ont encouragé et supporté au cours de mes études, en particulier mes parents et ma soeur Laurence qui ont toujours été à mes côtés. Finalement, merci à mon amie Mélanie Davis pour son amitié, sa présence et son soutien quasi quotidien et merci à Alexandre Serrano pour son support.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	i
REMERCIEMENTS	v
TABLE DES MATIÈRES	vi
LISTE DES FIGURES	xi
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	1
1.1. Généralités sur l'actine	1
1.2. Structure de l'actine	2
1.3. Structure du filament	5
1.4. Polymérisation de l'actine	7
<i>1.4.1. Régulation de la polymérisation de l'actine</i>	10
1.5. Formation d'actine paracristalline	13
1.6. Changements de conformation de l'actine	13
1.7. La phalloïdine	16
<i>1.7.1. Effets in vivo de la phalloïdine</i>	22
1.8. La viroïsine : une toxine se liant spécifiquement à l'actine	23
<i>1.8.1. Structure de la viroïsine</i>	23
<i>1.8.2. Effets de la viroïsine sur l'actine</i>	26

1.9. Dénaturation des protéines	28
1.10. Dénaturation thermique de l'actine : revue de la littérature	33
<i>1.10.1. L'actine inactivée : un état partiellement dénaturé atteint lors de la dénaturation thermique</i>	35
1.11. Problématique	36
CHAPITRE 2 : PRINCIPES DES TECHNIQUES	38
2.1. Calorimétrie différentielle à balayage	38
<i>2.1.1. Fonctionnement de l'appareil</i>	38
<i>2.1.2. Interprétation du thermogramme</i>	40
2.2. Dichroïsme circulaire	42
<i>2.2.1. Principes généraux du dichroïsme circulaire</i>	42
<i>2.2.2. Fonctionnement de l'appareil</i>	44
CHAPITRE 3 : MATÉRIEL ET MÉTHODES	47
3.1. Matériel biologique utilisé	47
<i>3.1.1. Purification de l'actine</i>	47
<i>3.1.2. Contrôle de la pureté de l'actine</i>	48
<i>3.1.3. Extraction de la viroïsine</i>	50
3.2. Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)	50
<i>3.2.1. Description de l'appareil</i>	50
<i>3.2.2. Préparation des échantillons pour la DSC et conditions expérimentales</i>	50

3.2.3. <i>Traitement informatique des données</i>	52
3.3. Spectrométrie de dichroïsme circulaire	52
3.3.1. <i>Description du spectropolarimètre</i>	52
3.3.2. <i>Préparation des échantillons pour le CD</i>	52
3.3.3. <i>Logiciels de traitement de données</i>	53
3.4. Mesure de la polymérisation de l'actine par fluorimétrie	55
3.4.1. <i>Préparation de l'actine-pyrène</i>	55
3.4.2. <i>Mesure de la polymérisation de l'actine par fluorimétrie</i>	57
3.5. Viscosimétrie	58
3.5.1. <i>Préparation des échantillons et mesure de la viscosité</i>	58
3.6. Microscopie électronique	59
CHAPITRE 4 : RÉSULTATS	61
4.1. Étude, par Calorimétrie différentielle à balayage (DSC), de l'actine G et de l'actine F en présence et en absence de viroïsine	61
4.1.1. <i>Effet de la concentration de l'actine F sur le thermogramme</i>	62
4.1.2. <i>Effet de l'acide désoxycholique sur le thermogramme de l'actine F</i>	66
4.1.3. <i>Étude par DSC de l'effet de la viroïsine sur l'actine F</i>	69

4.1.4. Effet de la concentration d'actine G sur le thermogramme	73
4.1.5. Comparaison des thermogrammes d'actine G et d'actine F	76
4.1.6. Effet de la viroïsine sur le thermogramme de l'actine G	79
 4.2. Observation, par microscopie électronique, de préparations d'actine en présence et en absence de viroïsine	 86
 4.3. Mise en évidence de la polymérisation de l'actine par viscosimétrie	 91
 4.4. Mise en évidence de la polymérisation de l'actine par fluorescence	 92
 4.5. Étude par dichroïsme circulaire, de l'effet de la viroïsine sur la structure secondaire de l'actine	 95
4.5.1. Étude par CD de l'effet de la viroïsine sur le contenu en structures secondaires de l'actine F	95
4.5.2. Étude par CD de l'effet de la viroïsine sur le contenu en structures secondaires de l'actine G	98
4.5.3. Étude par CD de l'effet de la température sur l'actine F en absence de viroïsine	100
4.5.4. Étude par CD de l'effet de la température sur l'actine F en présence de viroïsine	101
4.5.5. Étude par CD de l'effet de la température sur l'actine G en absence de viroïsine	105

4.5.6. Étude par CD de l'effet de la température sur l'actine G en présence de viroïsine	106
CHAPITRE 5 : DISCUSSION	111
5.1. Critique des techniques d'analyse	111
5.1.1. Calorimétrie différentielle à balayage	111
5.1.2. Dichroïsme circulaire	112
5.1.2.1. Détermination de la structure secondaire à partir des spectres CD	112
5.1.2.2. Comparaison des résultats obtenus en DSC et en CD	114
5.2. Discussion des hypothèses expliquant la stabilisation thermique de l'actine G par la viroïsine	117
5.3. Effet de la viroïsine sur l'actine F	121
5.4. Comparaison entre le contenu en structures secondaires de l'actine G et de l'actine F	122
5.5. Phénomène de précipitation de l'actine G et de l'actine F dénaturées	123
5.6. Comparaison de l'effet de la viroïsine et de la phalloïdine sur l'actine	124
CHAPITRE 6 : CONCLUSIONS	125
RÉFÉRENCES	127

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1. Schéma montrant la structure du monomère d'actine.	3
Figure 2. Schéma d'un filament d'actine montrant sa structure en double hélice.	6
Figure 3. Schéma d'un filament d'actine décoré par le fragment S1 de la myosine.	7
Figure 4. Schéma illustrant le processus de polymérisation de l'actine.	7
Figure 5. Schéma de la phalloïdine et de la viroïsine.	24
Figure 6. Schéma du calorimètre différentiel à balayage.	39
Figure 7. Schéma d'un thermogramme typique.	41
Figure 8. Spectres de dichroïsme circulaire de structures secondaires pures de protéines.	44
Figure 9. Schéma illustrant le fonctionnement du spectropolarimètre.	45
Figure 10. Gel d'électrophorèse SDS-Page de l'actine.	49

Figure 11.	Effet de la concentration d'actine F sur le thermogramme.	62
Figure 12.	T _m des réactions endothermiques et exothermiques en fonction de la concentration d'actine F .	65
Figure 13.	Thermogrammes de l'actine F en présence et en absence de désoxycholate.	67
Figure 14.	T _m de la réaction de dénaturation et de la réaction de précipitation en fonction de la concentration d'actine F, en présence et en absence de désoxycholate	68
Figure 15.	Thermogrammes de l'actine F en présence d'un rapport molaire actine : viroïsine croissant.	70
Figure 16.	Température de demi-transition (T _m) et enthalpie de l'actine F en fonction de la concentration en viroïsine.	73
Figure 17.	Effet de la concentration d'actine G sur le thermogramme.	74
Figure 18.	Comparaison des thermogrammes d'actine G et d'actine F.	77
Figure 19.	Thermogrammes de l'actine G en présence d'un rapport molaire actine : viroïsine croissant.	79

Figure 20.	Température de demi-transition (T_m) et enthalpie de l'actine G en fonction du rapport molaire actine : viroïsine.	81
Figure 21.	Première hypothèse expliquant le mécanisme d'action de la viroïsine sur l'actine G; la viroïsine déplacerait l'équilibre vers la formation d'actine F.	83
Figure 22.	Deuxième hypothèse expliquant le mécanisme d'action de la viroïsine sur l'actine G; la viroïsine entraîne un changement de conformation de l'actine sans qu'il y ait polymérisation.	84
Figure 23.	Préparation d'actine G en absence de viroïsine.	87
Figure 24.	Préparation d'actine F en absence de viroïsine.	87
Figure 25.	Préparation d'actine G en présence d'une quantité équimolaire de viroïsine.	89
Figure 26.	Viscosité spécifique de l'actine G et de l'actine F en absence et en présence d'une quantité équimolaire de viroïsine.	92
Figure 27.	Graphique de l'intensité de fluorescence de l'actine G-pyrène, de l'actine G-pyrène en présence de viroïsine et de l'actine F-pyrène.	93

Figure 28.	Comparaison des spectres CD de l'actine F en absence et en présence d'une quantité équimolaire de viroïsine.	96
Figure 29.	Contenu en structures secondaires de l'actine G et F en absence et en présence d'une concentration équimolaire de viroïsine.	97
Figure 30.	Comparaison des spectres CD de l'actine G en absence et en présence d'une quantité équimolaire viroïsine.	98
Figure 31.	Effet de la température sur le spectre CD de l'actine F en absence de viroïsine.	100
Figure 32.	Effet de la température sur le spectre CD de l'actine F en présence d'une quantité équimolaire de viroïsine.	101
Figure 33.	Variation du contenu en hélices- α et en feuillets- β de l'actine F, en présence et en absence d'une quantité équimolaire de viroïsine, en fonction de la température.	102
Figure 34.	Différence de coefficient d'extinction de l'actine F à 222nm, en absence et en présence d'une quantité équimolaire de viroïsine, en fonction de la température.	104

Figure 35.	Effet de la température sur le spectre CD de l'actine G en absence de viroïsine.	106
Figure 36.	Effet de la température sur le spectre CD de l'actine G en présence d'une quantité équimolaire de viroïsine.	107
Figure 37.	Variation du contenu en hélices- α et en feuillets- β de l'actine G, en présence et en absence d'une quantité équimolaire de viroïsine, en fonction de la température.	108
Figure 38.	Différence du coefficient d'extinction de l'actine G à 222 nm, en absence et en présence d'une quantité équimolaire de viroïsine, en fonction de la température.	109

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1.1. Généralités sur l'actine

Straub identifia l'actine en 1942 et en 1948, elle fut isolée des cellules musculaires par Freuer *et al.*. On a admis pendant longtemps que l'actine n'était impliquée que dans le processus de contraction musculaire. On sait aujourd'hui qu'il s'agit d'une protéine très abondante qui compose de 5 à 10 % du contenu protéique de toutes les cellules eucaryotes. Elle remplit de nombreuses fonctions au niveau de la motilité et contribue aussi à la structure des cellules.

L'actine joue un rôle essentiel dans les processus de motilité musculaire et non-musculaire. Dans les fibres musculaires, où elle constitue près de 20% de la masse protéique, l'actine, en interagissant avec la myosine, permet la contraction du muscle. Dans d'autres cellules, l'actine est nécessaire à la motilité non-musculaire: elle gouverne certains phénomènes comme le déplacement d'organites, la cytokinèse, le mouvement amiboïde, la phagocytose, etc...

L'actine remplit également des fonctions statiques en participant à l'élaboration du cytosquelette. Un abondant réseau de filaments d'actine se trouve sous la membrane plasmique. Ces filaments permettent le soutien de la

membrane et contribuent au maintien de la forme de la cellule. Comme le cytosquelette est une structure dynamique, les filaments d'actine assurent une certaine plasticité à la cellule.

1.2. Structure de l'actine

L'actine peut exister sous trois formes: l'actine monomérique appelée actine G ; l'actine filamenteuse, appelée actine F et l'actine paracristalline. Les filaments d'actine résultent de la polymérisation de l'actine monomérique. Les paracristaux quant à eux sont formés par la juxtaposition de filaments parallèles disposés en phase.

Le monomère d'actine, schématisé à la figure 1, est composé de 375 acides aminés (Korn 1982). Son poids moléculaire est d'environ 42,5 kDa. La diffraction des rayons-X a été utilisée pour identifier la structure du monomère d'actine. Puisque les conditions qui pourraient permettre la cristallisation de l'actine G induisent également sa polymérisation en actine F, il s'est avéré impossible d'obtenir des cristaux constitués seulement d'actine G pour analyse par diffraction des rayons-X. Pour palier à cette difficulté, l'actine G a été co-cristallisée avec des protéines qui inhibent sa polymérisation. On a ainsi déterminé la structure de l'actine G complexée à la DNase I (Kabsch *et al.*

1990), au segment 1 de la gelsoline (McLaughlin *et al.* 1993) ou à la profiline (Schutt *et al.* 1993).

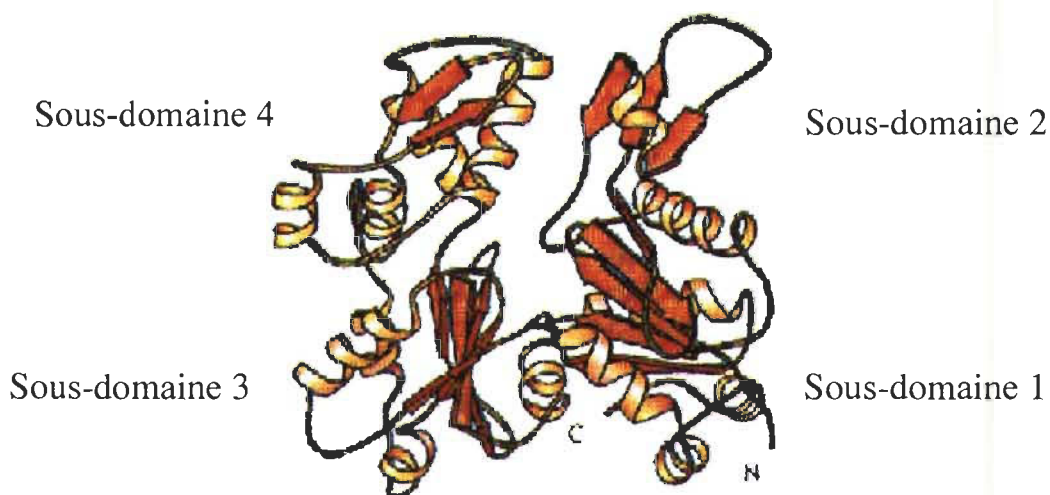


Figure 1. Schéma montrant la structure du monomère d'actine obtenue par Mannherz en 1992 par diffraction des rayons X (Tiré de Cooper, 1999).

La comparaison de la structure de ces différents co-cristaux a permis de déterminer la structure générale du monomère d'actine. Il existe quelques différences dans cette structure selon la protéine avec laquelle l'actine G est cocrystallisée, mais ces différences sont mineures.

Le monomère d'actine a une structure globulaire de 3,5 x 5,5 x 5,5 nm et est composé de 2 domaines séparés par une crevasse (Kabsch *et al.* 1990). Chacun des domaines du monomère peut être subdivisé en 2 sous-domaines.

Chaque sous-domaine du monomère est composé de plis- β en son centre et de 2 ou 3 hélices- α en périphérie. La structure secondaire de l'actine est composée approximativement de 40% en feuillets- β et de 30% en hélices- α (Kabsch *et al.* 1990 ; Kabsch & Vandekerckhove 1992). La composition en structures secondaires du monomère d'actine est la même, quelle que soit la protéine avec laquelle l'actine est cocrystallisée (Gerstein & Altman 1995). Les deux extrémités (amino et carboxy terminal) de la chaîne polypeptidique de l'actine sont situées dans le sous-domaine 1.

L'actine possède un site de liaison pour un nucléotide, en général l'ATP ou l'ADP. Ce site se trouve près de la base de la crevasse à l'interface des 2 domaines du monomère (Kabsch *et al.* 1990).

On retrouve également dans la crevasse du monomère un site pour un cation divalent, comme le Mg^{++} ou le Ca^{++} , appelé site de haute affinité. Dans la cellule, c'est le Mg^{++} qui occupe ce site de haute affinité pour les cations divalents. En absence de cation divalent sur ce site, l'actine se dénature (Valentin-Ranc & Carlier 1991). Le rôle de l'ATP et du cation divalent est de retenir ensemble et de stabiliser les 4 sous-domaines du monomère d'actine. En effet, il existe des ponts salins et des liaisons hydrogène entre les groupements

phosphate du nucléotide lié (ATP ou ADP) qui séquestrent le cation divalent associé.

Le monomère possède également des sites de moyenne, basse et très basse affinité pour les cations divalents, dont on ignore la localisation. La polymérisation des monomères en filaments est induite par la liaison de cations divalents aux sites de moyenne affinité (Pollard 1986; 1990).

1.3. Structure du filament

La détermination de la structure de l'actine F à l'échelle atomique n'a jamais été effectuée, car la cristallisation s'avère difficile. Le filament d'actine possède une structure en double hélice, présentée à la figure 2, dont le pas est de 37,5 nm et qui est formée de 13 monomères par tour. Le diamètre du filament d'actine est d'environ 7 nm (Lorenz *et al.* 1993).

Les monomères, à l'intérieur du filament, interagissent entre eux par des interactions, majoritairement de type hydrogène, qui sont localisées dans trois régions du monomère. Un monomère se lie donc à trois monomères adjacents (Tirion *et al.* 1995). Quelques ponts salins semblent également impliqués dans cette interaction (Holmes *et al.* 1990).

Dans un filament d'actine, les monomères sont tous orientés de la même façon. Par conséquent, les deux extrémités du filament sont différentes. En microscopie électronique, la polarité du filament a été mise en évidence par décoration du filament avec le fragment S_1 de la myosine. Le fragment S_1 de la myosine se fixe sur le filament d'actine avec un certain angle, comme illustré à la figure 3.

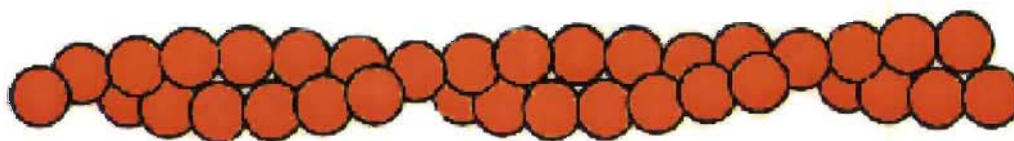


Figure 2. Schéma d'un filament d'actine montrant sa structure en double hélice.

Lorsque l'on observe ce filament décoré au microscope électronique, on peut apercevoir que le filament est couvert de fragments S_1 de myosine, formant une série de pointes de flèche. L'une des extrémités du filament est formée d'une « pointe de flèche », il s'agit de l'extrémité dite pointue (pointed end en anglais). L'autre extrémité est appelée extrémité barbue (barbed end en anglais) (Moore *et al.* 1970).

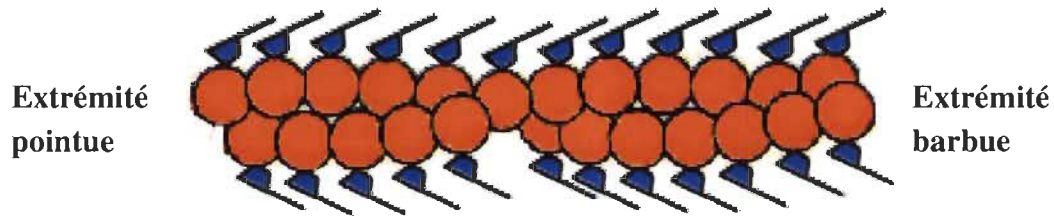


Figure 3. Schéma d'un filament d'actine décoré par le fragment S1 de la myosine.

1.4. Polymérisation de l'actine

L'actine monomérique a la propriété de polymériser et de former des filaments. La polymérisation de l'actine, schématisée à la figure 3, peut être divisée en quatre étapes: l'activation du monomère, la nucléation, l'élongation, et la phase stationnaire (pour revue voir Pollard 1990; Carlier 1991; Estes *et al.* 1992). Il importe de remarquer que chacune des réactions est réversible.

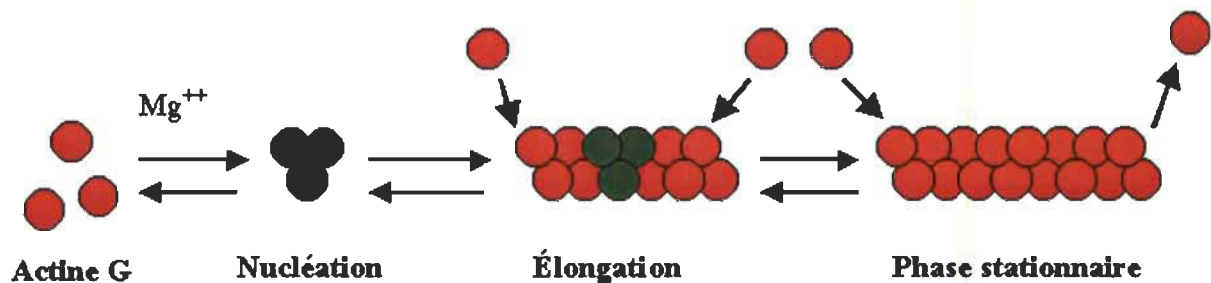


Figure 4. Schéma illustrant le processus de polymérisation de l'actine.

- 1) **l'activation du monomère** se produit suite à la fixation de cations divalents à quatre des cinq sites de moyenne affinité. Un changement de conformation se produit alors (Rouyarenc & Travers 1981; Roustan *et al.* 1985);
- 2) **la nucléation** consiste en la formation d'un trimère. Ce trimère est le noyau de polymérisation (Grazi *et al.* 1983). La nucléation est l'étape limitante de la polymérisation, car elle est plus lente (Wegner & Engel 1975);
- 3) **la phase d'élongation** est la phase au cours de laquelle les monomères viennent se lier au noyau de polymérisation et former ainsi un filament qui s'allonge. L'affinité des deux extrémités du filament pour les monomères n'est pas la même. Ainsi, les deux extrémités du filament ne croissent pas à la même vitesse. Il y a une extrémité à croissance rapide, appelée aussi bout positif, et une extrémité à croissance lente, appelée bout négatif. Kondo & Ishiwata (1976) ont montré que l'extrémité à croissance rapide est l'extrémité barbue et l'extrémité à croissance lente est l'extrémité pointue;
- 4) **la phase stationnaire** est l'étape où la longueur du filament est constante. Il n'y a plus de polymérisation nette. Cependant la phase stationnaire est une phase dynamique. En effet, des monomères vont continuer à se fixer

au filament à l'extrémité à croissance rapide et un nombre égal de monomères se détachent de l'extrémité à croissance lente (Wanger *et al.* 1985; Wegner 1982). Ce phénomène est appelé « treadmilling ». Ce « treadmilling » aboutit à un équilibre dynamique entre les populations d'actine G et F. La vitesse du treadmilling est estimée à 2 μm /heure (Selve & Wegner 1986).

Au cours du treadmilling, il y a ajout de monomères qui contiennent de l'ATP à l'extrémité à croissance rapide et libération de monomères qui contiennent de l'ADP à l'extrémité à croissance lente. L'actine F agit donc comme une ATPase. Le maintien de l'actine sous forme filamenteuse implique donc, pour la cellule, une dépense énergétique sous forme d'ATP.

Le rôle de l'hydrolyse de l'ATP au cours de la polymérisation n'est pas connu. Carlier *et al.* (1985) ont montré que les monomères d'actine-ATP ont moins tendance à se détacher de l'extrémité du filament. L'ATP lié au monomère aurait donc pour rôle d'éviter la dépolymérisation. Cette hypothèse est toutefois contestée par certains, car la polymérisation de l'actine peut avoir

lieu sans qu'il y ait hydrolyse d'ATP. En effet, il est possible de faire polymériser des monomères d'actine-ADP (Cooke 1975 ; Gershman *et al.* 1989). Ces filaments d'actine-ADP sont moins résistants à la dénaturation thermique et à la dénaturation aux hautes pressions que les filaments formés d'actine-ATP (Bombardier 1995).

L'ATP aurait aussi une fonction de stabilisation du filament d'actine contre des agents dénaturants comme le SDS et le KI (Danker 1989 ; Ikeuchi *et al.* 1992).

1.4.1. Régulation de la polymérisation de l'actine

L'équilibre entre la forme monomérique et la forme filamenteuse de l'actine peut être modifié si on fait varier les conditions du milieu. Ainsi, si la concentration en cations divalents diminue, l'équilibre sera déplacé dans le sens de la formation d'actine G. Par contre, si la concentration en cations divalents est augmentée, l'équilibre sera déplacé vers la formation de filaments.

In vivo, la concentration en cations divalents est telle que, l'actine devrait être en totalité sous forme filamenteuse. Cependant, dans la cellule, 50% de l'actine est sous forme monomérique. Il existe donc dans la cellule des facteurs qui contrôlent la polymérisation. Puisque la composition ionique de la cellule ne varie que très peu, la régulation de la polymérisation est sous la dépendance d'autres facteurs. Ces facteurs sont des protéines qui se lient à l'actine et qui ont été nommées ABP (de l'anglais Actin Binding Proteins).

Ces ABP déplacent l'équilibre, soit vers la formation d'actine G, soit vers la formation d'actine F. Il existe plusieurs familles d'ABP qui jouent un rôle dans la régulation de la polymérisation :

- **Protéines de séquestration des monomères.** Ces protéines se lient aux monomères et empêchent la polymérisation de l'actine. Ex. la profiline et la thymosine β_4 .
- **Protéines de désagrégation.** Elles limitent la longueur des filaments en les coupant en petits fragments. Ex. la gelsoline.
- **Protéines coiffantes.** Elles se fixent à une extrémité du filament ce qui empêche les monomères de se fixer ou de se détacher d'une extrémité

du filament. Elles contrôlent donc la longueur du filament. Ex. la CapZ et la tropomoduline.

La régulation de la polymérisation de l'actine par ces protéines permet à la cellule de conserver une réserve de monomères d'actine pour former des filaments au moment où les fonctions cellulaires impliquent la formation de ces filaments.

L'actine G forme des solutions moins visqueuses que celles de l'actine F. Il a été montré que la viscosité d'une solution d'actine G augmente avec la température, et ce, en autant qu'il y a assez d'ATP en solution (Ikeuchi *et al.* 1990). L'augmentation de la viscosité d'une solution d'actine G, due à la température, serait le résultat de la polymérisation.

La concentration d'actine en solution est également un facteur qui influence sa polymérisation. Il y a une concentration minimum d'actine requise pour que la polymérisation soit possible. Il s'agit de la concentration dite critique. En dessous de cette concentration, aucun filament ne pourra être formé ou maintenu même si la concentration en cations divalents est suffisante.

La concentration critique de l'actine dépend de plusieurs facteurs: de la température (Asakura *et al.* 1963), de la force ionique (Oosawa *et al.* 1959) et dans une moindre mesure, du pH de la solution (Kasai *et al.* 1962).

1.5. Formation d'actine paracristalline

Les paracristaux d'actine sont constitués de filaments d'actine disposés parallèlement et en phase. L'actine paracristalline peut être obtenue en présence d'une concentration en MgCl_2 supérieure à 20 mM (Hanson 1967). À de fortes concentrations en MgCl_2 , les sites de basse affinité de l'actine Mg^{++} sont saturés, ce qui entraîne la formation de paracristaux (Strzelecka-Golaszewska *et al.* 1974; 1978a; 1978b). Les paracristaux n'existent pas *in vivo*, mais leur utilisation *in vitro* permet l'étude de la structure de l'actine F en cristallographie des rayons X.

1.6. Changements de conformation du monomère

La conformation du monomère d'actine peut être modifiée de façon contrôlée ce qui peut avoir une incidence sur ses propriétés. Des études biologiques, spectroscopiques, ainsi que la microscopie électronique ont permis de montrer que la conformation de l'actine est différente selon le nucléotide lié,

ou selon le cation présent dans le site de haute affinité (Allen *et al.* 1996 ; Frieden *et al.* 1980).

Des données obtenues en cristallographie ont montré que les principaux domaines de l'actine peuvent subir une rotation l'un par rapport à l'autre (Schutt *et al.* 1993 ; Chik *et al.* 1996). Cette rotation permet aux deux principaux domaines de l'actine de s'ouvrir l'un par rapport à l'autre de près de 10 degrés. Cette modification de la structure résulte en une augmentation d'environ 25% de l'accessibilité au solvant du nucléotide lié (Chik *et al.* 1996).

L'ensemble de ces modifications de la structure du monomère d'actine montre qu'il s'agit d'une structure qui peut adopter différentes conformations selon les conditions du milieu.

Comme nous l'avons déjà mentionné, pour que la polymérisation puisse avoir lieu, le monomère d'actine doit subir certaines modifications de conformation. Ce changement est provoqué par la liaison de cations divalents aux sites de moyenne affinité du monomère (Pollard *et al.* 1986 ; 1990). Un changement de conformation dans une protéine peut s'opérer soit au niveau de sa

structure secondaire, soit au niveau de sa structure tertiaire. Aucune différence dans le contenu en structures secondaires entre l'actine G et l'actine F n'a été observée jusqu'ici, lors d'études effectuées en spectrométrie de CD et en FTIR (Hegyi & Venyaminov 1980).

Par contre, la polymérisation semble être accompagnée de certaines modifications au niveau de la structure tertiaire de la protéine. En effet, au cours de la transition G-F, un changement de conformation a lieu dans la fente séparant les deux domaines du monomère d'actine (Hegyi *et al.* 1980). Des études effectuées en spectrométrie de dichroïsme circulaire dans le proche UV montrent qu'il y a un changement substantiel dans l'environnement du tryptophane et des résidus tyrosine (Barden *et al.* 1983).

En comparant les résultats obtenus par diffraction des rayons X des cristaux d'actine G et F, il a été montré que le sous-domaine 2 a subi une rotation d'environ 15° dans le « monomère F » par rapport à sa position dans le « monomère G » (Holmes *et al.* 1990). Pour obtenir des cristaux « d'actine G »,

le monomère a ici été co-cristallisé avec la DNase I. Pour conserver les conditions les plus semblables possibles, les cristaux d'actine F ont aussi été formés à l'aide de monomères complexés à la DNase I.

Ces derniers résultats sont discutables puisqu'ils ne tiennent pas compte de l'influence de la DNase I dans la modification de la structure de l'actine au cours de la polymérisation. Par contre, ils sont appuyés par des résultats obtenus en microscopie électronique montrant une légère modification de la forme du monomère après son incorporation dans le filament (O'Brien 1983).

1.7. La phalloïdine

Certaines substances ont la capacité de se lier spécifiquement à l'actine et d'influencer sa polymérisation et sa stabilité. La phalloïdine est une de ces substances. Cette propriété de la phalloïdine a permis de l'utiliser comme outil d'étude, ce qui a contribué à élucider certains aspects fondamentaux de la polymérisation de l'actine (Cooper 1987). La phalloïdine a la propriété de se lier à l'actine et de la stabiliser contre plusieurs agents chaotropiques comme la sonication, l'iodure de potassium, la cytochalasine B, le clivage protéolytique et

la chaleur (Pollender & Gruda 1979; DeVries & Wieland 1978; Danker *et al.* 1975; Schäfer *et al.* 1975; Low *et al.* 1975; Low & Wieland 1974). L'interaction de la phalloïdine avec l'actine est la cause de la toxicité. En effet, l'équilibre intracellulaire entre l'actine G et F des hépatocytes est perturbé. La région comprenant Trp6 et Cys3 (la structure de la phalloïdine est présentée à la figure 5) est essentielle aux propriétés de la phalloïdine (Kessler & Wein 1991).

La phalloïdine se lie entre les deux sous-unités de l'actine (Vandekerckhove *et al.* 1985) à proximité du site de liaison de l'ATP (Hegyi *et al.* 1986). Il en résulte une augmentation importante de la stabilité de l'actine en particulier à la chaleur. L'utilisation de la phalloïdine comme outil d'étude de l'actine a donc permis de mettre en évidence que la région présente entre les deux sous-unités a un rôle important dans la dénaturation thermique de cette protéine.

On a cru, durant une certaine période, que la phalloïdine entraînait la diminution du taux d'hydrolyse de l'ATP à l'intérieur du filament qui a atteint la phase stationnaire (Wendel & Danker 1987). Par contre, il a été démontré que la phalloïdine réduit plutôt le relargage du phosphate inorganique ce qui allonge le temps de vie de l'intermédiaire ADP-Pi-actine-F (Danker & Hess 1990). Ces

travaux suggèrent qu'il existe un lien entre la stabilité du filament et l'intermédiaire ADP-Pi-actine-F. En effet, au cours de la polymérisation de l'actine, le largage du Pi ne suit pas immédiatement l'hydrolyse de l'ATP, mais est quelque peu retardé (Carlier & Pantaloni 1986; Carlier 1987). Il existe donc à l'intérieur du filament un complexe ADP-Pi-actine-F. Par contre, il n'y a aucun effet du phosphate inorganique sur la cinétique de liaison de la phalloïdine à l'actine (De La Cruz & Pollard 1994).

Orlova & Egelman (1993) ont montré que la phalloïdine n'a pas le même effet stabilisant sur le filament d'actine selon que le cation divalent lié au site de haute-affinité soit le Ca^{++} ou le Mg^{++} . Les filaments d'actine- Mg^{++} possèdent des différences structurelles importantes par rapport à l'actine F liée au Ca^{++} . Lorsque la phalloïdine se lie au filament d'actine- Mg^{++} le filament change de conformation. Cette nouvelle conformation est analogue à celle des filaments d'actine Ca^{++} non-liés à la phalloïdine (Rebello & Ludescher 1998), ce qui suggère que l'addition de phalloïdine aux filaments contenant du Mg^{++} augmente la stabilité de ces filaments qui ressemblent alors aux filaments contenant du Ca^{++} .

Les filaments d'actine mis en présence de phalloïdine ne semblent pas subir de changements morphologiques lorsqu'on les observe en microscopie

électronique à transmission (Steinmetz *et al.* 1997). Même si la taille et la forme du filament d'actine ne semble pas modifiées lorsque la phalloïdine est liée au filament, le patron de contact entre les monomères et entre les deux brins de l'hélice révèle des différences subtiles lorsque l'on fait une reconstruction 3-D du filament (Bremer *et al.* 1994). La diffraction des rayons-X a révélé également des changements structurels. Les sous-domaines 1 et 2 qui sont situés sur la face externe du filament subissent une rotation d'environ 4^0 vers les domaines 3 et 4 en présence de phalloïdine (Lorenz *et al.* 1993).

La phalloïdine diminue la flexibilité des filaments d'actine, quel que soit le nucléotide et le cation divalent présent dans le site de haute affinité (Rebello & Ludescher 1998; Ludescher & Liu 1993). On suggère que la phalloïdine rigidifie le filament ce qui est probablement le résultat du renforcement des liens entre les monomères.

Il est bien établi que la phalloïdine se lie à l'actine F et déplace ainsi l'équilibre actine G \leftrightarrow actine F, vers la formation de filaments. En présence de phalloïdine, la concentration critique de l'actine est diminuée de 10 à 30 fois (Estes *et al.* 1981; Faulstich *et al.* 1977). Des observations effectuées en microscopie électronique ont montré que la phalloïdine réduit la constante de

dissociation aux 2 extrémités du filament à une valeur très faible (Estes *et al.* 1981) et réduit aussi la constante d'association à l'extrémité barbue d'environ 20% (Coluccio & Tilney 1984 ; Sampath & Pollard 1991). La phalloïdine affecte donc à la fois la liaison et la dissociation des sous-unités d'actine au filament. Cet effet de la phalloïdine peut être expliqué par un changement de conformation à l'extrémité barbue des molécules d'actine polymérisées. Ce changement de conformation augmente l'interaction avec le monomère adjacent mais défavorise la liaison d'un nouveau monomère au filament (Sampath & Pollard 1991). Ce renforcement de l'interaction entre les monomères, causé par la phalloïdine, a pour conséquence de stabiliser le polymère contre l'action de nombreux agents dénaturants.

Les différentes études qui visent à déterminer à quel rapport molaire l'action de la phalloïdine est maximale sont arrivées à des résultats différents. Miyamoto *et al.* (1986) affirment qu'une molécule de phalloïdine stabilise deux molécules d'actine, alors que d'autres résultats ont démontré que l'action de la phalloïdine atteint un plateau pour un rapport de 1 pour 1 (Danker *et al.* 1975; Le Bihan 1993).

Il a longtemps été admis que la phalloïdine ne se liait qu'à l'actine F, et non à la forme monomérique de l'actine (DeVries *et al.* 1976; Wieland *et al.* 1975; Wieland 1977a, 1977b). Par contre, Le Bihan (1993) a montré, par une étude effectuée en calorimétrie différentielle à balayage (DSC), que la phalloïdine avait aussi un effet stabilisant sur l'actine G. En effet, il a montré qu'en présence de phalloïdine, l'actine G a une température de transition, c'est à dire la température à laquelle se produit la dénaturation de la protéine, plus élevée. Le Bihan interprète la stabilisation de l'actine G par la phalloïdine comme étant le résultat d'une double influence de la phalloïdine sur l'actine monomérique. Dans un premier temps, la phalloïdine réduit la concentration critique de l'actine et favorise la forme filamenteuse. L'augmentation de la température de la solution dans le calorimètre favorise aussi la polymérisation de l'actine. L'actine F ainsi formée serait alors stabilisée par la phalloïdine. Les résultats obtenus par Le Bihan ne permettent pas d'affirmer s'il y a interaction directe entre la phalloïdine et l'actine G, puisque c'est la chaleur générée par le calorimètre, qui induirait la polymérisation de l'actine, et la phalloïdine agirait sur l'actine F formée suite à l'augmentation de température.

La fluorescence intrinsèque du tryptophane a été utilisée par une autre équipe pour étudier l'effet de la phalloïdine sur l'actine G et l'actine F. L'actine

G en présence de phalloïdine est plus résistante à l'effet dénaturant de l'urée (Vedenkina *et al.* 1995), ce qui montre l'existence d'une interaction directe entre la phalloïdine et l'actine G.

1.7.1. Effets *in vivo* de la phalloïdine

Lorsqu'elle est injectée dans la circulation sanguine, la phalloïdine n'est captée que par les hépatocytes, car se sont les seules cellules qui sont perméables à cette toxine. Une fois à l'intérieur de l'hépatocyte, la toxine se lie spécifiquement aux filaments d'actine et les stabilise, ce qui entraîne une altération des fonctions hépatiques (Wieland 1986).

La phalloïdine provoque une accumulation de filaments d'actine dans les hépatocytes, une altération des canalicules biliaires, une perte de microvillosités, et provoque des phénomènes de vacuolisation et d'endocytose (Gabbiani *et al.* 1975; Tuchweber & Gabbiani 1975). C'est cette action de la phalloïdine sur l'actine des hépatocytes qui entraîne ses effets toxiques sur l'organisme, et provoque la mort.

La phalloïdine est une toxine extraite des champignons *Amanita phalloides* et *Amanita virosa* de la famille des amanites. Outre la phalloïdine, les

amanites contiennent d'autres toxines comme les amatoxines et les virotoxines. La viroïsine est une toxine de la classe des virotoxines que l'on retrouve dans le champignon *Amanita virosa* et non *Amanita phalloides*. Elle a, comme la phalloïdine, une grande affinité pour l'actine et possède également la propriété de stabiliser l'actine mais son action sur l'actine a été peu étudiée.

1.8. La viroïsine : une toxine se liant spécifiquement à l'actine

1.8.1. Structure de la viroïsine

La viroïsine est un peptide monocyclique dont la structure a été établie par Faulstich *et al.* (1980) et qui est présentée à la figure 3B. Le poids moléculaire de la viroïsine est de 800 Da. Deux acides aminés présents dans la viroïsine ne se retrouvent dans aucun autre peptide ou protéine connu, il s'agit de la 2,3-trans-3,4-dihydroxy-L-proline et du 2-(méthylsulfonyl)-L-tryptophane (Faulstich *et al.* 1980).

La phalloïdine et la viroïsine ont une structure similaire. Trois de leurs cinq acides aminés sont différents (voir figure 5). En position 3, le résidu L-cystéine qui forme dans la phalloïdine un pont thioéther avec le tryptophane en position 6 est remplacé par une D-sérine. En position 4, le résidu allo-4-hydroxyproline est hydroxylé davantage en 3,4-dihydroxyproline, avec les deux

groupes hydroxy en position trans (Buku *et al.* 1980). Finalement, le tryptophane qui se trouve en position 6 dans la phalloïdine et qui fait le pont thioéther, est remplacé dans la viroïsine par le 2-(méthylsulfonyl) tryptophane. La principale différence entre la phalloïdine et la viroïsine est la présence d'un pont disulfure dans la phalloïdine, qui rend sa structure bicyclique très rigide, contrairement à la viroïsine qui possède une structure monocyclique, par conséquent moins rigide.

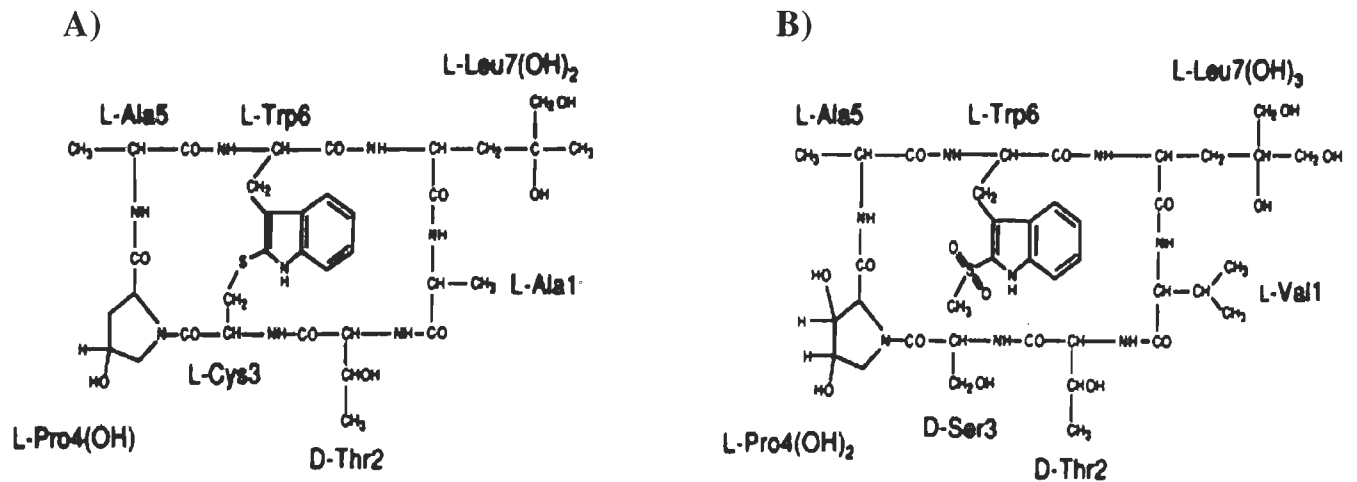


Figure 5. Schéma de la phalloïdine (A) et de la viroïsine (B), tiré de Kobayashi *et al.* 1995.

Une détermination de la structure tridimensionnelle de la viroïsine effectuée en RMN, suggère que le peptide ait une conformation très ordonnée en solution, malgré sa structure monocyclique. Cette analyse a aussi permis de

montrer que la conformation de la viroïsine est similaire à celle de la phalloïdine (Bhaskaran & Chin 1994).

Pour étudier la structure de la viroïsine et son interaction avec l'actine, l'utilisation d'analogues synthétiques de la viroïsine s'est avérée utile. Deux analogues particuliers ont été synthétisés : la D-sérine a été remplacée par la D-alanine et par la L-sérine. L'analyse de la structure de ces analogues de la viroïsine en RMN a permis de montrer que la configuration D de la sérine est l'élément structurel qui permet à la viroïsine de maintenir une structure similaire à celle de la phalloïdine.

Lorsque l'on remplace la dihydroxyproline par le résidu allo-hydroxyproline, il n'y a aucune modification de la structure du peptide observée en RMN, mais l'affinité de la toxine pour l'actine est abaissée d'un facteur de 5. Le second groupe hydroxy de la proline ne semble pas contribuer à la stabilité de la viroïsine, mais il est probablement en contact avec la surface de l'actine (Zanotti *et al.* 1999). La conformation de la phalloïdine ressemble à celle de la

viroïsine dans la région Cys3-Pro4-Ala5-Trp6. Cette conformation est différente de celle des analogues non-toxiques. Ces résultats suggèrent que cette région joue un rôle important dans son interaction avec l'actine (Kobayashi *et al.* 1995), et par conséquent dans leur toxicité.

De plus, on a longtemps cru que le mode d'interaction au niveau moléculaire de la viroïsine et de la phalloïdine avec l'actine était différent (Faulstich *et al.* 1980). Il semble par contre, à la lumière des expériences effectuées au cours des dernières années, que le mode d'interaction serait très similaire, puisque la structure tridimensionnelle des deux peptides est semblable. Les effets biologiques des virotoxines et de la phalloïdine sont également semblables.

1.8.2. Effets de la viroïsine sur l'actine

La viroïsine est reconnue pour se lier spécifiquement à l'actine F et la stabiliser. La viroïsine protège l'actine filamenteuse contre plusieurs agents dénaturants dont le mode d'action est différent comme l'acide osmique, l'iodure

de potassium et les ions chaotropiques. Elle protège également l'actine contre l'action dépolymérisante de la DNase I et la cytochalasine B. La viroïsine protège aussi l'actine F contre la dénaturation thermique (Gicquaud & Turcotte 1983). La viroïsine empêche les monomères d'actine F de quitter le filament. L'équilibre actine G - actine F est alors déplacé vers la formation d'actine F. De plus, en présence de viroïsine il y a accélération de la vitesse de polymérisation de l'actine (Gicquaud & Turcotte 1983).

In vivo, les virotoxines induisent la polymérisation de l'actine, mais aussi la fragmentation de la membrane, ce qui suggère que l'actine pourrait interagir avec certaines composantes de la membrane plasmique (Gicquaud & Paré 1992).

Gicquaud et Turcotte (1983) ont montré que la viroïsine est plus efficace que la phalloïdine pour protéger l'actine F contre l'action destructrice de l'acide osmique. Il a été montré que la viroïsine se lie à l'actine avec plus d'affinité que la phalloïdine, en raison de la plus grande flexibilité de la structure de la viroïsine.

1.9. Dénaturation des protéines

Une protéine possède une seule structure qui lui permet de remplir ses fonctions: sa forme native. La structure native d'une protéine est maintenue grâce à des forces hydrophobes, des liaisons hydrogène et des ponts disulfures.

Une modification de l'environnement de la protéine, comme l'augmentation de la température, peut entraîner un changement de sa structure. L'augmentation de la température entraîne une agitation de la chaîne peptidique. Les vibrations et mouvements de la chaîne peptidique vont déstabiliser les structures secondaires et tertiaires. Lorsque les forces dues à l'agitation des molécules de la protéine deviennent supérieures aux forces stabilisantes telles les interactions de Van der Waals et les ponts hydrogènes, la protéine subit une dénaturation (Privalov & Gill 1988). La protéine perd alors sa structure native et, par conséquent, ses propriétés biologiques. Outre la chaleur, il existe plusieurs autres types d'agents dénaturants, des agents chimiques comme des acides ou l'urée, des agents physiques comme le froid et la pression, et des agents biologiques comme les protéases.

Si la forme native d'une protéine est unique, il existe plusieurs formes d'états dénaturés; celui-ci dépend de l'agent dénaturant et des conditions de

dénaturation (Tanford 1968 ; Tsou 1993 ; Ptitsyn 1995). L'étude de la dénaturation et de l'état dénaturé des protéines fait l'objet de plus en plus d'études.

Il a longtemps été admis que la dénaturation des protéines était le résultat d'une seule transition de l'état natif vers l'état dénaturé, qui correspondait à la protéine complètement dépliée et organisée de façon aléatoire. Au début des années 80, on a mis en évidence que la transition entre l'état natif et l'état complètement dénaturé se fait via des états intermédiaires stables (Ptitsyn 1995 ; Dolgikh *et al.* 1981 ; Gilmanshin *et al.* 1982 ; Ohgushi & Wada 1983).

L'augmentation de température, contrairement à la dénaturation par une forte concentration en urée ou en guanidine hydrochloride (Gdn-HCl), transforme souvent une protéine en un état partiellement dénaturé dans lequel la structure secondaire est largement conservée (Tanford 1968). Cet état est appelé le globule fondu. Le terme globule fait référence à la grande compacité de cette organisation, compacité comparable à celle que l'on retrouve dans la forme native; le terme fondu fait référence à une plus grande entropie et enthalpie comparativement à la structure native, ainsi qu'aux plus grandes

fluctuations de la molécule, particulièrement au niveau des chaînes latérales du noyau (Dolgikh *et al.* 1981).

Pour les protéines de faible poids moléculaire et peu complexes, le passage de la forme native à la forme dénaturée est souvent un phénomène réversible. L'enthalpie d'une réaction se définit par 2 types d'enthalpie : l'enthalpie calorimétrique et l'enthalpie de Vant'Hoff. L'enthalpie calorimétrique (ΔH_{cal}) correspond à l'aire sous la surface du thermogramme par rapport à la quantité de protéines.

$$\Delta H_{cal} = \frac{Q_T}{n} = \int_{T_i}^{T_f} \Delta C_p (T) dt$$

ΔH_{cal} : enthalpie calorimétrique (kJ/mole)

n : nombre de moles de protéines

T_i : limite inférieure de température (°C)

T_f : limite supérieure de température (°C)

Q_T : aire totale sous la courbe

L'enthalpie de Vant'Hoff est obtenue par la relation proposée par Privalov en 1979 :

$$\Delta H_{VH} = \frac{4RT_m^2 \Delta C_{p_{max}}}{Q_T}$$

ΔH_{VH} : enthalpie de Vant'Hoff (kJ/mole)

T_m : température de transition (K)

$\Delta C_{p_{max}}$: variation de la capacité calorifique à T_m (kJ K⁻¹)

R : constante des gaz parfaits 8,314 J mole⁻¹ K⁻¹

Le rapport entre ces 2 valeurs, soit $\Delta H_{VH} / \Delta H_{cal}$ représente la coopérativité de la réaction. Ce rapport se rapproche de l'unité dans le cas de petites protéines globulaires (Privalov 1979). Il n'y a dans ce cas aucun intermédiaire stable au cours de la dénaturation mais seulement l'état natif et l'état dénaturé. Les protéines ayant un rapport $\Delta H_{VH} / \Delta H_{cal}$ égal à l'unité et se dénaturant de façon réversible vont obéir à la relation établie par Chang *et al.* (1984) :

$$\Delta C_p(T) = \frac{n\Delta H^2}{RT^2} \frac{\exp [(-\Delta H R^{-1}) (T^{-1} - T_m^{-1})]}{[1 + \exp [(-\Delta H R^{-1})(T^{-1} - T_m^{-1})]]^2}$$

ΔC_p : variation de la capacité calorifique à T_m (kJ K⁻¹)

T : température (K)

n : nombre de moles de protéines

R : constante des gaz parfaits (8,314 J mole⁻¹ K⁻¹)

T_m : température de transition (K)

ΔH : enthalpie molaire (kJ/mole)

Pour les protéines de grande taille et plus complexes, la dénaturation est suivie d'un phénomène d'agrégation et de précipitation, qui rend la dénaturation irréversible (Wetzel *et al.* 1990). Une fois l'état dénaturé atteint, on ne peut retourner à l'état natif. Dans ce cas, les paramètres thermodynamiques de la dénaturation qui se produit de façon irréversible sont extrêmement complexes et mals définis.

L'agrégation est l'une des propriétés caractéristiques de plusieurs protéines dénaturées. L'agrégation fait également l'objet d'un intérêt grandissant puisqu'elle est associée à un certain nombre de maladies comme le syndrome de Down et la maladie d'Alzheimer (Massry & Glassock 1983) et la cataracte (Thompson *et al.* 1987 ; Clark & Steele 1992). L'agrégation des protéines est causée par la formation d'un état partiellement dénaturé de la protéine, (Uverski & Fink 1998 ; Uversky *et al.* 1998). L'agrégation est souvent associée à une augmentation des structures de types feuillets- β (Joly 1965 ; Strzelecka-Golaszewska *et al.* 1985).

Plusieurs informations concernant une protéine peuvent être obtenues à partir de l'étude de sa dénaturation thermique. L'énergie que l'on doit fournir pour dénaturer une protéine nous renseigne sur l'énergie impliquée dans le maintien de sa structure native et sur sa stabilité. En effet, la stabilité d'une protéine est définie comme étant la différence d'énergie libre entre les états natifs et dénaturés. On pourra également obtenir des renseignements sur l'interaction de la protéine avec un ligand qui la stabilise, ou la déstabilise.

1.10. Dénaturation thermique de l'actine : revue de la littérature

La dénaturation thermique de l'actine a surtout été étudiée avec la forme monomérique de l'actine, l'actine G. La dénaturation thermique de l'actine G est un phénomène irréversible qui consiste en un déroulement partiel de la chaîne protéique. Pour que la dénaturation de l'actine soit complète, c'est à dire que la chaîne protéique soit totalement déroulée, il doit y avoir ajout d'un agent dénaturant comme l'urée (Bertazzon *et al.* 1990 ; Lehrer & Kerwar 1972). Lors de la dénaturation de l'actine G en présence d'urée, il n'y a pas de phénomène de précipitation.

En 1972, Lehrer & Kerwar utilisent la fluorescence du tryptophane pour étudier la dénaturation thermique de l'actine G. Lors de la dénaturation thermique le maximum d'émission de fluorescence de l'actine G est déplacé de 325 à 335 nm. Les auteurs suggèrent que l'actine G n'a pas une température de transition définie, la transition se faisant sur un large intervalle de températures. Plusieurs études ont par la suite été menées dans le but de déterminer de façon plus précise la température de transition de l'actine G. Ces expériences ont été effectuées en calorimétrie différentielle à balayage. Par cette technique

Fausnaugh *et al.* (1984) ont estimé la T_m à 80°C pour une vitesse de chauffe de 600°C/heure ; Tatunashvili & Privalov (1984) ont montré qu'en chauffant à 120°C/heure la T_m est de 66°C, alors que Bertazzon *et al.* (1990) ont estimé la T_m à 57,2°C en chauffant l'actine à 30°C/heure. Bertazzon *et al.* (1990) ont proposé que l'actine G est composée de domaines qui se dénaturent de façon indépendante. Cette hypothèse permet d'expliquer l'asymétrie du thermogramme. Ce modèle qui fait appel à une approche thermodynamique et qui considère que cette dénaturation est réversible, ne permet pas d'expliquer les variations de la valeur de T_m en fonction de la vitesse de balayage.

Les études effectuées en DSC montrent que la valeur de la T_m de l'actine G varie en fonction de la vitesse de balayage, ce qui suggère que la dénaturation thermique suit des lois cinétiques. Le Bihan (1993) a étudié l'aspect cinétique de la dénaturation thermique de l'actine G. Il a montré que l'approche cinétique correspond mieux au phénomène que l'approche thermodynamique généralement utilisée. L'approche cinétique de la

dénaturation thermique de l'actine permet d'expliquer les différentes valeurs de T_m obtenues lorsque la vitesse de balayage varie.

1.10.1. L'actine inactivée : un état partiellement dénaturé atteint lors de la dénaturation thermique

La transformation de l'actine G native vers sa forme inactivée se caractérise par l'incapacité du monomère à polymériser. Cet état peut être obtenu par traitement à l'EDTA ou EGTA (Strzelecka-Golaszewska *et al.* 1985). L'état inactivé de l'actine peut aussi être obtenu par dénaturation thermique (Nagy & Strzelecka-Golaszewska 1972 ; Bertazzon *et al.* 1990 ; Lehrer & Kerwar, 1972), par ajout d'une concentration modérée d'urée ou de guanidine hydrochloride (Kuznetsova *et al.* 1988), et finalement cet état se forme de façon spontanée au cours du temps (Kuznetsova *et al.* 1988).

La dénaturation de l'actine G est accompagnée par une modification de la structure secondaire de la protéine qui a été mise en évidence par CD-lointain. Il y a perte d'hélices- α et formation de feuillets- β (Nagy & Strzelecka-Golaszewska

1972; Kuznetsova *et al.* 1988 ; Bertazzon *et al.* 1990) L'irréversibilité de la dénaturation de l'actine serait due à l'agrégation des molécules inactivées (Kuznetsova *et al.* 1988 ; Bertazzon *et al.* 1990).

1.11. Problématique

Le Bihan (1993) a effectué une étude de la dénaturation thermique de l'actine. Au cours de son travail, il a utilisé comme outil la phalloïdine qui est une substance qui stabilise l'actine F contre la dénaturation thermique. Il a montré, entre autres, que la phalloïdine modifie le thermogramme de l'actine G, contrairement à toutes les études antérieures qui postulaient que la phalloïdine se liait spécifiquement à la forme filamenteuse de l'actine.

La viroïsine est une substance analogue à la phalloïdine. Dans un premier temps, nous avons voulu vérifier si la viroïsine agit, comme la phalloïdine à la fois sur l'actine F et sur l'actine G et de plus, quantifier l'effet stabilisant de la toxine sur l'actine, par calorimétrie différentielle à balayage.

Dans un deuxième temps, nous avons voulu caractériser l'interaction actine-viroïsine par différentes techniques dans le but de comprendre comment

la viroïsine interagit avec l'actine et la stabilise. Le dichroïsme circulaire nous permettra d'observer les changements dans le contenu en structures secondaires induit par la viroïsine. La fluorimétrie, quant à elle, nous renseignera sur la mobilité et la conformation de la structure tertiaire de la protéine.

Il est possible de déterminer si une solution est composée d'actine G ou d'actine F par viscosimétrie. La microscopie électronique permettra d'observer l'aspect des filaments d'actine et l'organisation des monomères d'actine. Ces techniques nous permettront donc de caractériser les modifications induites dans le monomère d'actine suite à son interaction avec la viroïsine.

CHAPITRE 2 : PRINCIPES DES TECHNIQUES

La dénaturation thermique de l'actine a été étudiée principalement par DSC et par CD. Ces deux techniques mesurent des paramètres différents et permettent de caractériser et de quantifier le processus de dénaturation des protéines.

2.1. Calorimétrie différentielle à balayage

La calorimétrie différentielle à balayage est une technique qui permet de mesurer les flux thermiques qui se produisent lorsque l'on chauffe un échantillon. Si à une température donnée, il se produit une transition de phase, on pourra mesurer la quantité d'énergie impliquée au cours de cette transition de phase.

2.1.1. Fonctionnement de l'appareil.

Le schéma du calorimètre est illustré à la figure 6. Le calorimètre est composé de quatre cellules, 3 échantillons et 1 référence, qui sont placées à l'intérieur d'un bloc de métal qui sert de puits thermique.

Le calorimètre chauffe les cellules échantillons de façon telle, que leur température augmente à la même vitesse que la cellule référence. La chaleur présente dans les cellules est transmise aux éléments à effet Pelletier situés sous les cuvettes. Des senseurs thermiques qui sont situés entre les cuvettes et ces éléments permettent de capter les phénomènes d'absorption ou d'émission de chaleur qui ont lieu dans chacun des échantillons. Les senseurs thermiques captent les flux de chaleur qui passent entre le bloc et les cellules puis les convertissent en signal analogique. Ce signal est converti en valeur de capacité calorifique de l'échantillon. La capacité calorifique se définit comme étant la quantité d'énergie thermique absorbée par degré et par gramme d'échantillon.

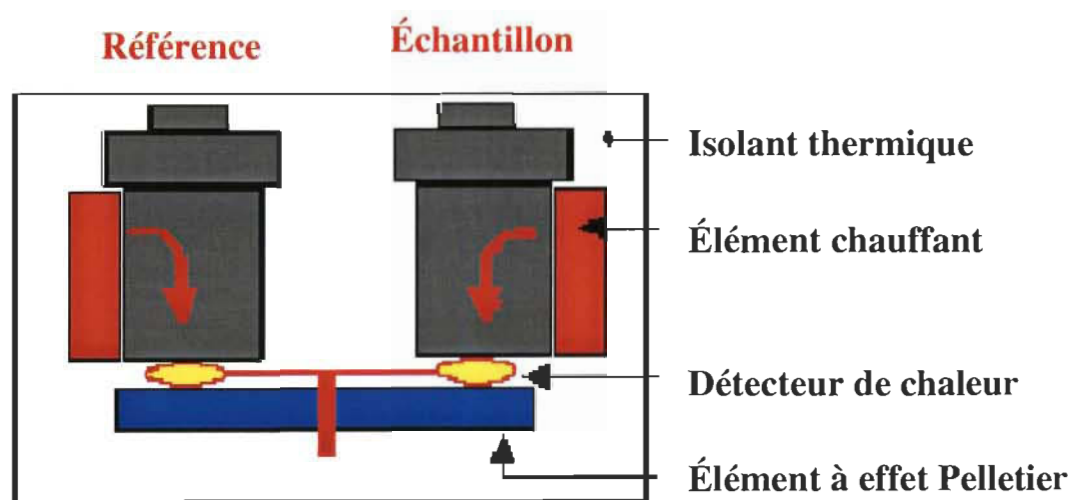


Figure 6. Schéma du calorimètre différentiel à balayage.

Les résultats sont présentés sous forme d'un graphique, appelé thermogramme, qui représente la capacité calorifique (Joules/°C) de l'échantillon en fonction de sa température (°C). Une réaction qui produit des phénomènes thermiques pourra ainsi être détectée et quantifiée.

2.1.2. Interprétation du thermogramme

Plusieurs paramètres thermodynamiques d'une réaction peuvent être déduits à partir de son thermogramme: la température de transition, l'enthalpie calorimétrique et la coopérativité de la réaction (Privalov *et al.* 1989). Un thermogramme typique de la dénaturation d'une protéine est présenté à la figure 7.

La température de transition (T_m), correspond à la température à laquelle la variation de capacité calorifique atteint sa valeur maximale. Pour une réaction réversible, la T_m est atteinte lorsque la moitié des molécules de l'échantillon sont dénaturées. L'aire totale sous la courbe correspond à l'enthalpie calorimétrique de la réaction ou quantité de chaleur impliquée dans le processus. La coopérativité est reliée à la largeur du pic de dénaturation ($\Delta T_{1/2}$).

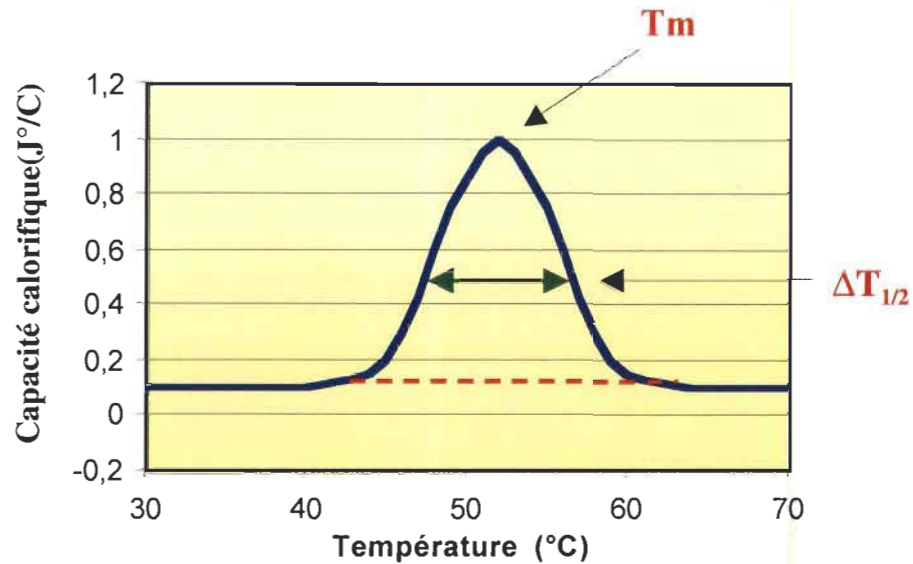


Figure 7. Schéma d'un thermogramme typique et illustration des principaux paramètres qui peuvent en être déduits : température de transition (T_m); la largeur du pic à mi-hauteur ($\Delta T_{1/2}$) et l'aire sous la courbe qui correspond à l'enthalpie de la réaction.

La coopérativité et l'enthalpie calorimétrique sont des paramètres définis pour les réactions réversibles. La réversibilité de la dénaturation d'une protéine se définit comme étant la capacité d'une protéine dénaturée à retourner sous sa forme native. La dénaturation thermique de l'actine est un processus irréversible. La signification de l'enthalpie et de la coopérativité n'ayant pas été vraiment établie pour les processus irréversibles, nous avons utilisé ces paramètres pour

caractériser les thermogrammes, mais nous avons peu élaboré sur l'interprétation de ces paramètres qui demeure difficile.

Par contre, nous avons utilisé la température de transition pour caractériser les processus de dénaturation. Pour les réactions irréversibles, la valeur de T_m est valide pour une vitesse de chauffe donnée. Lorsque la vitesse de chauffe varie, la T_m est modifiée.

2.2. Dichroïsme circulaire

2.2.1. Principes généraux du dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire peut se définir comme étant la différence d'absorption entre la lumière polarisée circulairement alternativement à gauche et à droite. Les bandes d'un spectre CD apparaissent donc là où il y a normalement des bandes d'absorption électronique dans une molécule asymétrique. L'activité optique est une propriété intrinsèque de toutes les molécules qui n'ont ni centre ni plan de symétrie. L'asymétrie est une importante caractéristique de la structure des protéines. Les structures secondaires (hélice- α , feuillet- β , ...) et la structure tertiaire d'une protéine sont asymétriques. La région

du spectre située dans la région de l'UV-lointain, soit la région inférieure à 260 nm nous renseigne sur le contenu en structures secondaires de la protéine. Cette région du spectre est dominée par la contribution des liaisons peptidiques.

Dans une hélice, l'environnement des unités qui la composent est identique et fortement asymétrique. Les contributions à l'activité optique de chaque chromophore monomérique s'ajoutent, alors qu'elles tendent à s'annuler dans les structures irrégulières. La spectrométrie de dichroïsme circulaire est une technique optique qui nous permet donc de détecter et de quantifier l'asymétrie de molécules. À partir de ces informations il est possible d'estimer le contenu en structures périodiques ou structures secondaires d'une protéine, ainsi que sa compacité ou structure tertiaire.

La figure 8 présente les spectres caractéristiques de chacune des structures secondaires de protéines. Les hélices- α présentent de larges bandes CD avec une différence de coefficient d'extinction négative à 222 et 208 nm et une troisième positive à 193 nm. Les feuillets- β montrent une large bande négative à 218 nm et une positive vers 195 nm.

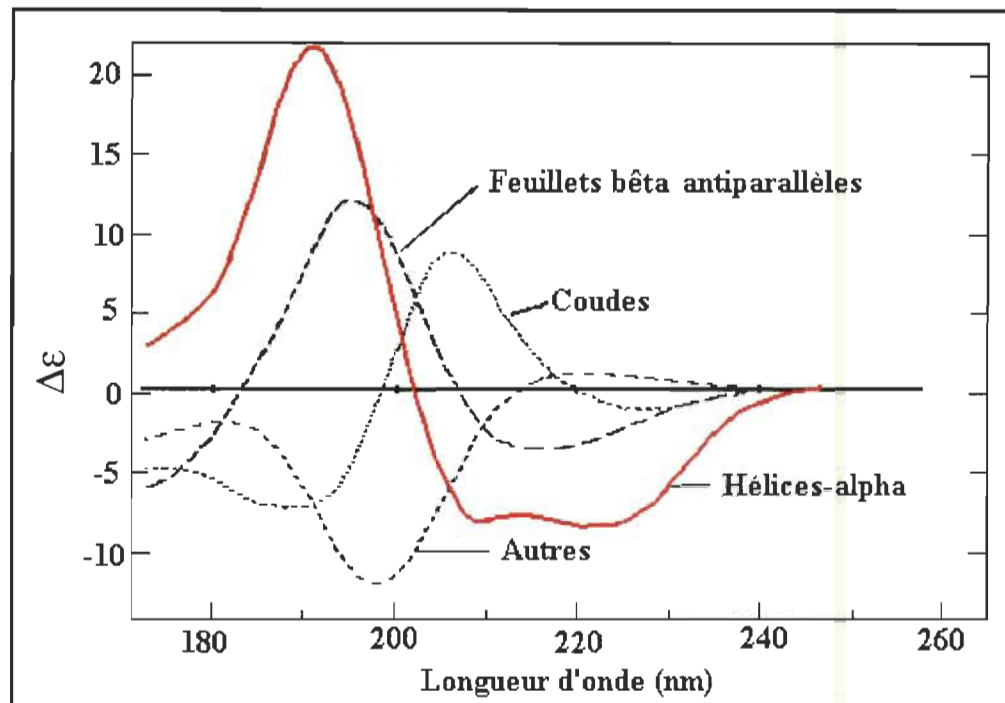


Figure 8. Spectres de dichroïsme circulaire de structures secondaires pures de protéines (Brahms et Brahms, 1980).

2.2.2. Fonctionnement de l'appareil.

Un spectropolarimètre est composé d'une source de lumière et d'un monochromateur qui sélectionne la lumière à la longueur d'onde désirée. Ensuite, le faisceau atteint un polariseur qui produit une lumière polarisée linéairement et finalement un modulateur photoélastique (retardateur d'onde) qui convertit la lumière polarisée linéairement en lumière polarisée circulairement alternativement vers la gauche et vers la droite.

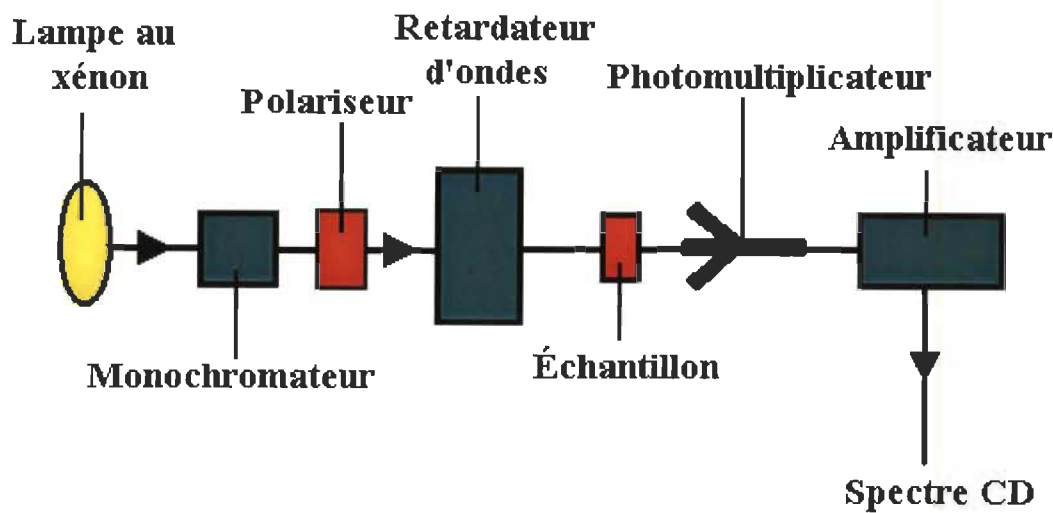


Figure 9. Schéma illustrant le fonctionnement du spectropolarimètre.

Le faisceau de lumière polarisée circulairement ainsi créé atteint le compartiment où se trouve l'échantillon. Après avoir traversé un élément optiquement actif, la lumière polarisée circulairement est modifiée à deux niveaux. Les composantes électriques et magnétiques du faisceau sont encore polarisées circulairement, mais leur magnitude n'est plus la même puisque le coefficient d'extinction molaire de la lumière polarisée à gauche et à droite ne sont pas les mêmes, le milieu étant asymétrique. La lumière est alors polarisée elliptiquement. Il y aura également une rotation de l'axe principal de l'ellipse due aux différents indices de réfraction. Finalement, un détecteur capte le faisceau lumineux qui émerge de l'échantillon. L'ellipticité du faisceau permettra de caractériser le contenu en structures asymétriques de la protéine.

L'appareil mesure ainsi l'asymétrie pour un nombre de longueurs d'ondes données du spectre selon le degré de précision voulu. Les résultats sont présentés sous forme graphique qui représente la différence de coefficient d'extinction en fonction de la longueur d'onde de la lumière.

Le spectropolarimètre utilisé est jumelé à un bain thermostaté et permet de cette façon de suivre l'évolution du contenu en structures secondaires de la protéine au cours du chauffage auquel on la soumet.

CHAPITRE 3 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1. Matériel biologique utilisé

3.1.1. Purification de l'actine

L'actine est extraite à partir de poudre acétonique de muscle squelettique de lapin selon la méthode de Spudich & Watt (1971) modifiée par Nonomura *et al.* (1975). L'extraction de l'actine se fait à l'aide de tampon G et la purification par une série de cycles de polymérisation-dépolymérisation qui permettent d'éliminer les impuretés et les autres protéines liées à l'actine dans le muscle.

- À la poudre acétonique est ajouté du tampon G (Tris 2 mM, CaCl_2 0,1 mM, ATP 1mM, NaN_3 0,2 mM, β -mercaptoéthanol 0,5 mM, pH 7,5) qui permet d'extraire l'actine sous forme monomérique.
- La solution est ensuite filtrée et centrifugée une heure à 40 000 rpm pour éliminer les impuretés qui sédimentent.
- L'actine globulaire est récupérée du surnageant puis polymérisée par 2 mM de MgCl_2 et 0,6 M de KCl.

- L'actine filamenteuse est sédimentée par centrifugation 40 000 rpm x 2 heures (rotor Beckman 70.1 Ti). Le culot d'actine F est dialysé contre du tampon G durant 48 heures à 4°C ce qui dépolymérise l'actine.
- L'actine G est centrifugée à 40 000 rpm x 2 heures (rotor Beckman 70.1 iTi), cette étape permet d'éliminer les protéines dénaturées qui sédimentent.

L'actine est conservée, sous forme globulaire, en dialyse contre du tampon G pour un maximum de 5 jours. Le tampon G est remplacé régulièrement de manière à ce qu'une quantité suffisante d'ATP soit toujours présente, car l'ATP est nécessaire pour que l'actine conserve sa forme native.

L'actine est dosée par spectroscopie à 290 nm. La concentration est calculée à l'aide du coefficient d'extinction de l'actine globulaire : $A^{1\%}_{1\text{cm}} = 6,3$ (Lehrer & Kerwar 1972).

3.1.2. Contrôle de la pureté de l'actine par électrophorèse SDS-Page

La pureté de l'actine est vérifiée par électrophorèse SDS-Page sur un gel ayant une concentration de 12% de polyacrylamide-sulfate dodecyl de sodium. L'étalonnage est effectué avec une série de protéines couvrant une large gamme

de poids moléculaires (Broad Range) de la compagnie BioRad. La révélation des protéines est effectuée au bleu de Coomassie.

À partir du gel d'électrophorèse obtenu avec nos préparations d'actine (présenté à la figure 10), on peut estimer que la pureté de l'actine que nous avons utilisée est supérieure à 95%. Ses propriétés sont conservées à la suite de cette purification, en particulier sa capacité de polymériser et de former des filaments (Bombardier 1995).

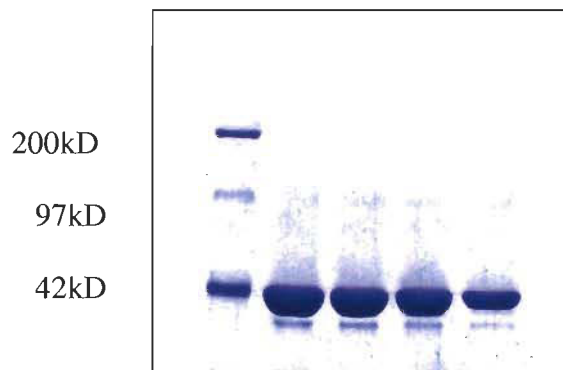


Figure 10. Gel d'électrophorèse SDS-Page de l'actine préparée selon la technique de Spudich & Watt (1971) modifiée par Nonomura *et al.*, (1975). Le premier puits contient une série de protéines servant à l'étalonnage.

3.1.3. Extraction de la viroïsine

La viroïsine a été extraite du champignon *Amanita virosa*, récolté dans le Parc de la Mauricie, selon le procédé décrit par Gicquaud & Turcotte (1983). Nous n'avons pas fait cette préparation, mais avons utilisé de la viroïsine préparée antérieurement dans le laboratoire.

3.2. Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

3.2.1. Description de l'appareil

L'appareil que nous avons utilisé est un calorimètre à conduction de chaleur de marque Hart Scientific. Il contient une cellule de métal qui sert de référence et 3 cellules échantillons. L'appareil peut donc effectuer l'analyse de trois échantillons simultanément.

3.2.2. Préparations des échantillons pour la DSC et conditions expérimentales.

Nous avons fait 4 groupes d'expériences en DSC : les thermogrammes d'actine G seule, d'actine G en présence de viroïsine, d'actine F seule et d'actine F en présence de viroïsine.

- 1) La solution d'actine G est centrifugée 40 000 rpm x 2 heures (rotor Beckman 70.1 iTi) avant chaque utilisation, de façon à éliminer les filaments d'actine et les protéines dénaturées.
- 2) L'actine G est diluée avec du tampon G pour obtenir les concentrations désirées indiquées dans les résultats (de 0,01 à 6 mg/ml).
- 3) Pour les essais d'actine G en présence de viroïsine : la viroïsine est rajoutée en solution concentrée dans le tampon G avec des rapports molaires indiqués dans les résultats (actine : viroïsine allant de 1:0 à 1:3).
- 4) Les préparations d'actine F sont obtenues à partir d'actine G en induisant la polymérisation par 2 mM de MgCl_2 .
- 5) Les essais d'actine F en présence de viroïsine sont effectués en mélangeant d'abord l'actine G et la viroïsine dans le rapport molaire désiré, puis en ajoutant 2 mM de MgCl_2 pour induire la polymérisation.

Tous les échantillons sont tout d'abord dégazés sous pression réduite à l'aide d'une trompe à eau durant 5 minutes pour éviter la formation de bulles durant le balayage de température. Par la suite 900 mg de solution sont déposés dans une cuvette de DSC. On laisse incubé une heure à 25°C pour atteindre l'équilibre thermique et permettre le cas échéant à l'actine de polymériser. La vitesse de chauffe est de 60°C/heure pour toutes les expériences.

3.2.3. Traitement informatique des données

Les thermogrammes sont tracés à partir du logiciel Excel. L'analyse des courbes et la détermination des paramètres thermodynamiques sont effectuées par le logiciel GRAMS.

3.3. Spectrométrie de dichroïsme circulaire

3.3.1. Description du spectropolarimètre

Le spectropolarimètre utilisé est un JASCO J-720. Il est alimenté par une source lumineuse au xénon. L'appareil est calibré avec une solution aqueuse 0,06% (p/v) d'ammonium d-10 camphorsulfonate (Chen & Yang 1977). La cuvette a un parcours optique de 0,01 cm. Le système est chauffé par un bain thermostaté programmable (Neslab RT111).

3.3.2. Préparation des échantillons pour le CD

Nous avons fait en CD les mêmes expériences qu'en DSC c'est à dire que nous avons étudié la dénaturation thermique de l'actine G seule, de l'actine G en présence de viroïsine, de l'actine F seule et de l'actine F en présence de viroïsine, et ceci dans des conditions aussi semblables que celles utilisées en DSC afin de

pouvoir comparer les résultats. Tous les essais ont été faits avec une concentration d'actine de 1 mg/ml et les essais avec la viroïsine avec un rapport molaire de 1 :1.

La solution d'actine G est centrifugée 40 000 rpm x 2 heures (rotor Beckman 70.1 iTi) avant chaque utilisation de façon à éliminer les filaments d'actine et les impuretés résiduelles. La vitesse de chauffe est la même qu'avec le DSC c'est à dire 60⁰C/heure. Cinq spectres sont mesurés pour les longueurs d'onde allant de 178 à 260 nm tous les 5⁰C. Une moyenne de ces spectres est effectuée et c'est sur cette moyenne que sont effectuées les estimations du contenu en structures secondaires de la protéine.

3.3.3. Logiciels de traitement de données.

L'estimation du contenu en structures secondaires de l'actine à partir des spectres CD-UV lointain est effectuée à partir du logiciel CDSSTR. Ce logiciel possède une banque de données de 22 protéines dont la structure secondaire a été résolue par diffraction des rayons X. Le logiciel effectue une estimation du contenu en structures secondaires de la protéine échantillon en comparant son spectre CD à celui des protéines de sa banque de données. Pour ce calcul, le signal mesuré est converti sur la base de la concentration en groupements amide.

La région du spectre de 184 à 260 nm a été utilisée pour effectuer le calcul des structures secondaires. Il est généralement recommandé d'utiliser la zone de 178 à 260 nm. Nos spectres d'actine contenaient dans la région de 178 à 184 nm un ratio signal sur bruit trop faible ce qui rendait les calculs impossibles. Par contre, il est essentiel de débiter le spectre à 184 nm pour que le logiciel soit en mesure de résoudre les équations permettant de déduire le contenu en structures secondaires de la protéine (Manavalan & Johnson 1985).

Un spectre de protéine tronqué à 184 nm permet de résoudre le contenu en 6 types de structures secondaires. Comparativement aux données obtenues par diffraction des rayons X, on obtient une erreur moyenne selon le type de structure secondaire de (Johnson 1999):

Hélices- α : 3,3 %	Hélices 3/10: 2,6 %
Feuillets- β -antiparallèles: 4,2 %	Feuillets- β -parallèles: 2,7%
Coudes: 4,2%	Autres: 5,1%

La température de transition de la réaction de dénaturation thermique est obtenue à partir du graphique de la différence de coefficient d'extinction en fonction de la température à 222nm. Les structures secondaires les plus

abondantes dans l'actine sont les hélices- α et les feuillets- β -antiparallèles. Ce sont aussi ces structures périodiques qui sont le plus modifiées au cours de la dénaturation thermique. C'est pour ces raisons que seules ces deux structures secondaires seront considérées dans l'analyse de nos résultats.

3.4. Mesure de la polymérisation de l'actine par fluorimétrie

La polymérisation de l'actine est mesurée par fluorescence selon la technique de Kouyama & Mihashi (1981) modifiée par Cooper *et al.* (1983). Au cours de la polymérisation l'actine subit un changement de conformation où l'environnement de la cystéine 374 est modifié. Il est possible de fixer sur la cystéine 374 une sonde fluorescente, le pyrène. Lors de la polymérisation, la fluorescence du pyrène augmente d'environ 10 fois. Le pyrène est lié à la cystéine 374, en faisant réagir le N-(1-pyrényl)iodoacetamide avec l'actine.

3.4.1. Préparation de l'actine-pyrène

- L'actine G est tout d'abord dialysée durant 48 heures contre du tampon P (NaHCO_3 1mM, CaCl_2 1mM, ATP 2 mM, pH 7,6) qui facilite la réaction du N-(1-pyrényl)iodoacetamide avec l'actine.

- La concentration d'actine G est ajustée à 1 mg/ml, puis polymérisée par ajout de 0,1 M KCl + 1 mM de MgCl₂, à concentration finale.
- Une solution de 6 mg/ml de N-(1-pyrényl)iodoacetamide dissout dans le diméthylformamide est ajoutée à la solution d'actine F dans un rapport de 7,5 moles de N-(1-pyrényl)iodoacetamide par mole d'actine.
- Le mélange est agité 24 heures pour compléter la réaction. L'actine F couplée à la sonde est concentrée par centrifugation à 40 000 rpm x 2 heures (rotor Beckman 70.1 Ti).
- Le culot est resuspendu dans le tampon A (Tris-HCl 2 mM, CaCl₂ 0,2 mM, ATP 0,2 mM, DTT 0,5 mM, pH 8,0) puis dialysé pour dépolymériser l'actine.
- Après dépolymérisation, les impuretés en suspension sont éliminées de la solution d'actine par centrifugation 40 000 rpm x 2 heures (rotor Beckman 70.1 iTi). Elles se retrouvent dans le culot et l'actine G lié au pyrène dans le surnageant.
- Les molécules de pyrène non-liées à l'actine sont éliminées par chromatographie sur gel de séphadex G-75. Tampon d'élution (Tris-HCl

2 mM, CaCl_2 0,2 mM, ATP 0,2 mM, DTT 0,5 mM, Tris 20 mM et KCl 20 mM, pH 8,0)

Toutes les étapes doivent se faire à l'obscurité pour protéger la sonde de la lumière.

- L'actine-pyrène est dosée en mesurant les absorbances à 290 et 340 nm.

Concentration d'actine (mg/ml) = $(A_{290} - A_{344} \times 0,127) \times 0,63$;
(Kouyama & Mihashi 1981)

3.4.2. Mesure de la polymérisation de l'actine par fluorimétrie

La fluorescence de l'actine non-liée au pyrène est d'abord mesurée, ce qui nous permettra d'établir le 0. Une mesure de la fluorescence de l'actine-pyrène globulaire est ensuite prise. L'excitation de la sonde se fait à 365 nm et la mesure de l'émission de fluorescence à 407 nm. La viroïsine est ajoutée de façon à obtenir une concentration équimolaire à l'actine. Une période d'incubation de une heure à température ambiante est effectuée avant de mesurer l'intensité de fluorescence de la solution. Pour mesurer l'émission de fluorescence de l'actine F, 2 mM de MgCl_2 sont ajoutés à une solution d'actine-pyrène globulaire. Une période d'incubation de une heure à température ambiante permet la polymérisation

complète de l'actine. Pour tous les échantillons utilisés en fluorimétrie la concentration d'actine utilisée est de 0,2 mg/ml.

3.5. Viscosimétrie

Une solution d'actine F est plus visqueuse qu'une solution d'actine G car elle contient de longs filaments. On peut mesurer la polymérisation de l'actine par viscosimétrie. La viscosimétrie consiste à mesurer le temps d'écoulement de la solution dans un capillaire calibré.

3.5.1. Préparation des échantillons et mesure de la viscosité

Toutes les solutions déposées dans le viscosimètre sont incubées une heure à 25°C avant la prise des mesures de façon à ce que l'équilibre thermique soit atteint. Un ml de solution d'actine G (1 mg/ml) est déposé dans un viscosimètre et après incubation, le temps d'écoulement de la solution est mesuré toutes les 2 minutes pour une période de 15 minutes. Pour établir l'effet de la viroïsine sur l'actine G, une quantité équimolaire de viroïsine est ajoutée. La viroïsine est ajoutée à l'actine G avant que le mélange ne soit placé dans le viscosimètre et

incubé durant 1 heure. Le temps d'écoulement est mesuré durant une période de 60 minutes.

Pour mesurer la viscosité de l'actine F, 2 mM de $MgCl_2$ sont ajoutés à 1 ml de solution d'actine G, 1 mg/ml. Les lectures du temps d'écoulement sont prises sur une période de 1 heure pour suivre la polymérisation. À cette solution on ajoute ensuite une concentration équimolaire de viroïsine de façon à vérifier son effet sur la viscosité de la solution d'actine F. Des mesures sont prises durant 1 heure. La viscosité spécifique est exprimée par $(T_e - T_s)/T_s$; T_e étant le temps d'écoulement de l'échantillon et T_s , le temps d'écoulement du solvant.

3.6. Microscopie électronique

Les échantillons d'actine sont préparés de la même façon que ceux préparés pour la calorimétrie. Les grilles recouvertes de formvar-carbone sont traitées au plasma-glow afin de les rendre hydrophiles. Une goutte de solution d'actine est déposée sur la grille et le surplus de solution enlevé à l'aide d'un papier filtre. La grille est ensuite colorée négativement avec de l'acétate d'uranyle 1% en solution aqueuse. L'excès de colorant est retiré quelques secondes seulement après son

dépôt sur l'échantillon. Les préparations sont observées à l'aide d'un microscope électronique à transmission Phillips 207. Les concentrations d'actine sont en général assez faibles (0,1 à 0,05 mg/ml) de manière à ce que les différents composants ne soient pas en amas et puissent être distingués sur l'écran.

Les images obtenues sont analysées à l'aide du logiciel Soft Imaging System qui permet de régler la luminosité des photos et d'augmenter le contraste. Il permet aussi de déterminer les dimensions de certaines structures, en particulier de mesurer la largeur des filaments d'actine.

CHAPITRE 4 : RÉSULTATS

En 1983, Turcotte a montré, par viscosimétrie et spectrométrie différentielle, que la viroïsine stabilise l'actine F contre la dénaturation thermique. Cependant les travaux de Turcotte étaient préliminaires et l'effet de la viroïsine sur l'actine n'a jamais été quantifié et caractérisé de façon précise. De plus, Turcotte n'a pas étudié l'effet de la viroïsine sur l'actine G. C'est ce que la calorimétrie différentielle à balayage permettra d'effectuer. Dans un premier temps, nous avons donc étudié, par DSC, l'effet de la viroïsine sur l'actine G et sur l'actine F.

4.1. Étude, par calorimétrie différentielle à balayage (DSC), de l'actine G et de l'actine F en présence et en absence de viroïsine

La concentration de protéine peut avoir un effet sur son processus de dénaturation et par conséquent modifier l'aspect du thermogramme. Avant d'étudier l'effet de la viroïsine sur la dénaturation thermique de l'actine, il importe tout d'abord de voir quel est l'effet de la concentration d'actine sur le thermogramme.

4.1.1. Effet de la concentration de l'actine F sur le thermogramme

La figure 11 représente une série de thermogrammes d'actine F à différentes concentrations. On peut constater que la concentration d'actine F modifie fortement l'aspect du thermogramme.

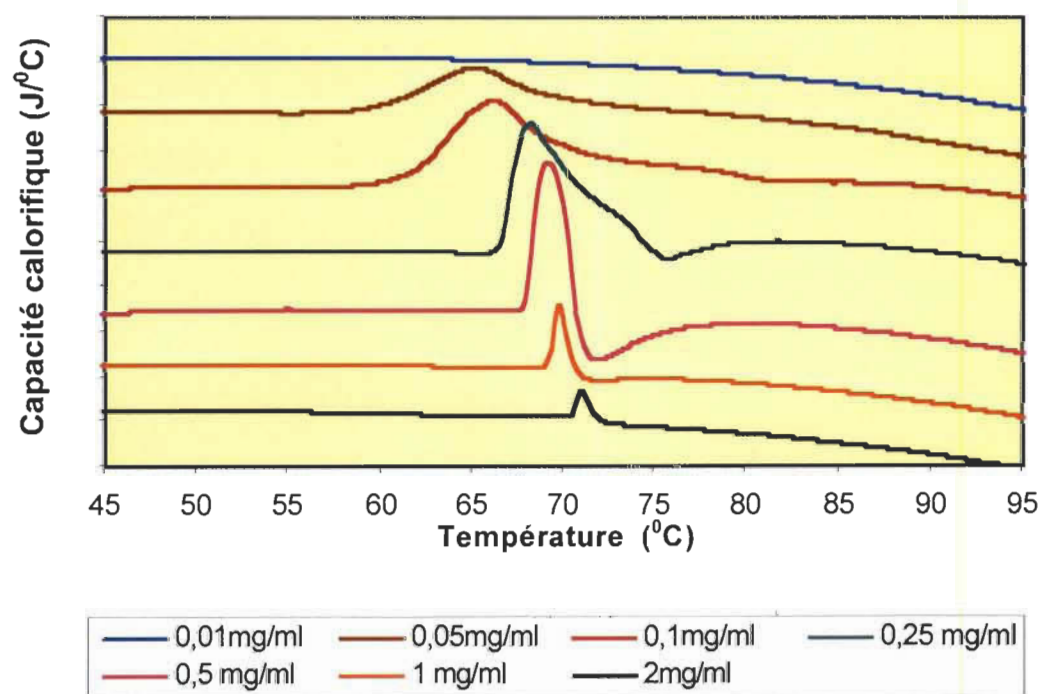


Figure 11. Effet de la concentration d'actine F sur le thermogramme. Capacité calorifique en fonction de la température pour une concentration croissante en actine F. Les intervalles de graduation de la capacité calorifique sont de 0,05 J/°C.

Pour une faible concentration d'actine F, telle 0,01 mg/ml (courbe bleue), le thermogramme est constitué d'un seul pic endothermique dont la hauteur est trop faible pour que la courbe puisse être observable à cette échelle.

Lorsque la concentration d'actine F augmente de 0,05 mg/ml à 2 mg/ml, on observe une augmentation de la T_m de 65 à 69,5°C. L'actine filamenteuse est donc plus stable lorsqu'elle est à forte concentration. Il existerait donc certaines interactions entre les filaments, qui rendraient la protéine à forte concentration, plus résistante à la dénaturation thermique.

Le déplacement de la T_m n'est pas le seul changement induit sur le thermogramme par une augmentation de la concentration d'actine F. En effet, pour des concentrations supérieures à 0,1 mg/ml d'actine, la dénaturation de l'actine se fait en 2 phases : une phase endothermique qui correspond au processus de dénaturation lui-même, et une phase exothermique. Cette réaction exothermique est probablement le résultat de la précipitation de la protéine dénaturée. La précipitation de la protéine dénaturée peut être observée à l'œil nu.

En effet, une solution d'actine F à concentration supérieure à 0,1 mg/ml montre un précipité après avoir été chauffée.

Les thermogrammes de l'actine F à 1 mg/ml (courbe orange) et à 2 mg/ml (courbe noire), montrent que pour de fortes concentrations d'actine F, il y a diminution de l'aire sous le pic de dénaturation. L'aire sous la courbe de dénaturation représente l'enthalpie de dénaturation, soit la chaleur fournie pour permettre la dénaturation. Plus il y a de protéines en solution, plus cette valeur devrait être élevée. C'est le phénomène inverse qui est observé pour la dénaturation de l'actine F.

Une hypothèse qui peut être émise pour expliquer ce phénomène, est que la diminution de l'aire sous la courbe n'est pas due à une diminution de l'enthalpie de la dénaturation, mais plutôt à la superposition des réactions de dénaturation et de précipitation.

La superposition des réactions endo et exothermiques qui se produit lorsque l'on augmente la concentration d'actine est bien illustrée à la figure 12. Ce graphique représente les valeurs de T_m en fonction de la concentration d'actine F pour les réactions de dénaturation et de précipitation.

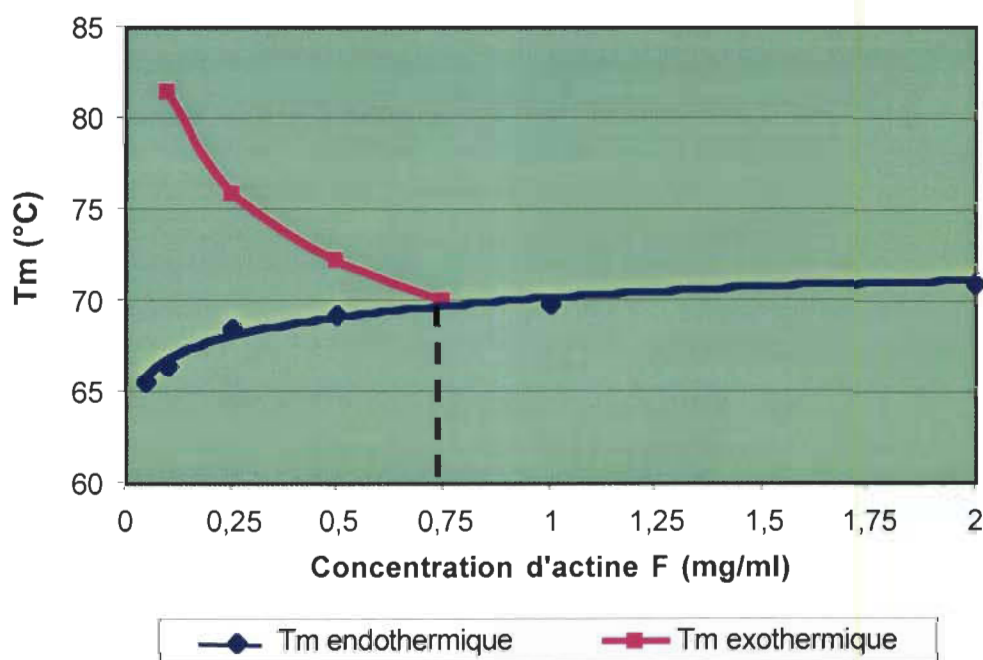


Figure 12. T_m des réactions endothermiques et exothermiques en fonction de la concentration d'actine F.

Le graphique montre qu'il y a superposition des T_m de dénaturation et de précipitation pour des concentrations d'actine F supérieures à 0,75 mg/ml. Les thermogrammes obtenus pour des concentrations supérieures sont donc le

résultat de la somme de deux réactions. Les thermogrammes d'actine F 1,0 et 2,0 mg/ml présentés à la figure 11, correspondent donc à l'addition des réactions endo- et exothermiques de la dénaturation de l'actine F.

Pour vérifier cette hypothèse, selon laquelle la diminution de la hauteur du pic est due à l'addition des réactions endo et exothermiques, nous avons utilisé un détergent, le désoxycholate. En présence de désoxycholate, les réactions de dénaturation et de précipitation sont bien séparées.

4.1.2. Effet de l'acide désoxycholique sur le thermogramme de l'actine F

La figure 13 montre les thermogrammes de l'actine F seule et de l'actine F en présence de désoxycholate 0,1%. On peut constater sur cette figure que le désoxycholate modifie le thermogramme de l'actine F:

- Pour une concentration d'actine F de 0,5 mg/ml, mise en présence de désoxycholate 0,1%, il y a diminution du T_m de la réaction endothermique, et la réaction exothermique ne se produit pas tout de suite.

En conséquence, l'aire sous le pic de dénaturation est augmentée de manière importante et passe de 300 mJ pour l'actine F seule, à 510 mJ pour l'actine F (0,5mg/ml) en présence de désoxycholate.

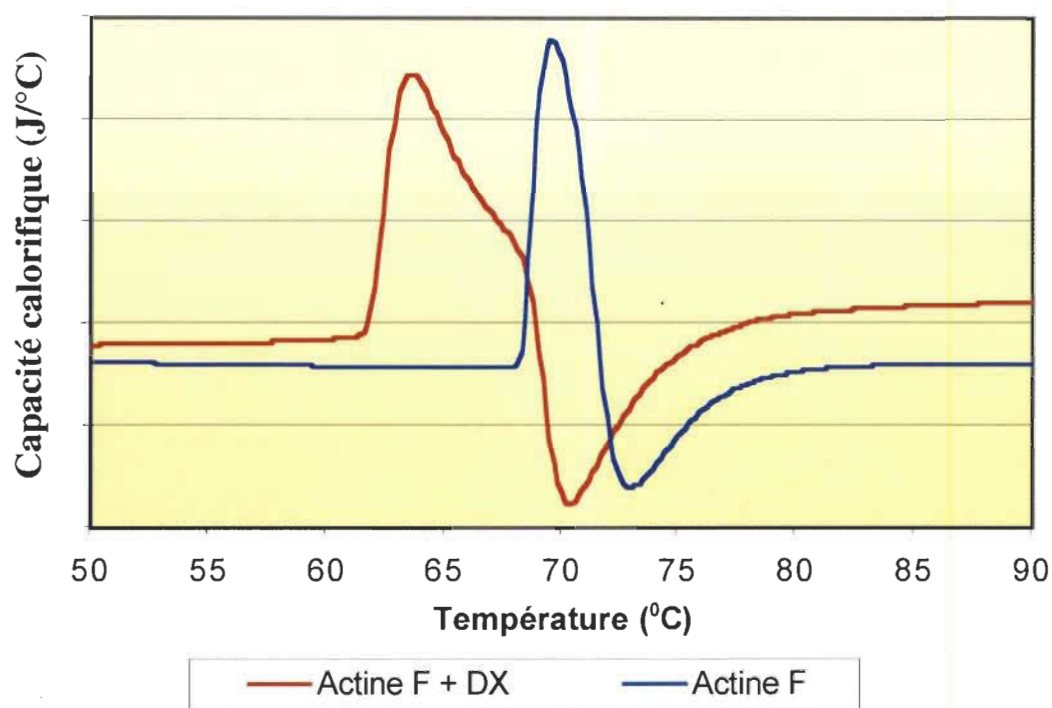


Figure 13. Thermogrammes de l'actine F, 0,5 mg/ml, en présence et en absence de désoxycholate 0,1%. Les intervalles de graduation de la capacité calorifique sont de 0,05 J/°C.

Le graphique à la figure 14 présente la T_m des réactions endo- et exothermiques, en fonction de la concentration en actine F, en présence et en absence de désoxycholate. On peut constater sur ce graphique que la superposition

des réactions endo et exothermique est retardée par le désoxycholate. Le point de rencontre des deux T_m passe de 0,75 à plus de 1,5 mg/ml.

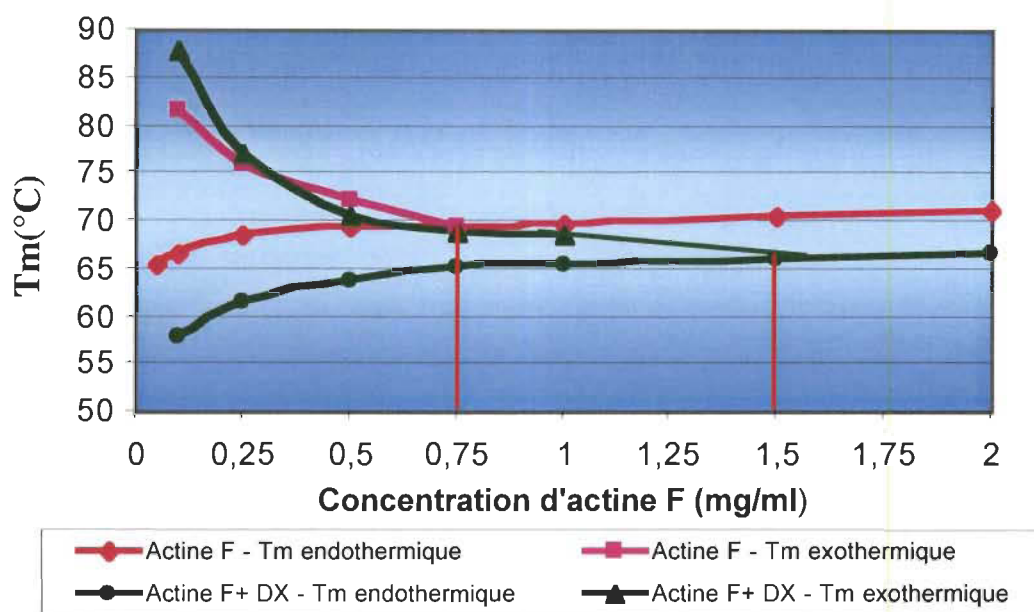


Figure 14. T_m de la réaction de dénaturation (endothermique) et de la réaction de précipitation (exothermique) en fonction de la concentration d'actine F, en présence et en absence de désoxycholate (0,1 %).

Le désoxycholate s'avère donc être un outil intéressant pour étudier la dénaturation des protéines par DSC, car il retarde la précipitation de protéines dénaturées et par conséquent, sépare les pics de dénaturation et de précipitation du thermogramme, ce qui permet d'étudier les deux phénomènes séparément. Comme de nombreuses protéines précipitent au cours de leur dénaturation,

l'utilisation du désoxycholate présente un grand intérêt, entre autre pour étudier l'actine F, mais également d'autres protéines. Les résultats obtenus confirment notre hypothèse, selon laquelle il n'y a pas de diminution de l'enthalpie de dénaturation lorsque la concentration de l'actine F augmente. La diminution de l'aire sous la courbe des thermogrammes est due à la superposition des pics de dénaturation et de précipitation de la protéine.

4.1.3. Étude par DSC de l'effet de la viroïsine sur l'actine F

Dans une deuxième étape, nous allons étudier et quantifier l'effet de la viroïsine sur l'actine F. Rappelons que la viroïsine est reconnue pour stabiliser l'actine F, mais que cette interaction n'a jamais été quantifiée.

La figure 15 présente les thermogrammes de l'actine F, 1 mg/ml en présence de concentrations croissantes de viroïsine. Le thermogramme de l'actine F (1 mg/ml) en absence de viroïsine est représenté sur le graphique par la courbe noire. La T_m du pic de dénaturation est de 70°C et est immédiatement

suivie par une réaction exothermique qui correspond à la précipitation de la protéine. Les thermogrammes suivants sont ceux de l'actine en présence de concentrations croissantes de viroïsine. La viroïsine modifie l'aspect du thermogramme de l'actine F. La T_m augmente en fonction de la concentration en viroïsine. Elle passe de 70°C pour l'actine F seule à 82°C pour l'actine F en présence d'un rapport molaire actine : viroïsine de 1 : 0,5. De plus, la hauteur du pic diminue avec l'augmentation de la concentration en viroïsine.

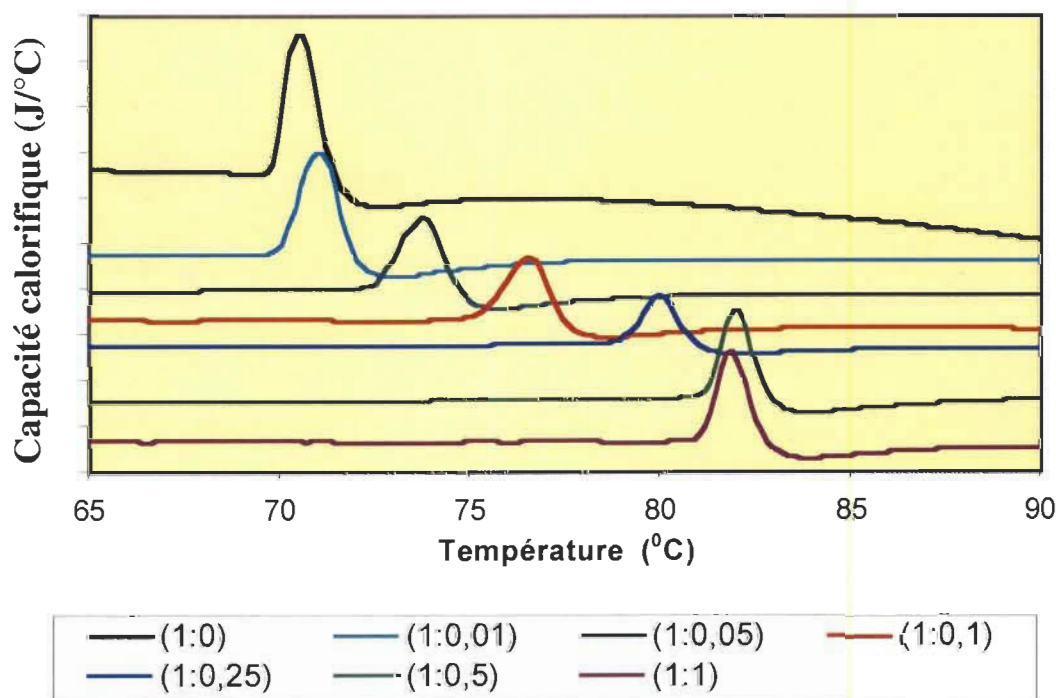


Figure 15. Thermogrammes de l'actine F (1 mg/ml) en présence d'un rapport molaire actine : viroïsine croissant. Les intervalles de graduation de la capacité calorifique sont de 0,05 J/°C.

Sur cette figure, nous pouvons constater que l'actine est sensible à de très faibles concentrations de viroïsine. La viroïsine a un effet sur le thermogramme pour des rapports molaires actine : viroïsine aussi faibles que 1 : 0,01. La viroïsine a donc beaucoup d'affinité pour l'actine F. La liaison d'une molécule viroïsine à un monomère d'actine stabilise non seulement le monomère auquel la viroïsine est liée, mais aussi les monomères voisins dans le filament. Si la viroïsine induit une modification de la conformation d'un monomère qui augmente sa stabilité à la chaleur, cette stabilisation est transmise à l'ensemble du filament.

La réaction de dénaturation de l'actine F en présence de viroïsine est suivie par la réaction exothermique, caractéristique de la précipitation de la protéine dénaturée, comme c'est le cas pour l'actine F seule. Par conséquent, la viroïsine n'interfère pas avec le phénomène d'agrégation des molécules d'actine F dénaturées.

La figure 16 présente les valeurs d'enthalpie de l'actine F en fonction de la concentration en viroïsine, on remarque qu'il y a variation de l'aire sous la courbe lorsque l'on ajoute de la viroïsine à l'actine F. L'aire sous le pic diminue lorsqu'on ajoute la viroïsine jusqu'à un rapport molaire actine :viroïsine de 1 : 0,25. Par contre, pour des rapports molaire de 1 : 0,5 et 1 :1, l'aire sous la courbe augmente. Cette variation de l'aire sous la courbe nous paraît plutôt attribuable à la superposition des réactions endo et exothermiques, qu'à une véritable modification de l'enthalpie de dénaturation. Cette superposition de 2 phénomènes rend l'analyse des valeurs d'enthalpie de l'actine F complexe et difficile à interpréter. C'est pourquoi nous parlerons peu de l'enthalpie dans la suite de notre étude.

Le graphique présenté à la figure 16 illustre l'évolution de la température de transition de l'actine F en fonction du rapport molaire viroïsine : actine. Il montre que la valeur de T_m augmente rapidement avec la concentration de viroïsine et atteint un plateau pour un ratio molaire viroïsine : actine de 0,5 : 1. Une molécule de viroïsine stabilise donc 2 molécules d'actine à l'intérieur d'un filament.

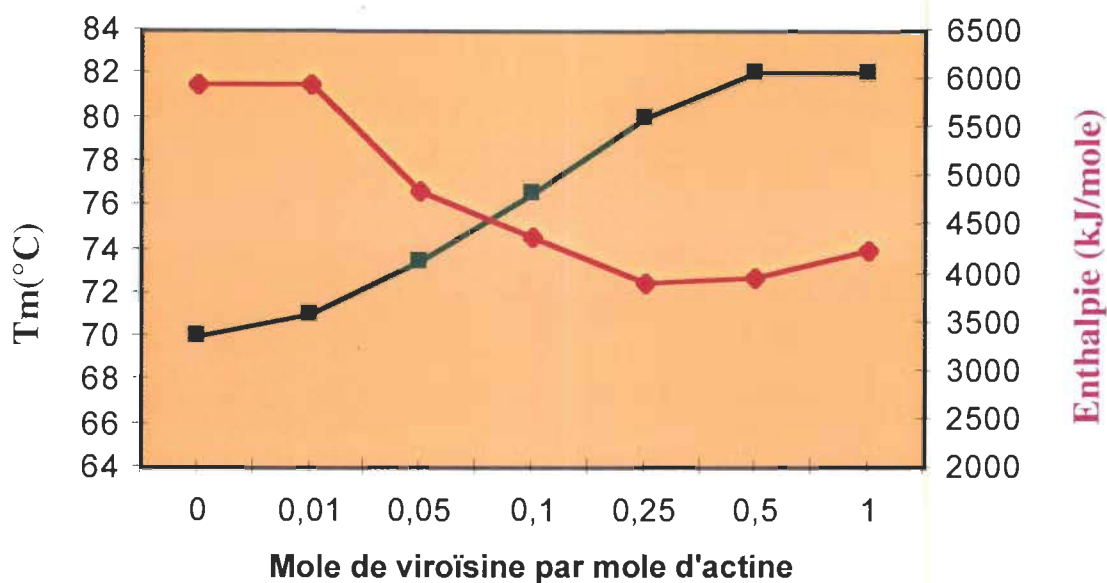


Figure 16. Température de demi-transition (T_m) et enthalpie de l'actine F (1 mg/ml) en fonction du rapport molaire actine : viroisine.

En conclusion, la viroisine se lie avec une forte affinité à l'actine F, qui est alors stabilisée contre la dénaturation thermique. Cette stabilisation augmente avec la concentration de viroisine et atteint un plateau pour un rapport molaire actine : viroisine de 1 : 0,5.

4.1.4. Effet de la concentration d'actine G sur le thermogramme

Dans la section précédente, nous avons étudié l'effet de la concentration d'actine F sur son thermogramme. Ensuite, nous avons quantifié l'effet de la viroisine sur le thermogramme de l'actine F. La même série d'expériences sera effectuée dans cette section-ci, mais cette fois-ci sur l'actine monomérique.

Comme nous avons montré que la concentration d'actine F modifie beaucoup l'aspect du thermogramme, avant de mesurer l'effet de la viroïsine sur l'actine G, nous avons tout d'abord vérifié si la concentration d'actine G a aussi une influence sur le thermogramme. Les thermogrammes de solutions d'actine G de 1 à 6 mg/ml sont présentés à la figure 17.

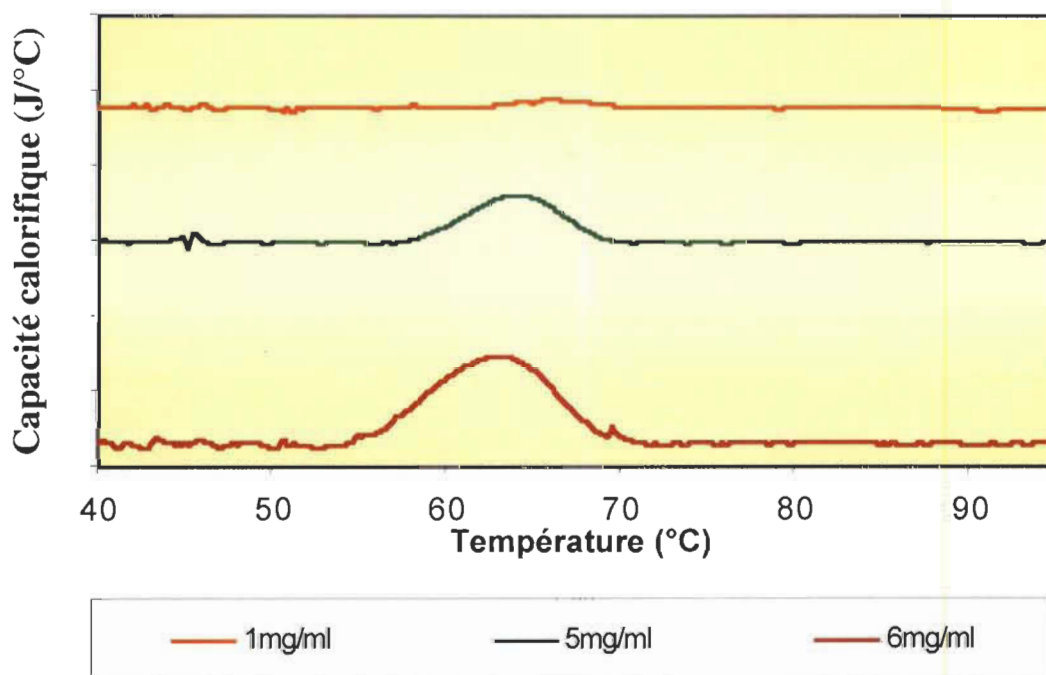


Figure 17. Effet de la concentration d'actine G sur le thermogramme. Capacité calorifique en fonction de la température pour une concentration croissante en actine G. Les intervalles de graduation de la capacité calorifique sont de 0,005 J/°C.

Comparativement à l'actine F, la hauteur du pic, ainsi que l'aire sous le pic de dénaturation sont très faibles pour les solutions d'actine G. Seuls les échantillons dont la concentration d'actine G est d'au moins 1 mg/ml donnent un pic de dénaturation qui soit visible à l'échelle à laquelle le graphique est

présenté. Il est à noter que l'échelle de graduation de la figure 17 qui représente les thermogrammes d'actine G est 10 fois plus faible que l'échelle de graduation de la figure 11 pour l'actine F. À concentrations égales, l'actine G montre donc des pics de dénaturation beaucoup plus petits que l'actine F.

D'autre part, la dénaturation de l'actine G n'est pas suivie par un pic exothermique correspondant à la précipitation de la protéine comme c'est le cas pour l'actine F. Une solution d'actine F devient turbide après avoir été chauffée, en raison de la précipitation des protéines dénaturées. Ce phénomène n'est pas observé pour une solution d'actine G.

Le thermogramme de l'actine G 1,0 mg/ml montre que la T_m est de 64°C. Contrairement à ce qui se passe avec l'actine F, la valeur de T_m ne varie pas avec l'augmentation de la concentration de l'actine G. L'enthalpie apparente de dénaturation de l'actine G est de 5600 kJ/mole et ne varie pas de façon significative avec l'augmentation de la concentration. L'aire sous la courbe est appelée ici « enthalpie » apparente mais la signification de l'aire sous la courbe n'a pas été définie pour un phénomène irréversible. La largeur du pic de dénaturation est très large, pour une concentration de 6 mg/ml $\Delta T_{1/2} = 8,7^\circ\text{C}$. La

réaction de dénaturation est donc un phénomène peu coopératif pour l'actine monomérique, et cette coopérativité varie peu avec la concentration.

4.1.5. Comparaison des thermogrammes d'actine G et d'actine F

Les thermogrammes de l'actine G et F ont un aspect très différent. La figure 18 présente les thermogrammes de l'actine G à 1 et 6 mg/ml et l'actine F 1 mg/ml sur un même graphique pour faciliter la comparaison.

L'actine F a une T_m plus élevée que l'actine G. Elle est de 64°C pour l'actine G et de 70°C pour l'actine F, 1 mg/ml. Ceci peut être expliqué par les forces d'interaction présentes entre les monomères dans le filament qui stabilisent la protéine. La dénaturation se produit donc à une température plus élevée.

Le pic de dénaturation de l'actine G est plus large que celui de l'actine F. Ainsi, pour une concentration d'actine G de 6,0 mg/ml le $\Delta T_{1/2} = 8,7^\circ\text{C}$, alors que pour l'actine F à même concentration à laquelle on a ajouté du désoxycholate (figure 13) pour isoler la dénaturation de la précipitation, le $\Delta T_{1/2}$ est de 4,8°C. La largeur du pic de dénaturation nous renseigne sur la coopérativité de la réaction. La dénaturation de l'actine G est donc un processus

beaucoup moins coopératif que la dénaturation de l'actine F. Au niveau moléculaire, ce phénomène peut s'expliquer par le fait qu'à l'intérieur d'un filament, lorsqu'un monomère est dénaturé, les monomères voisins sont déstabilisés.

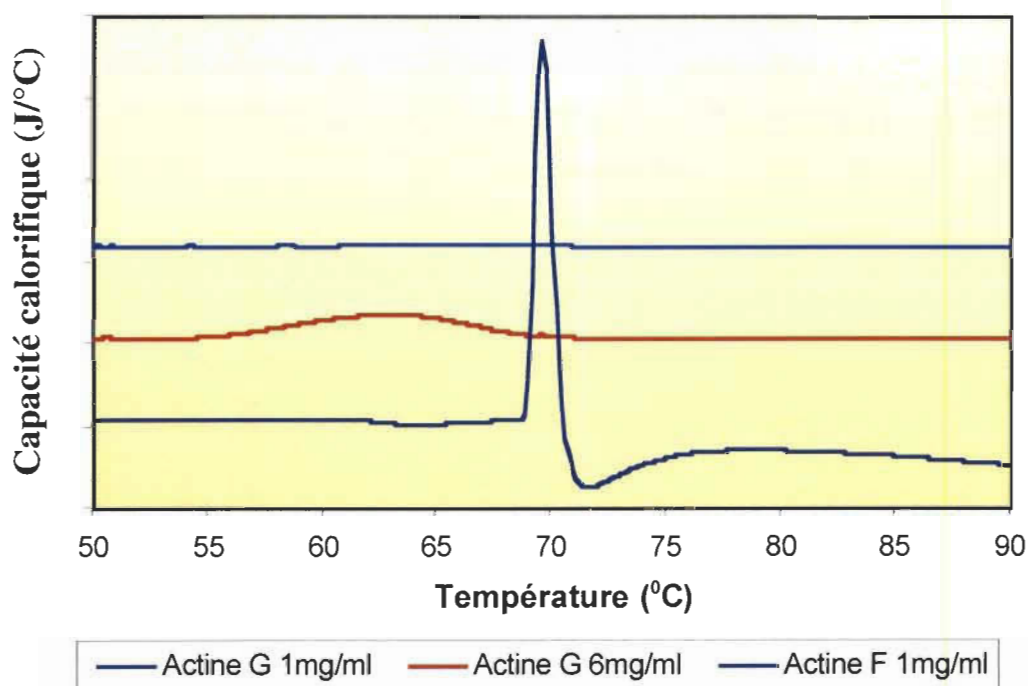


Figure 18. Comparaison des thermogrammes d'actine G (1 mg/ml, 6 mg/ml) et d'actine F (1 mg/ml). Les intervalles de graduation de la capacité calorifique sont de 0,02 J/°C.

L'enthalpie de dénaturation de l'actine G est faible comparativement à celle de l'actine F. Pour l'actine G à 1 mg/ml, l'enthalpie de dénaturation est de 5600 kJ/mole tandis qu'elle est de 29 100 kJ/mole pour l'actine F. Le thermogramme de l'actine F résulte de 2 phénomènes, l'un endothermique,

l'autre exothermique. L'aire sous la courbe ne représente donc pas seulement l'enthalpie de la dénaturation puisqu'une réaction exothermique s'y superpose. Des forces d'interaction sont impliquées dans l'assemblage de monomères à l'intérieur du filament. Ces forces d'interaction augmentent la stabilité du filament. On doit donc fournir davantage d'énergie à l'actine F qu'à l'actine G pour la dénaturer. En plus des forces d'interaction entre les monomères, il y a modification de la conformation du monomère au cours de la polymérisation. Il est possible que ce changement de conformation soit associé à une augmentation des forces d'interaction à l'intérieur même du monomère. Ce changement de conformation résulterait en une augmentation de l'énergie à fournir pour dénaturer le monomère.

Lorsque l'actine G est chauffée et dénaturée, il n'y a aucun précipité visible de formé comme c'est le cas pour l'actine F. Même pour de fortes concentrations d'actine G, 5-6 mg/ml, on n'observe aucune réaction exothermique après la réaction de dénaturation. Ces résultats confirment que le pic exothermique est bien associé à la précipitation.

4.1.6. Effet de la viroïsine sur le thermogramme de l'actine G

Les thermogrammes d'actine G 1 mg/ml, en présence de concentrations croissantes de viroïsine, sont présentés à la figure 19. On peut constater sur cette figure que les thermogrammes de l'actine G sont fortement modifiés par la viroïsine. Il y a donc un effet de la viroïsine sur l'actine G, ce qui n'avait jamais été montré dans les études antérieures effectuées par d'autres techniques.

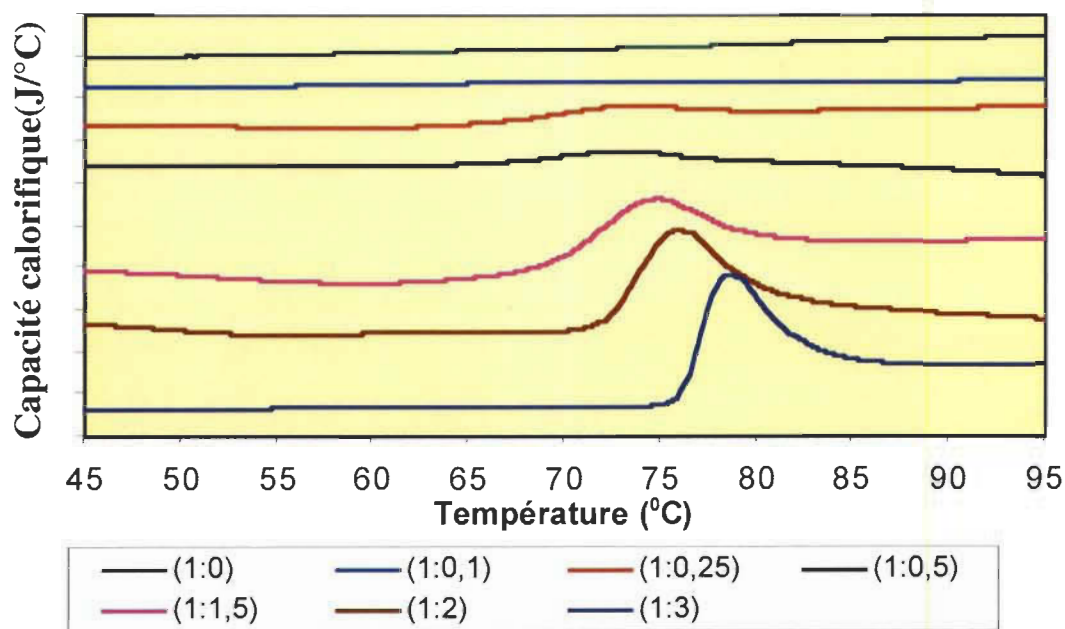


Figure 19. Thermogrammes de l'actine G (1 mg/ml) en présence d'un rapport molaire actine :viroïsine croissant. Les intervalles de graduation de la capacité calorifique sont de 0,05 J/°C.

Lorsque l'on augmente la concentration de viroïsine, il y a augmentation importante de la valeur de la T_m , qui passe de 64°C en absence de viroïsine, à 78°C en présence de viroïsine (rapport molaire actine : viroïsine de 1 : 3). On peut voir, que même pour un rapport molaire actine : viroïsine de 1 : 3, le maximum d'effet de la viroïsine n'est pas atteint.

Par contre, avec l'actine F, la viroïsine a un effet maximum pour un rapport molaire de 1 : 0,5. Cette différence dans la stoechiométrie de la réaction suggère que les mécanismes de stabilisation de l'actine G et de l'actine F par la viroïsine sont différents, au moins au niveau du nombre de sites de liaison de la viroïsine à l'actine.

L'aire sous le pic de dénaturation de l'actine G augmente beaucoup en fonction de la concentration en viroïsine. Le pic devient également plus étroit lorsque l'on augmente la concentration en viroïsine: la réaction est donc plus coopérative. La valeur de $\Delta T_{1/2}$ est de 7,2°C pour l'actine G mise en présence de viroïsine dans un rapport molaire actine : viroïsine de 1 : 0,25 et de 4,3°C pour un ratio de 1 : 3. En présence de viroïsine, la capacité calorifique de l'actine G dénaturée est plus élevée que la capacité calorifique de l'actine non-dénaturée.

Cette augmentation du ΔC_p suggère que la viroïsine agirait sur l'état dénaturé de l'actine G.

La figure 20 présente le graphique de la T_m et de l'enthalpie en fonction du rapport molaire actine : viroïsine. On constate que l'enthalpie de dénaturation augmente avec la concentration de viroïsine passant de 5600 kJ/mole pour l'actine G seule à 29 100 kJ/mole pour un rapport molaire actine : viroïsine de 1 : 3.

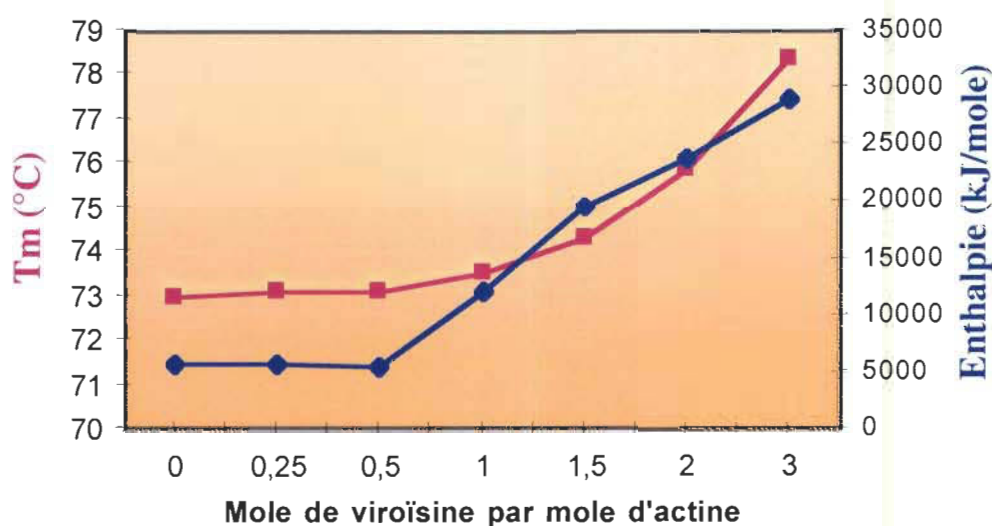


Figure 20. Température de demi-transition (T_m) et enthalpie de l'actine G (1 mg/ml) en fonction du rapport molaire actine : viroïsine.

L'augmentation de la T_m et de l'enthalpie démontre que la viroïsine interagit avec l'actine G et que cette interaction entraîne la stabilisation de l'actine. L'augmentation de la T_m n'atteint pas un plateau comme c'est le cas pour l'actine F, du moins pas pour les concentrations de viroïsine étudiées.

La stabilisation thermique de l'actine G par la viroïsine est un phénomène qui n'avait jamais été montré. Les mécanismes sous-jacents à cette stabilisation sont donc inconnus. Nous pouvons proposer deux hypothèses pour expliquer cette stabilisation:

1^{ère} hypothèse: La viroïsine déplace l'équilibre vers la formation d'actine F

En solution les formes globulaire et filamenteuse de l'actine sont en équilibre dynamique. Ainsi, dans une solution d'actine G, il y a présence d'une très faible proportion de filaments d'actine. Il est donc possible que la viroïsine, en se liant à l'actine F, déplace cet équilibre vers la formation de filaments. De plus, l'augmentation de la température dans le calorimètre déplace l'équilibre actine G- actine F vers la formation d'actine F. Ainsi, à forte température, vers 50°C par exemple, on retrouve plus d'actine F, ce qui favorise encore davantage le déplacement de l'équilibre vers la formation d'actine F. Le Bihan (1993) a déjà émis une telle hypothèse pour expliquer l'action de la phalloïdine sur l'actine G. Le Bihan a proposé que l'actine F ainsi formée, en grande partie par

l'action de la chaleur dans le DSC, interagit avec la phalloïdine. Puisque la phalloïdine ralentit le départ de monomères du filament, la phalloïdine accroît la proportion des filaments en solution. Une telle hypothèse pourrait également expliquer l'action de la viroïsine sur l'actine G, car la viroïsine a une structure semblable et les mêmes effets biologiques que la phalloïdine (figure 21).

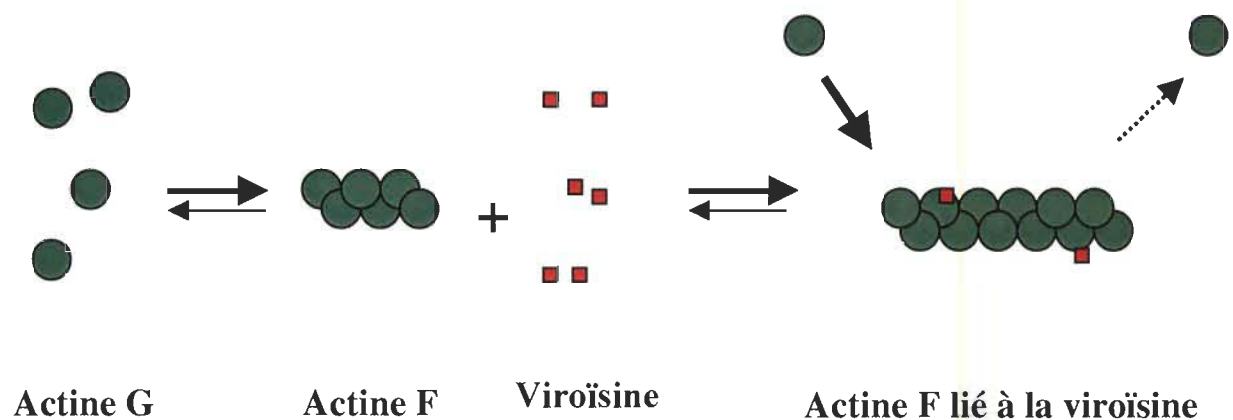


Figure 21. Première hypothèse expliquant le mécanisme d'action de la viroïsine sur l'actine G; la viroïsine déplacerait l'équilibre vers la formation d'actine F.

2^e hypothèse : La viroïsine interagit directement avec l'actine G

Une deuxième hypothèse qui peut être émise pour expliquer la stabilisation thermique de l'actine G observée en DSC implique une action directe de la viroïsine sur l'actine G. Une interaction directe entre la viroïsine et

l'actine G pourrait induire un changement de conformation du monomère, qui rendrait la protéine plus stable à la chaleur sans qu'il y ait de polymérisation, comme illustré à la figure 22. Cette hypothèse va à l'encontre de ce qui est généralement admis dans la littérature, soit que la viroïsine ne se lie qu'à la forme filamenteuse de l'actine.

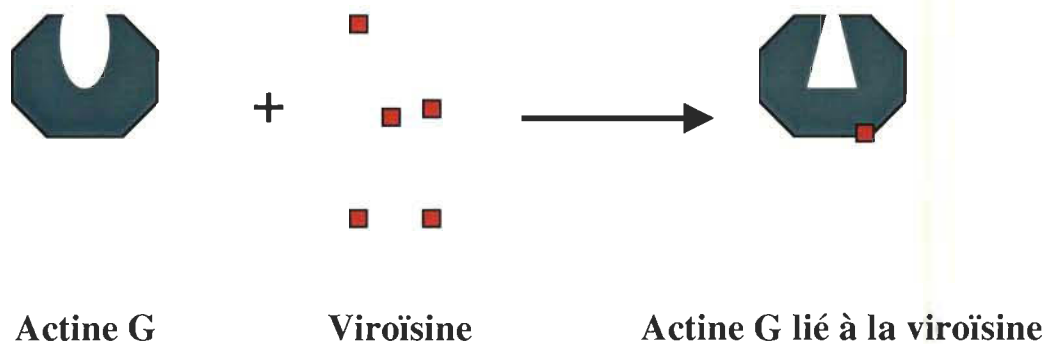


Figure 22. Deuxième hypothèse expliquant le mécanisme d'action de la viroïsine sur l'actine G; la viroïsine entraîne un changement de conformation de l'actine sans qu'il y ait polymérisation.

A priori, la première hypothèse selon laquelle la stabilisation de l'actine G par la viroïsine serait due à un déplacement de l'équilibre vers la formation d'actine F nous paraît moins probable. En effet, les thermogrammes de l'actine F et de l'actine G en présence de viroïsine sont différents, on note en particulier que la T_m de l'actine G en présence d'une quantité équimolaire de viroïsine est

de 73,5°C ce qui ne correspond pas au T_m de l'actine F qui est de 70°C. D'autres aspects du thermogramme sont également différents. Le thermogramme de l'actine G en présence de viroïsine est beaucoup plus large, $\Delta T_{1/2} = 7,6^{\circ}\text{C}$ que le pic de l'actine F $\Delta T_{1/2} = 0,8^{\circ}\text{C}$. De plus, le thermogramme de l'actine G en présence de viroïsine ne présente qu'un seul pic endothermique alors que celui de l'actine F comprend un pic endothermique suivi d'un pic exothermique, dû à la précipitation de la protéine.

Cependant, des différences dans l'aspect des thermogrammes ne suffisent pas pour infirmer ou confirmer ces hypothèses, car il peut y avoir dans la solution une coexistence d'actine F et G, qui rend l'interprétation des thermogrammes difficile. D'autres techniques sont nécessaires pour montrer quelle hypothèse est valable et ceci constitue la deuxième partie de notre travail.

Nous utiliserons en particulier, la viscosimétrie et la fluorescence qui permettent de mesurer la polymérisation de l'actine, la microscopie électronique

qui permet de visualiser les filaments et le dichroïsme circulaire qui renseigne sur la conformation de la protéine.

4.2. Observation, par microscopie électronique, de préparations d'actine en présence et en absence de viroïsine

La microscopie électronique permet d'observer l'organisation des molécules d'actine dans une préparation. Cette technique permettra de voir si la viroïsine modifie l'organisation de l'actine G, en particulier s'il y a formation de filaments.

Pour fin de comparaison, les photographies présentées aux figures 23 et 24 montrent des préparations d'actine G et d'actine F, en absence de viroïsine, colorées négativement par l'acétate d'uranium.

La figure 23 montre l'actine G à une concentration de 0,1 mg/ml. Des monomères d'actine tapissent le fond de cette grille et forment, en certains endroits, des amas. Ces amas ne montrent aucune organisation particulière. La formation de ces paquets de monomères peut être due à la présence de dépressions sur la grille, où les monomères se concentrent lors de l'assèchement de la grille.



Figure 23. Préparation d'actine G (0,1 mg/ml) en absence de viroïsine, observée par coloration négative, 71 000X.

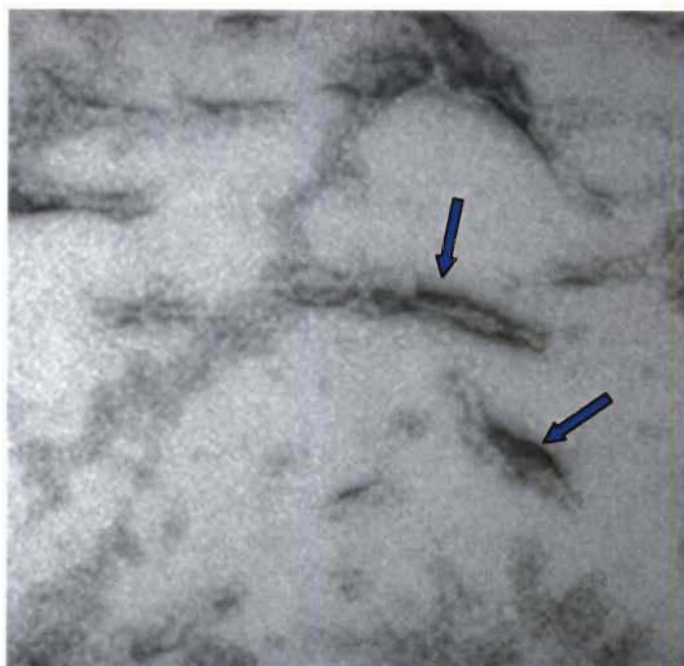


Figure 24. Préparation d'actine F (0,1 mg/ml) en absence de viroïsine, observée par coloration négative, 71 000X.

L'actine F est montrée à la figure 24. L'actine F se présente sous forme de filaments de 7 nm de diamètre. La longueur des filaments est difficile à estimer, car ils sont longs de plusieurs dizaines de microns et s'étendent sur plusieurs carreaux d'une grille. Il s'agit de structures présentant un grand degré d'organisation si on les compare à l'actine G.

À la figure 25, sont présentées les photographies de préparations d'actine G (0,1 mg/ml) auxquelles a été ajoutée une concentration équimolaire de viroïsine. Une première observation qui peut être faite est que la viroïsine modifie l'arrangement des monomères. On peut observer dans ces préparations la formation de plusieurs types de polymères d'actine. Certains de ces polymères sont semblables morphologiquement à l'actine F (flèches vertes, figure 25B). Ces filaments sont rares comparativement à la quantité de filaments que l'on retrouve sur les grilles d'actine F à même concentration. Ces filaments sont en contact avec de nombreux monomères (flèches rouges, figure 25B).

A)



B)

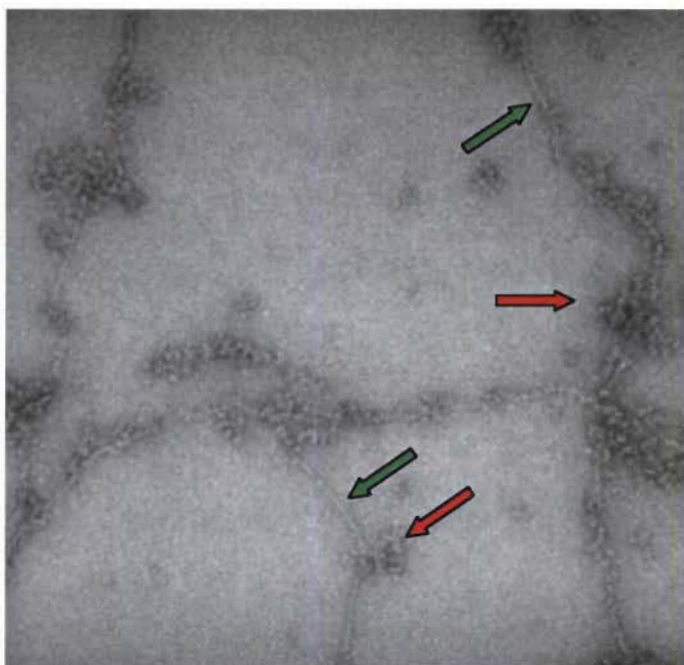


Figure 25. Préparations d'actine G (0,1 mg/ml) en présence d'une quantité équimolaire de viroïsine, observée par coloration négative, 71 000X.

La microscopie ne permet pas de préciser si ces monomères sont physiquement attachés aux filaments ou s'il ont été concentrés autour des filaments lors du séchage de la grille. Cette accumulation de monomères autour des filaments ne se retrouve pas dans une préparation d'actine F. À certains endroits sur la grille, on retrouve d'autres types de polymères présentés à la figure 25 et qui sont très différents de l'actine F. Il s'agit plutôt de courts bâtonnets d'environ 25nm de largeur et de forme irrégulière (flèches bleues sur la figure 25A).

La microscopie ne nous permet pas de savoir si les filaments observés sont de véritables filaments d'actine F, comme ceux que l'on obtient par l'ajout de cations divalents à une solution d'actine G. Cette technique ne peut donc pas à elle seule, répondre aux hypothèses émises pour expliquer la stabilisation thermique de l'actine G par la viroïsine observée en DSC.

La seule conclusion que ces résultats nous permettent de tirer, est que la viroïsine modifie l'arrangement des monomères lorsqu'elle est ajoutée à une solution d'actine G, et qu'il y a formation de quelques rares filaments dont la structure est analogue à celle de l'actine F. L'utilisation d'autres techniques, comme la viscosimétrie et la fluorimétrie nous permettra de déterminer si les structures formées sont bien de l'actine F.

4.3. Mise en évidence de la polymérisation de l'actine par viscosimétrie

La viscosimétrie permet de mesurer la viscosité d'une solution, qui est fonction de l'asymétrie des molécules. C'est une technique simple, qui permet de vérifier si l'actine polymérise en structure filamenteuse, en particulier en actine F. Nous avons utilisé la viscosimétrie pour voir si la viroïsine induit la formation de filaments d'actine.

La figure 26 présente les valeurs de viscosité spécifique obtenues pour l'actine G en présence, et en absence de viroïsine, ainsi que pour l'actine F sans viroïsine. Les valeurs de viscosité spécifique sont de 0,02 pour l'actine G en absence ou en présence de viroïsine, et de 0,71 pour l'actine F. On peut constater que la viroïsine n'augmente pas la viscosité d'une solution d'actine G, donc n'induit pas la polymérisation de l'actine en longs filaments.

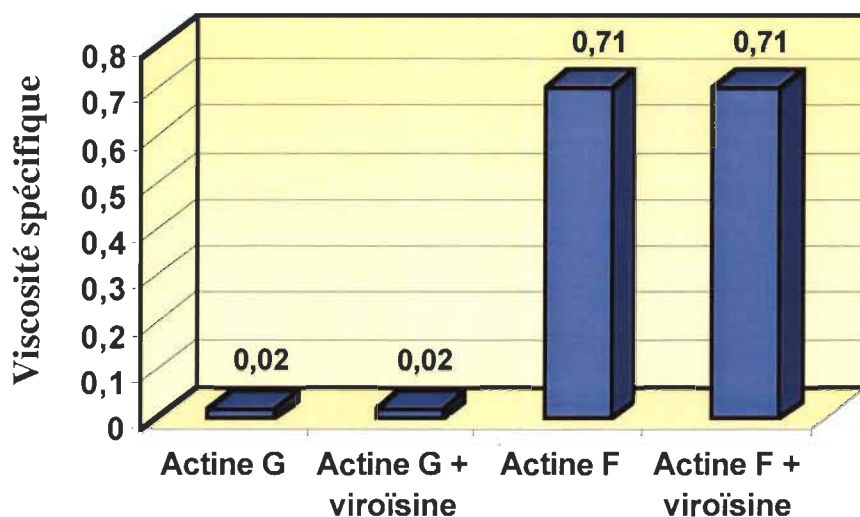


Figure 26. Viscosité spécifique de l'actine G et de l'actine F (1 mg/ml) en absence et en présence d'une quantité équimolaire de viroïsine.

Ce premier résultat va à l'encontre de la première hypothèse, qui propose que la viroïsine entraîne la formation d'actine F. Par contre, il n'infirme pas totalement cette hypothèse car il se pourrait que l'actine polymérise en filaments très courts qui n'entraîneraient pas de hausse de viscosité de la solution.

4.4. Mise en évidence de la polymérisation de l'actine par fluorescence

La structure tertiaire du monomère d'actine est modifiée lorsque la protéine passe de la forme monomérique à la forme filamenteuse. Ce changement de conformation entraîne une modification de l'environnement de la Cys374. Il est

possible de lier à la Cys374 une sonde, le pyrène dont la fluorescence augmente lors de la polymérisation de l'actine. L'actine F marquée au pyrène a une intensité de fluorescence environ de 7 à 10 fois plus intense que celle de l'actine G marquée au pyrène (Kouyama & Mihashi 1981). Cette technique est une technique classique de mesure de la polymérisation de l'actine.

Nous avons comparé l'intensité de fluorescence de l'actine G-pyrène, de l'actine F-pyrène et de l'actine G-pyrène + viroïsine. Les résultats présentés à la figure 27, montrent que l'intensité de fluorescence de la sonde pyrène liée à l'actine F est environ 8 à 9 plus élevée que dans le cas de l'actine monomérique.

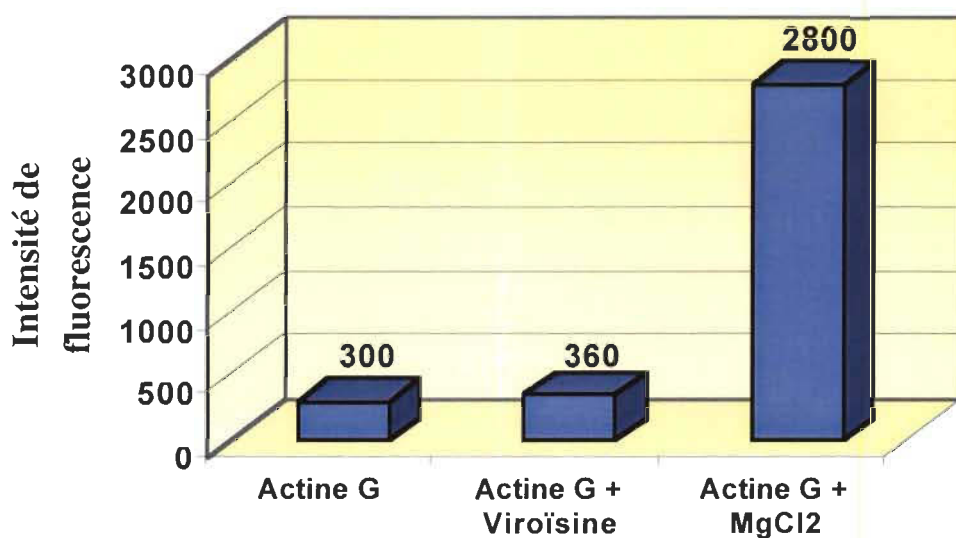


Figure 27. Graphique de l'intensité de fluorescence de l'actine G-pyrène, de l'actine G-pyrène en présence de viroïsine (rapport molaire actine : viroïsine de 1 : 1) et de l'actine G-pyrène + MgCl₂ (ou actine-F-pyrène). Concentration d'actine de 1 mg/ml.

Par contre, l'intensité de fluorescence de l'actine G-pyrène en présence de viroïsine n'est pas significativement différente de celle de l'actine G-pyrène seule. La viroïsine n'induit donc pas la polymérisation de l'actine G en actine F. Nous avons vérifié que la viroïsine ne produit pas de quenching de la sonde pyrène.

L'intensité de la fluorescence est influencée par l'environnement de la sonde liée à la protéine. Puisque l'ajout de viroïsine à l'actine G ne modifie pas de façon significative l'intensité de fluorescence de la sonde, il ne semble pas y avoir de modification de la structure tertiaire de l'actine, du moins pas dans l'environnement de la sonde. Par contre, une modification peut avoir lieu dans le monomère d'actine, sans que cette modification ne soit détectable en fluorimétrie.

Ce deuxième résultat est aussi en contradiction avec la première hypothèse selon laquelle la stabilisation de l'actine G par la viroïsine serait due à la formation de filaments d'actine F. Ce résultat exclue la possibilité que la viroïsine induise la formation de très courts filaments d'actine.

Les résultats obtenus par fluorescence montrent que la viroïsine n'induit pas la formation de monomères dont la structure est caractéristique de l'actine F. En conséquence, l'hypothèse selon laquelle la viroïsine déplace l'équilibre actine G \leftrightarrow actine F vers la formation de filaments, ne peut expliquer l'effet stabilisant de la viroïsine sur l'actine.

4.5. Étude par dichroïsme circulaire, de l'effet de la viroïsine sur la structure secondaire de l'actine

La technique de dichroïsme circulaire va permettre de voir plus en détail les changements de conformation de l'actine, qui peuvent être induits par la viroïsine, à température ambiante, ainsi qu'au cours de la dénaturation thermique.

4.5.1. Étude par CD de l'effet de la viroïsine sur le contenu en structures secondaires de l'actine F

Les spectres CD d'actine F avec et sans viroïsine, à température ambiante, sont présentés à la figure 28. Lorsque la viroïsine est ajoutée à l'actine F, le spectre CD présente de légères différences dans des valeurs du coefficient d'extinction molaire à 190, 210 et 222 nm, longueurs d'ondes caractéristiques des structures secondaires.

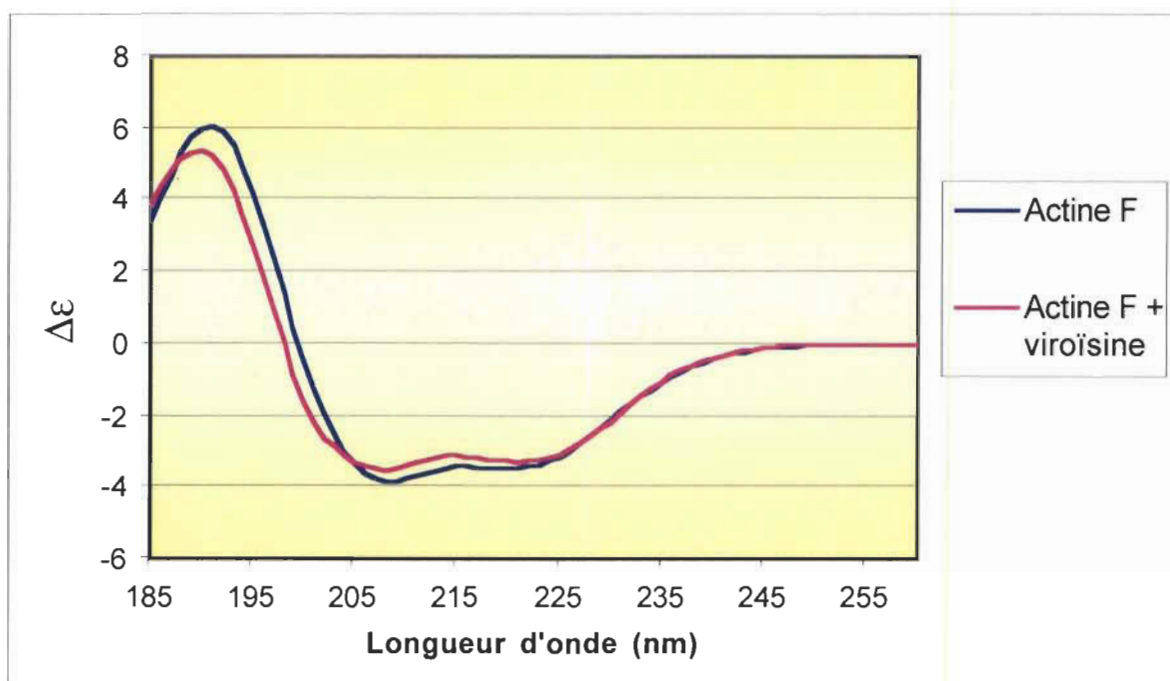


Figure 28. Comparaison des spectres CD de l'actine F (1,0 mg/ml) en absence et en présence d'une quantité équimolaire de viroïsine à température ambiante.

À partir de ces spectres d'actine F, on peut estimer le contenu en structures secondaires pour l'actine F seule, et pour l'actine F en présence de viroïsine. Ces résultats sont présentés dans un tableau à la figure 29. On peut constater sur ce tableau que la viroïsine induit peu de changements de la conformation de l'actine F, du moins au niveau de son contenu en structures secondaires. Après l'ajout de viroïsine, le contenu en hélices- α passe de 30 à 29%, les hélices 3/1 de 6 à 8% et les hélices 3/10 de 8 à 7% ; ces différences ne sont pas statistiquement significatives.

	Actine G	Actine G + viroïsine	Actine F	Actine F + viroïsine
Hélices- α	27%	27%	30%	29%
Hélices 3/10	7%	7%	8%	7%
Feuillets- β	15%	15%	9%	9%
Coudes- β	12%	12%	13%	13%
Hélices 3/1	7%	6%	6%	8%
Autres	33%	33%	32%	34%

Figure 29. Contenu en structures secondaires de l'actine G et F (1 mg/ml) en absence et en présence d'une concentration équimolaire de viroïsine à température ambiante.

On peut donc conclure que l'effet stabilisant de la viroïsine sur l'actine F n'est pas le résultat d'un changement important au niveau de la structure secondaire de la protéine.

4.5.2. Étude par CD de l'effet de la viroïsine sur le contenu en structures secondaires de l'actine G

Les spectres de l'actine G en absence et en présence de viroïsine sont présentés à la figure 30. Aucune différence significative entre les deux spectres ne peut être observée. Le calcul du contenu en structures secondaires présenté à la figure 29, confirme que la viroïsine ne modifie pas le contenu en structures secondaires de l'actine G.

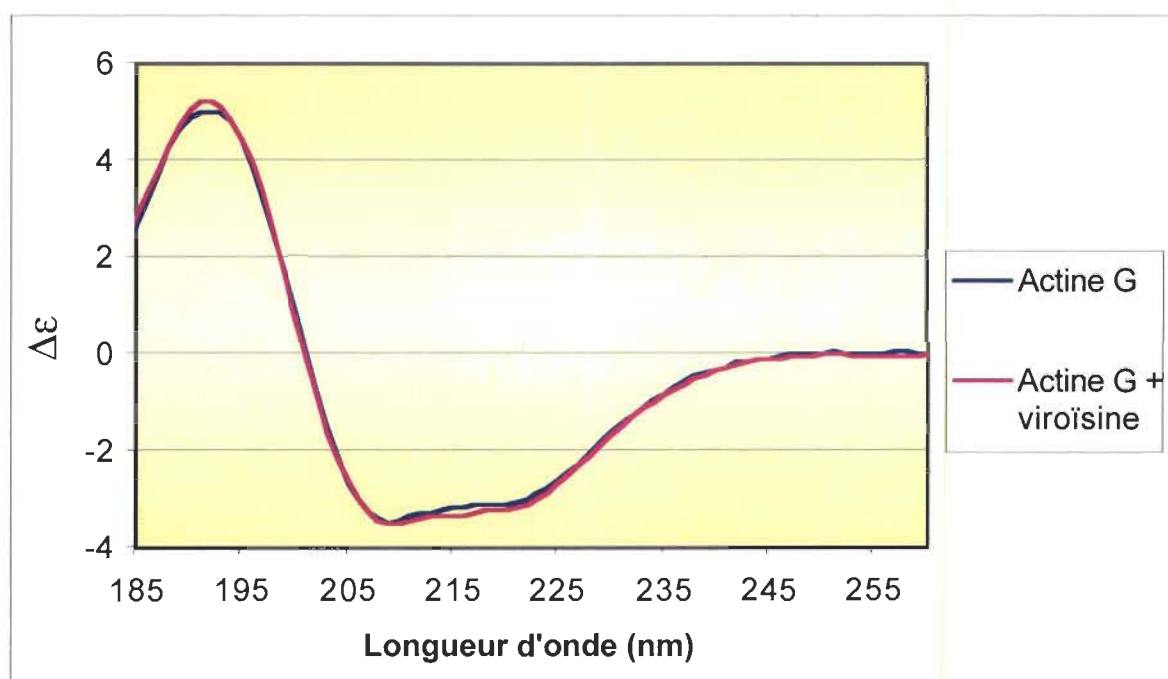


Figure 30. Comparaison des spectres CD de l'actine G (1 mg/ml) en absence et en présence d'une quantité équimolaire de viroïsine à température ambiante.

La viroïsine ne semble donc pas modifier la conformation de l'actine G, du moins pas au niveau de la structure secondaire de la protéine. Ce n'est donc pas une modification du contenu en structures secondaires qui est responsable de la stabilisation thermique de l'actine G par la viroïsine.

La viroïsine ne modifie pas le contenu en structures secondaires, ni de l'actine G ni de l'actine F. Par contre, on peut constater à partir du tableau présenté à la figure 29, qu'il y a une différence importante dans le contenu en feuillets- β de l'actine G et de l'actine F, qui passe de 15 à 9 % au cours de la polymérisation. Le contenu en structures secondaires de l'actine G en présence de viroïsine et de l'actine F est significativement différent.

L'étude du contenu en structures secondaires nous permet de conclure dans un premier temps, que la viroïsine ne modifie pas la structure secondaire ni de l'actine G ni de l'actine F, et dans un deuxième temps, que la viroïsine n'induit pas la formation d'actine F lorsqu'elle se lie à l'actine G, ce qui confirme les conclusions précédentes obtenues par viscosimétrie et fluorimétrie.

4.5.3. Étude par CD de l'effet de la température sur l'actine F en absence de viroïsine

Les spectres CD de l'actine F, tracés pour des températures allant de 25 à 95°C, sont représentés à la figure 31.

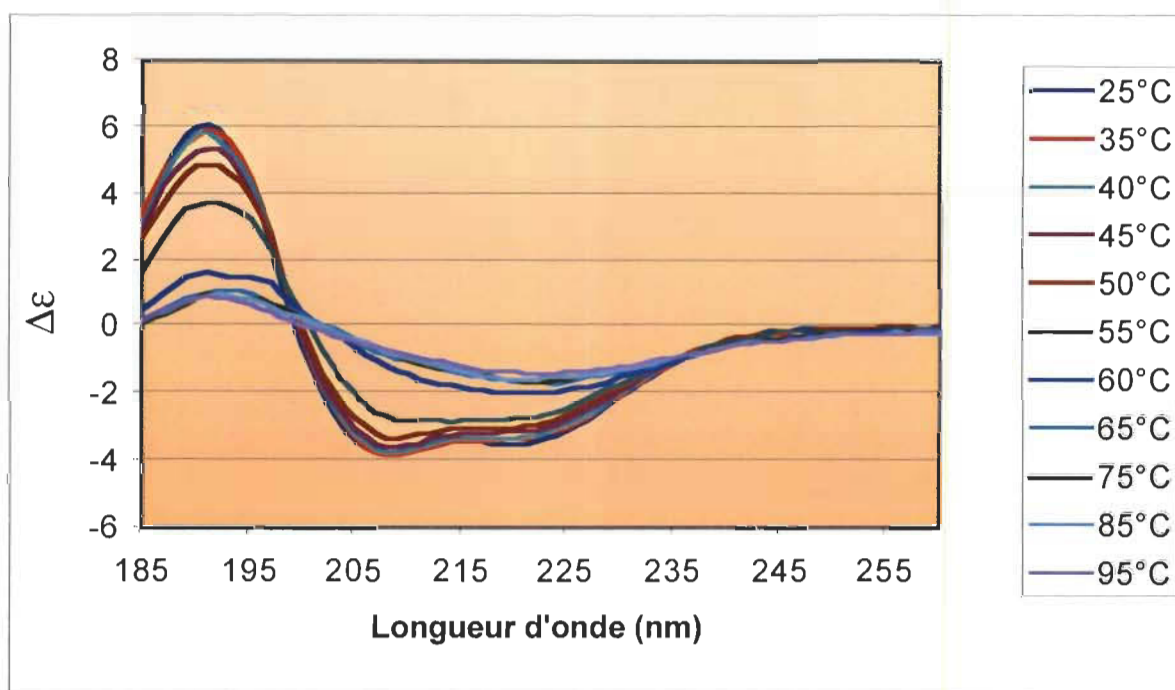


Figure 31. Effet de la température sur le spectre CD de l'actine F (1 mg/ml) en absence de viroïsine.

L'aspect du spectre de l'actine F est modifié lorsque l'on chauffe la protéine. L'intensité des pics à 190, 210 et 222 nm, qui sont caractéristiques de l'absorption des liaisons peptidiques, diminue au cours de la dénaturation

thermique de l'actine F. Le coefficient d'extinction molaire passe de 6 à 0,8 M⁻¹cm⁻¹ lorsque la température augmente de 25 à 95°C, avec une chute drastique du signal CD entre 55 et 60°C, ce qui est dû à une perte de structures secondaires.

4.5.4. Étude par CD de l'effet de la température sur l'actine F en présence de viroïsine

La figure 32 présente les spectres CD de l'actine F en présence de viroïsine pour des températures allant de 25 à 95°C.

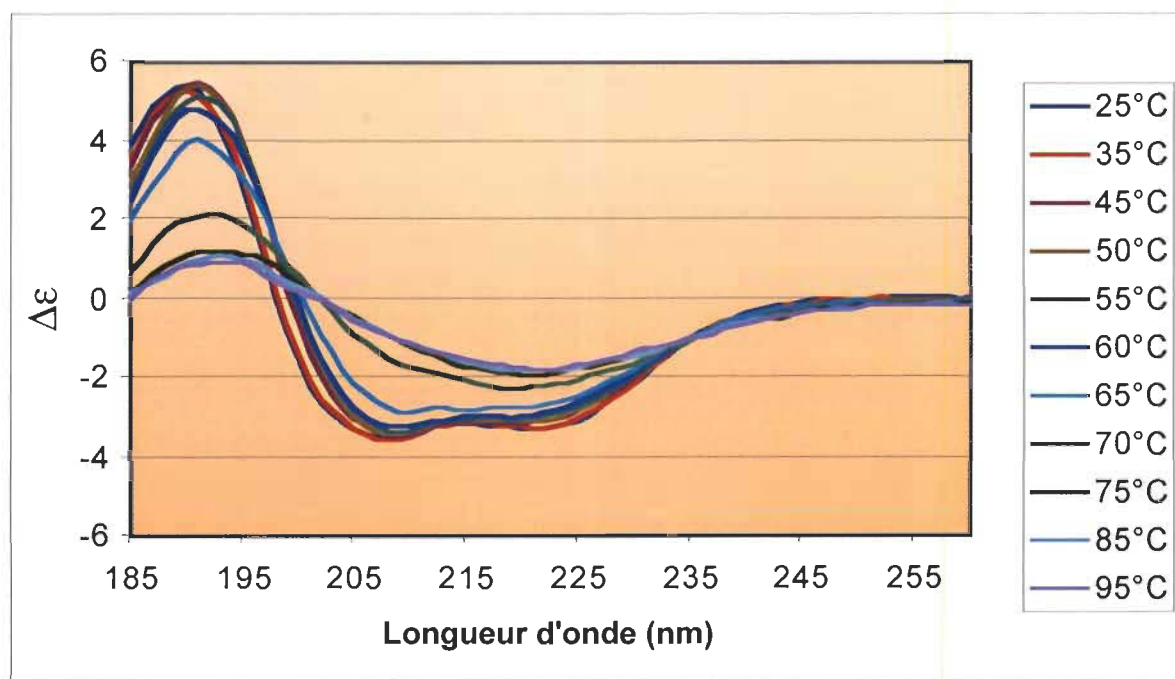


Figure 32. Effet de la température sur le spectre CD de l'actine F (1 mg/ml) en présence d'une quantité équimolaire de viroïsine.

L'intensité des pics à 190, 210 et 222 nm diminue lorsque l'on augmente la température, même en présence de viroïsine. Par contre, la diminution de la valeur de $\Delta\epsilon$ est retardée avec une chute brutale du signal CD entre 65 et 70°C.

Le graphique présenté à la figure 33 permet de comparer la variation du contenu en hélices- α et en feuillets- β de l'actine F, en absence et en présence de viroïsine.

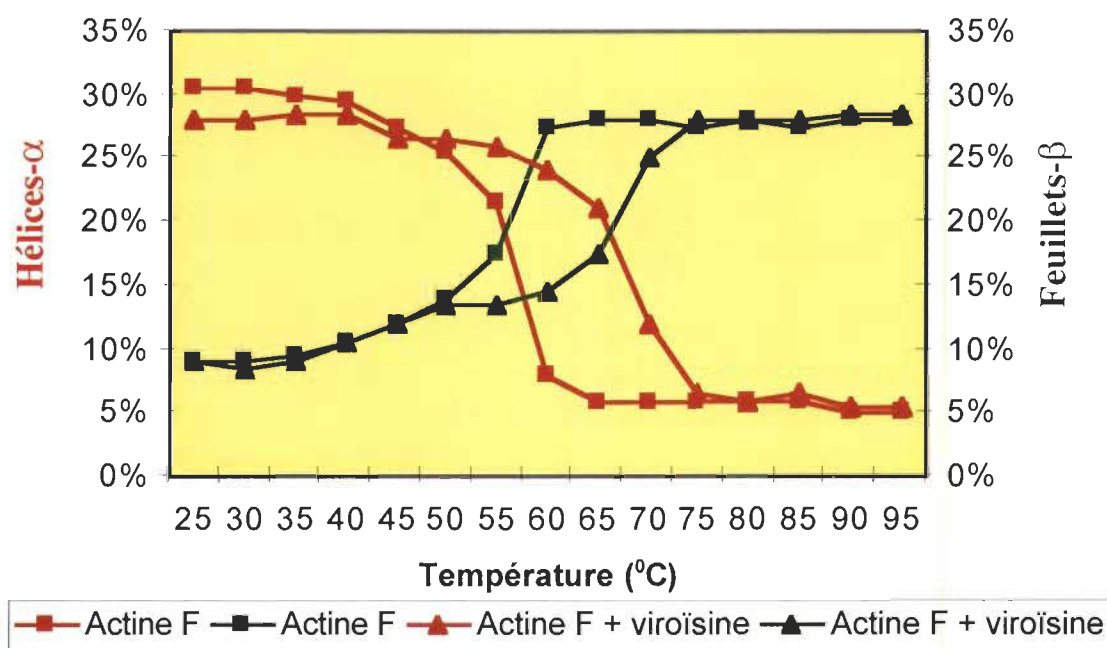


Figure 33. Variation du contenu en hélices- α et en feuillets- β de l'actine F, en présence et en absence d'une quantité équimolaire de viroïsine, en fonction de la température.

Au cours de la dénaturation thermique, la quantité d'hélices- α (carrés rouges) diminue et la quantité de plis- β augmente (carrés verts). L'actine F contient 30% d'hélices- α à température ambiante. Ce contenu en hélices- α subit une chute très marquée entre 55 et 60°C, pour atteindre une valeur de 5 % pour des températures supérieures 65°C.

Par contre, au cours de la dénaturation thermique, le contenu de l'actine F en feuillets- β augmente de 10% à 28% avec une hausse marquée entre 55-60°C. Il ne s'agit pas d'une augmentation nette du contenu de la protéine en feuillets- β , il s'agit de la proportion des feuillets- β présents dans l'actine, par rapport au contenu en structures secondaires périodiques de la protéine qui chute au cours de la dénaturation.

Il n'y a pas de différence significative dans le contenu en hélices- α et en feuillets- β lorsque l'on ajoute la viroïsine, ni dans l'état natif à 25°C ni dans l'état dénaturé à 95°C.

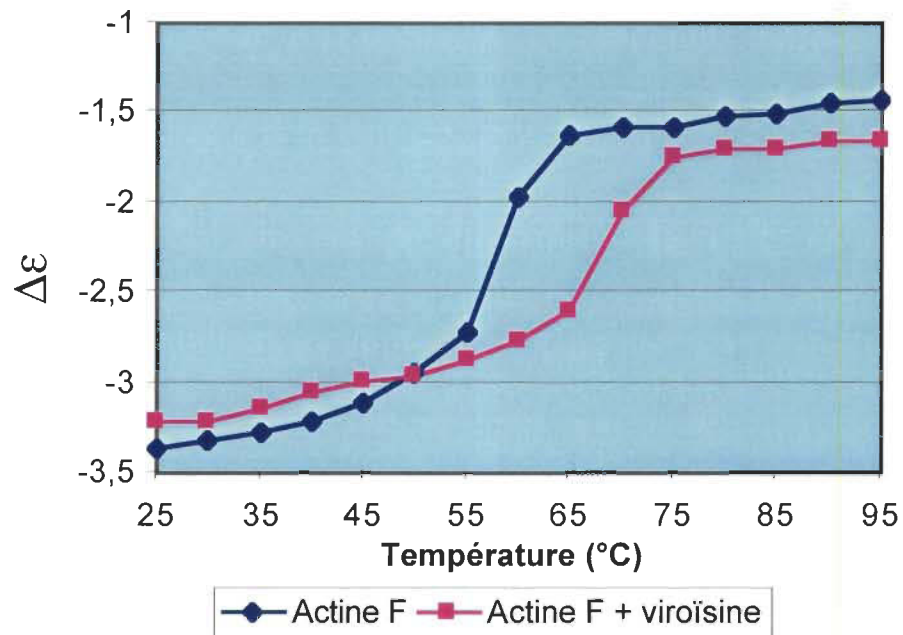


Figure 34. Différence de coefficient d'extinction de l'actine F à 222 nm, en absence et en présence d'une quantité équimolaire de viroïsine, en fonction de la température.

Les valeurs de $\Delta\epsilon$ à 222 nm de l'actine F en absence et en présence de viroïsine en fonction de la température sur un intervalle de températures allant de 25 à 95°C sont présentés à la figure 34. Ce graphique représente la courbe de dénaturation de l'actine F. À partir de celle-ci, on peut estimer que la valeur de T_m est de 58°C en absence de viroïsine et de 68°C en présence d'une concentration équimolaire de viroïsine. À noter que ces valeurs de T_m obtenues

en CD sont différentes de celles obtenues en DSC. Cet aspect sera traité dans la discussion.

Ces résultats obtenus en dichroïsme circulaire, nous permettent de conclure que l'ajout de viroïsine à l'actine F, provoque un déplacement de la T_m de 10⁰C et que cette stabilisation n'est pas associée à une modification de la structure secondaire de la protéine.

4.5.5. Étude par CD de l'effet de la température sur l'actine G en absence de viroïsine

Les spectres CD de l'actine G de 25 à 95⁰C sont présentés à la figure 35. Ces spectres nous permettent de constater qu'au cours de la dénaturation thermique de l'actine G il y a perte graduelle, sans modification brusque, du signal CD aux longueurs d'onde caractéristiques des liaisons peptidiques et donc, du contenu en structures secondaires de la protéine. À partir de ces spectres, on peut tracer le graphique présenté à la figure 37, qui montre la variation en hélices- α et en feuillets- β au cours de la dénaturation thermique de l'actine G.

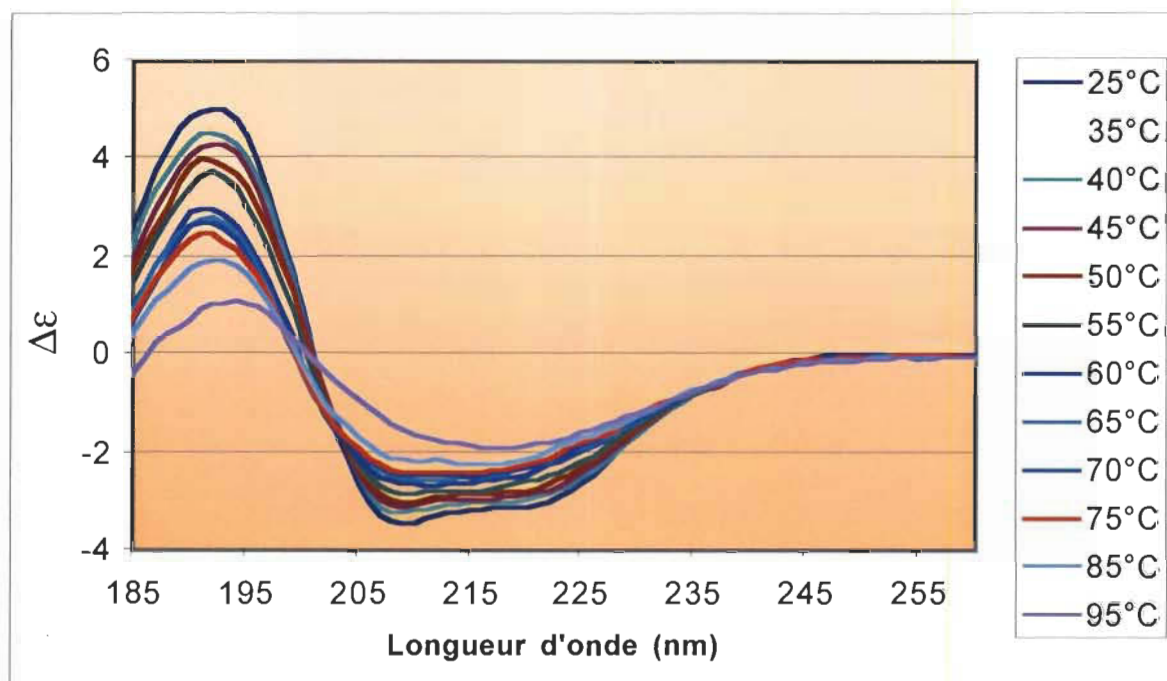


Figure 35. Effet de la température sur le spectre CD de l'actine G en absence de viroïsine.

4.5.6. Étude par CD de l'effet de la température sur l'actine G en présence d'une concentration équimolaire de viroïsine

Les spectres CD de l'actine G, en présence d'une concentration équimolaire de viroïsine, pour des températures allant de 25 à 95°C, sont présentés à la figure 36. Il y a perte du signal CD suivant le même patron que dans le cas de l'actine G seule : la diminution de la hauteur des pics aux

longueurs d'onde caractéristiques des structures secondaires se fait de façon graduelle.

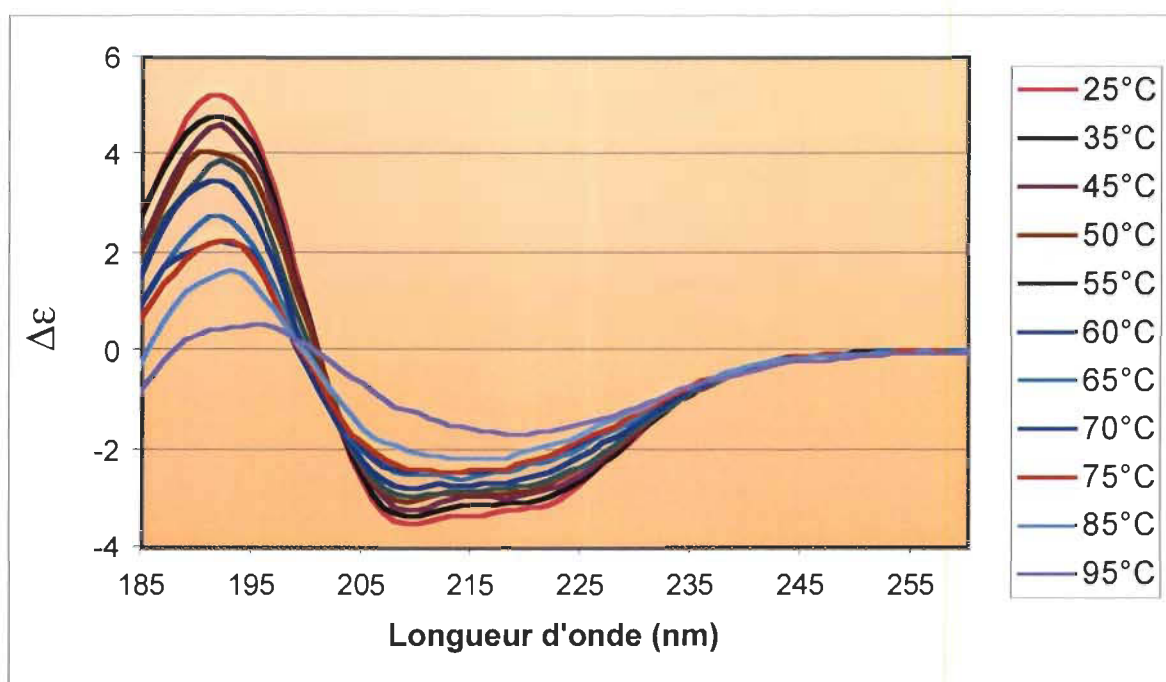


Figure 36. Effet de la température sur le spectre CD de l'actine G (1 mg/ml) en présence d'une quantité équimolaire de viroisine.

L'effet de la température sur le contenu en hélices- α et en feuillets- β de l'actine G, en présence de viroisine, est représenté à la figure 37. Au cours de la dénaturation thermique de l'actine G, aussi bien en absence qu'en présence de viroisine, le contenu en hélices- α passe de 27% à 6% et les feuillets- β de 15% à 28 %. On constate que la variation du contenu en structures secondaires se fait de

façon graduelle : il n'y a pas de variation brusque comme cela se produit au cours de la dénaturation de l'actine F : le phénomène est donc moins coopératif pour l'actine G.

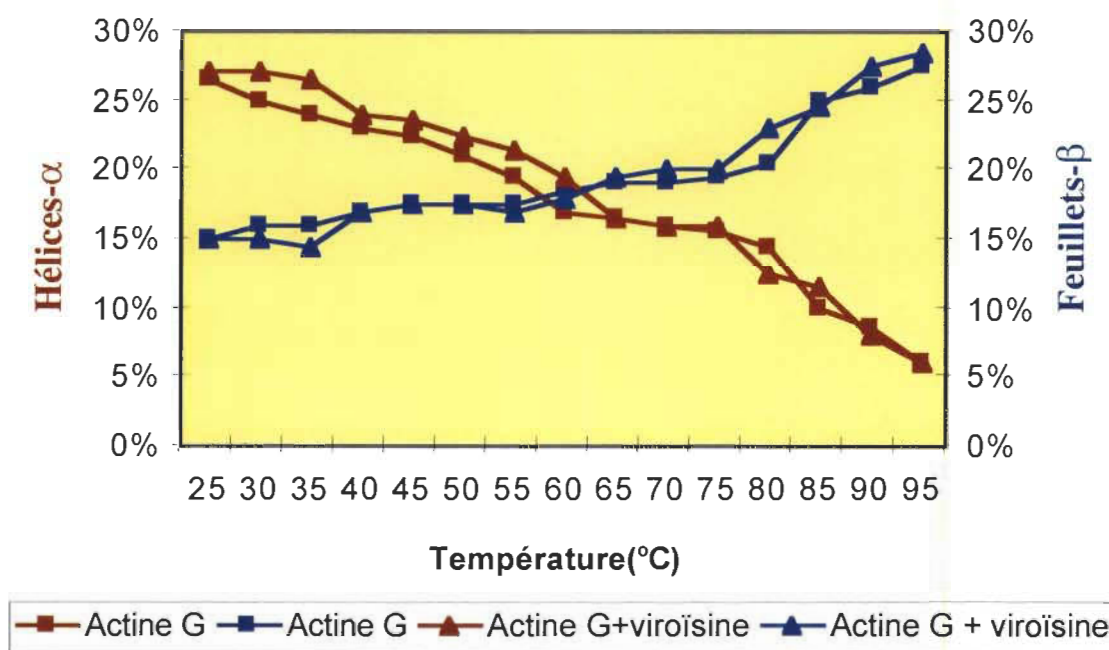


Figure 37. Variation du contenu en hélices- α et en feuillets- β de l'actine G, en présence et en absence d'une quantité équimolaire de viroïsine, en fonction de la température.

La figure 38 représente l'évolution du coefficient d'extinction molaire de l'actine G en absence et en présence de viroïsine à 222 nm dans l'intervalle de températures allant de 25 à 95°C. La variation de $\Delta\epsilon$ en fonction de la température se fait de façon graduelle, sans augmentation ou diminution brutale à une

température donnée. Ceci vient appuyer les données obtenues en calorimétrie, qui montrent que la dénaturation thermique de l'actine G est un processus lent et peu coopératif. La valeur de T_m estimée à partir de la courbe de dénaturation de l'actine G à 222 nm (courbe bleue) est d'environ 56°C. Lorsque l'on ajoute une concentration équimolaire de viroïsine la valeur de T_m est déplacée à 61°C, ce qui correspond à une stabilisation de 5°C.

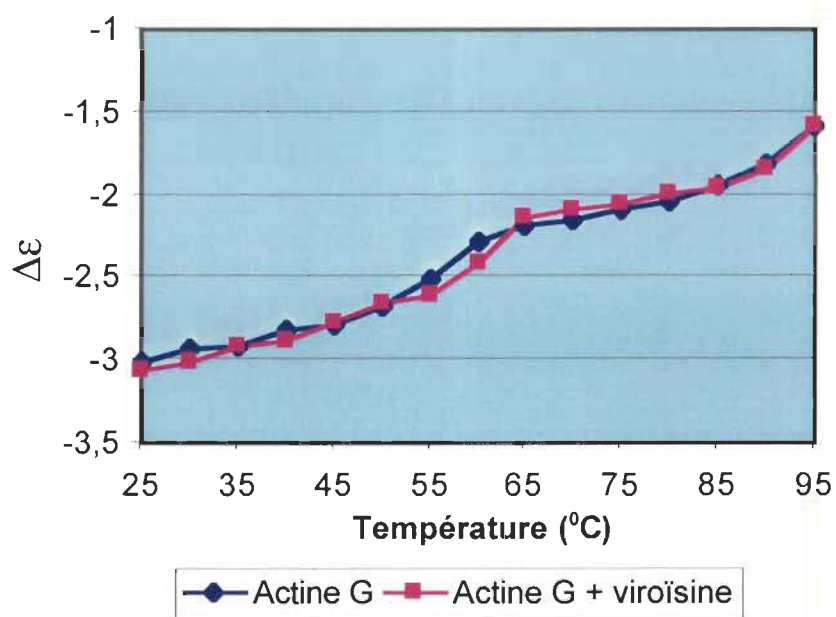


Figure 38. Différence du coefficient d'extinction de l'actine G à 222 nm, en absence et en présence d'une quantité équimolaire de viroïsine, en fonction de la température.

En conclusion, la spectrométrie de dichroïsme circulaire a permis de montrer qu'il n'y a pas de différence significative dans le contenu en structures secondaires de l'actine lorsqu'elle est liée à la viroïsine et ce, que l'actine soit sous forme globulaire ou filamenteuse. Le changement de conformation qui induit la stabilisation de l'actine G et F, ne se produit pas au niveau du contenu en structures secondaires, ou la viroïsine n'induit tout simplement pas de changement de conformation dans le monomère. D'autre part, nos études de dichroïsme circulaire ont montré que la composition en structures secondaires de l'actine G en présence de viroïsine ne correspond pas à celle de l'actine F. Nous pouvons donc conclure que la viroïsine n'induit pas la formation d'actine F.

CHAPITRE 5 : DISCUSSION

5.1. Critique des techniques d'analyse

5.1.1. Calorimétrie différentielle à balayage

Les paramètres thermodynamiques tels l'enthalpie et la T_m obtenus à partir du thermogramme de l'actine doivent être considérés avec une certaine réserve. Ces paramètres ont été interprétés par Privalov (1988) en considérant des équilibres réversibles, comme c'est le cas pour la dénaturation de protéines globulaires de faible poids moléculaire. Comme la dénaturation thermique de l'actine est irréversible, on ne peut appliquer les lois thermodynamiques des équilibres réversibles, et par conséquent les valeurs d'enthalpie et de T_m n'ont pas la même signification.

Les valeurs d'enthalpie et de T_m de l'actine varient en fonction de la vitesse de chauffe. L'estimation de la T_m de l'actine G en DSC varie de 57,2⁰C pour une vitesse de chauffe de 30⁰C/heure (Bertazzon *et al.* 1990) à 80⁰C pour une vitesse de chauffe de 600⁰C/heure (Fausnaugh *et al.* 1984). Cette variation de la T_m en fonction de la vitesse de chauffe s'explique par le fait que la dénaturation de l'actine suit des lois cinétiques (Le Bihan et Gicquaud 1993) et

non les lois de la thermodynamique des systèmes réversibles comme Bertazzon *et al.* (1990) en avaient émis l'hypothèse.

Les résultats présentés dans ce mémoire ont donc une valeur comparative car leur valeur absolue varie avec la vitesse de chauffe. Ceci n'a pas de conséquence sur nos conclusions, puisque nous avons toujours utilisé la même vitesse de chauffe. Nous avons pu montrer grâce à la calorimétrie que la viroïsine déplace de façon significative la T_m de l'actine G et de l'actine F et augmente l'enthalpie de l'actine G. La valeur de ces paramètres est cependant valable seulement pour la vitesse de chauffe que nous avons utilisée soit 60°C/heure.

5.1.2. Dichroïsme circulaire

5.1.2.1. Détermination de la structure secondaire à partir des spectres CD

L'estimation du contenu en structures secondaires de l'actine G que nous avons effectuée diffère des résultats obtenus en diffraction des rayons-X. Par cette dernière technique, il a été montré que l'actine G contient 40% de feuillets- β et 30% d'hélices- α . Le reste des résidus ne forme pas de structures organisées (Kabsch *et al.*, 1990; Kabsch & Vandekerckhove 1992). En dichroïsme circulaire,

nous avons pour notre part déterminé que l'actine G contient 27% d'hélices- α et 27% de structures- β (plis et coudes). Le contenu en structures non-organisées est estimé en CD à 33%, ce qui correspond aux valeurs obtenues en diffraction des rayons X. Seule l'estimation du contenu en structures- β est différente selon que la mesure soit effectuée en diffraction des rayons-X ou en CD.

La différence entre l'estimation en CD et en diffraction des rayons X du contenu en feuillets- β peut s'expliquer de plusieurs façons :

- Notre estimation tient compte des contenus en hélices 3/10 et 3/1 présentés à la figure 29, ces structures composent 14 % de la structure secondaire de l'actine G. Ces structures n'ont pas été considérées dans l'analyse de Kabsch.
- L'actine G doit être associée à une autre protéine pour être cristallisée et étudiée en diffraction, ce qui peut modifier la conformation du monomère.

L'erreur sur l'estimation du contenu en structures secondaires des protéines par CD par la méthode de Johnson (1999) est inférieure à 5% pour chacun des types de structures.

Le contenu en structures secondaires des protéines est estimé à partir de la différence de coefficient d'extinction du faisceau qui traverse l'échantillon. Il est possible que le contenu en feuillets- β de l'actine à l'état dénaturé soit surestimé. En effet, lorsque la protéine se dénature sous l'effet de la chaleur il y a diminution de la compacité de la structure de la protéine à cause des liens hydrophobes qui sont rompus. Les hélices- α sont des structures très compactes qui sont donc très sensibles à la chaleur. Elles peuvent avoir tendance à former des structures moins compactes dont la différence de coefficient d'extinction se confond avec celle des feuillets- β . Ceci résulte en une surestimation des plis- β pour l'état dénaturé de l'actine.

5.1.2.2. Comparaison des résultats obtenus en DSC et en CD

La valeur de la T_m de l'actine que nous avons mesurée n'est pas la même lorsque la mesure est prise en DSC ou en CD. Par exemple, pour un échantillon d'actine F à 1 mg/ml, la température de demi-transition (T_m) en DSC est de 69,5°C alors qu'en CD elle est d'environ 58°C. Plusieurs facteurs peuvent expliquer la différence entre la valeur de T_m estimée en DSC et en CD.

- 1) D'abord cette différence de T_m s'explique par le fait que les 2 appareils mesurent des paramètres différents. Le DSC mesure la chaleur qu'il faut fournir pour dénaturer une protéine. La T_m , correspond à la température à laquelle la moitié des molécules en solution sont dénaturées. Le CD, mesure la variation du contenu en structures secondaires au cours de la dénaturation thermique. La valeur de T_m est estimée à partir de la courbe de dénaturation de la protéine à 222 nm. La valeur de T_m est la température pour laquelle la perte du contenu en hélices- α est de 50%. Si le dépliement des structures secondaires se fait avant le bris des liens fortement énergétiques de la structure de la protéine, la T_m obtenue en CD sera plus faible que la valeur estimée en DSC. Cette explication ne suffit cependant pas à elle seule à expliquer la grande différence de la valeur des T_m .
- 2) Les conditions expérimentales ne sont pas exactement les mêmes en DSC et en CD ce qui peut expliquer, dans une certaine mesure, la différence de T_m obtenue selon les deux techniques. D'abord, les cuvettes de mesure sont différentes. La cuvette du spectropolarimètre a un volume de 100 μ l et celle

du DSC contient 900 μ l. De plus la cuvette de CD est de type capillaire alors qu'elle a en DSC une forme cylindrique. Le rapport surface/volume est donc beaucoup plus élevé en CD. Ainsi, la transmission de la chaleur à l'intérieur de la cuvette se fait plus rapidement à l'intérieur de la cuvette de CD.

- 3) De plus, la vitesse de chauffe n'est pas la même en DSC et en CD. Le DSC permet de maintenir une vitesse de chauffe constante et linéaire de 60⁰C/heure. Par contre, en CD la vitesse de chauffe est plus lente qu'en DSC et n'est pas linéaire. Le spectropolarimètre cesse le chauffage de l'échantillon pour mesurer le coefficient d'extinction à tous les intervalles de 5⁰C. Chaque arrêt du chauffage est d'une durée de 5 minutes environ ce qui ralentit considérablement la vitesse de chauffage. La dénaturation thermique de l'actine, qui obéit à des lois cinétiques est donc influencée par la vitesse de chauffe. Plus la vitesse est rapide plus la valeur de T_m est élevée. La vitesse de chauffe étant plus rapide en DSC cela explique, du moins en partie, pourquoi la valeur de T_m est plus élevée qu'en CD.

5.2. Discussion des hypothèses expliquant la stabilisation thermique de l'actine G par la viroïsine

Hypothèse 1 : La viroïsine déplace l'équilibre vers la formation d'actine F

La première hypothèse émise pour expliquer la stabilisation thermique de l'actine G par la viroïsine, stipule que la viroïsine se lie à l'actine F et déplace l'équilibre vers la formation d'actine F.

En effet, il existe toujours, dans une solution d'actine, un équilibre entre les formes G et F. Même à l'intérieur d'une solution d'actine G, il y a présence d'une très petite quantité d'actine F. De plus, lorsque l'on augmente la température d'une solution d'actine G, il y a augmentation de la concentration critique d'actine, donc formation d'actine F.

Cette hypothèse suggère que la viroïsine interagit avec les quelques filaments présents en solution. La viroïsine a un effet stabilisant sur l'actine F et de plus, Gicquaud et Turcotte (1982) ont montré qu'elle a la propriété d'accélérer la polymérisation de l'actine. Ainsi, l'équilibre entre l'actine G et F en solution serait déplacé vers la forme filamenteuse. Comme l'actine F est plus stable thermiquement que l'actine G, ce déplacement de l'équilibre vers l'actine F expliquerait la stabilisation thermique observée en DSC. Cette hypothèse est

conforme à ce qui est généralement admis dans la littérature, soit que l'interaction de la viroïsine est spécifique à la forme filamenteuse de l'actine (Faulstich *et al.* 1980).

Cependant, il y a des différences importantes entre les thermogrammes de l'actine F seule et de l'actine G en présence de viroïsine. Le T_m de l'actine G en présence d'une concentration équimolaire de viroïsine est de 74°C alors qu'il est de 82°C pour l'actine F, en présence de viroïsine, le pic de dénaturation est beaucoup large pour l'actine G que pour l'actine F et l'enthalpie est aussi plus élevée. Aucune phase exothermique correspondant à la précipitation de la protéine ne suit la réaction de dénaturation de l'actine G contrairement à ce qui se produit pour l'actine F. La stoechiométrie de la réaction de stabilisation de l'actine G et F par la viroïsine est aussi différente. Le maximum de stabilisation est atteint pour un rapport molaire actine F : viroïsine de 1 : 0,5, alors que ce maximum n'est pas atteint pour l'actine G à une concentration 6 fois plus élevée en viroïsine (rapport molaire actine :viroïsine de 1 :3). Cette différence dans la stoechiométrie de la réaction indique que le mécanisme de stabilisation pour l'actine G est différent pour l'actine F, du moins au niveau de nombre de sites de liaisons de la viroïsine. Ces différences dans les thermogrammes, conduisent à la

conclusion que la stabilisation de l'actine G par la viroïsine n'est pas le résultat de sa polymérisation en actine F.

De plus, la viscosité de la solution d'actine G n'augmente pas lorsque l'on ajoute de la viroïsine à la solution, contrairement à ce qui se passe lorsque l'on ajoute des cations divalents qui induisent la formation d'actine F. Il n'y a pas d'augmentation de l'intensité de fluorescence de l'actine G-pyrène lorsqu'on la place en présence de viroïsine contrairement à ce qui est observé au cours de la polymérisation. Ces deux derniers résultats montrent qu'il n'y a pas formation d'actine F lorsque la viroïsine est ajoutée à l'actine G.

Le dichroïsme circulaire a également permis d'infirmer cette hypothèse, puisque le contenu en structures secondaires de l'actine G en présence de viroïsine est différent de l'actine F.

Les résultats que nous avons obtenus en calorimétrie, viscosimétrie, fluorimétrie et dichroïsme circulaire ne sont donc pas en accord avec l'hypothèse selon laquelle la viroïsine déplace l'équilibre vers la formation d'actine F.

Hypothèse 2 : La viroïsine change la conformation du monomère

La deuxième hypothèse émise pour expliquer la stabilisation thermique de l'actine G suggère que la viroïsine se lie directement à l'actine G et induit un changement de conformation du monomère qui est alors plus thermorésistant et ce, sans qu'il y ait polymérisation.

Le CD a permis de montrer que la viroïsine n'induit pas de changement dans la structure secondaire de l'actine G ni de l'actine F. Ainsi, la stabilisation thermique de l'actine G par la viroïsine n'est pas le résultat de changement de conformation de la protéine, comme le propose la deuxième hypothèse, du moins pas au niveau des structures secondaires.

La spectrofluorimétrie a montré qu'il n'y a pas de variation significative de l'intensité de fluorescence de la sonde lorsque la viroïsine est ajoutée à l'actine G. Ce qui suggère qu'aucun changement dans la structure tertiaire de l'actine ne se produit dans l'environnement de la sonde, c'est à dire au niveau de la cystéine 374, lorsque l'actine est mise en présence de viroïsine. On ne peut cependant pas écarter la possibilité qu'une modification de la structure ait lieu dans une région différente. Ces résultats obtenus en fluorimétrie ne nous permettent pas de confirmer notre deuxième hypothèse et de déterminer si un

changement de conformation a lieu dans l'actine G lorsqu'elle est mise en présence de viroïsine.

À la lumière des résultats obtenus par les différentes techniques utilisées, il semble évident que la viroïsine n'induit pas la formation d'actine F comme le propose la première hypothèse

L'hypothèse selon laquelle un changement de la structure de l'actine serait responsable de sa stabilisation thermique par la viroïsine semble plus probable que la première hypothèse qui propose que la stabilisation thermique est le résultat de la polymérisation de l'actine G en actine F. Par contre, aucune technique n'a pu montrer hors de tout doute un changement de conformation de l'actine G lorsqu'elle est placée en présence de viroïsine. Seul le DSC a permis de montrer une action de la viroïsine sur l'actine G.

5.3. Effet de la viroïsine sur l'actine F

Des études antérieures effectuées par Turcotte *et al.* (1984) avaient montré par des techniques assez rudimentaires que la viroïsine avait un effet thermostabilisant sur l'actine F. La technique utilisée à l'époque, la viscosimétrie, ne permettait pas de quantifier cette stabilisation. Les techniques biophysiques disponibles aujourd'hui, nous ont permis de caractériser davantage cette interaction et de mieux comprendre le mécanisme par lequel la viroïsine

agit sur l'actine F. La viroïsine stabilise l'actine F en déplaçant la T_m de 70 à 82°C pour un rapport équimolaire actine : viroïsine. La viroïsine a un effet thermostabilisant sur le filament même lorsqu'elle est présente dans un rapport molaire actine : viroïsine aussi faible que 1 : 0,001 et qui atteint un effet stabilisant maximum à 1 : 0,5. Ce qui démontre un processus particulier d'interaction où une molécule d'actine liée à la viroïsine entraîne la stabilisation de plusieurs monomères environnants dans le filament. Le changement conformationnel induit dans le monomère lié à l'actine pourrait donc être transmis aux autres monomères du filament qui eux ne sont pas liés à la viroïsine.

5.4. Comparaison entre le contenu en structures secondaires de l'actine G et de l'actine F

La valeur du contenu en feuillets- β que nous avons obtenue dans notre analyse en dichroïsme circulaire est supérieure pour l'actine G comparativement à l'actine F. Ce résultat est en contradiction avec certaines études qui ont été faites dans les années 70-80 qui avaient démontré à l'aide de la spectropolarimétrie, que le contenu en structures secondaires ne variait pas au cours de la polymérisation de l'actine (Hegyi *et al.* 1980; Murphy 1971). Les auteurs ne présentent pas dans leur article les résultats qu'ils ont obtenus, ni le

détail des techniques qu'ils ont utilisées pour l'analyse des spectres CD. Il s'avère donc difficile de savoir pourquoi leurs résultats sont différents des nôtres. Par contre, les méthodes d'analyse des spectres se sont beaucoup améliorées depuis, ce qui pourrait, dans une certaine mesure, expliquer la différence entre notre estimation des structures secondaires et celles effectuées préalablement par ces auteurs.

5.5. Phénomène de précipitation de l'actine G et de l'actine F dénaturées

Au cours de la dénaturation thermique de l'actine G il se produit une augmentation relative du contenu en feuillets- β . L'augmentation du contenu en feuillets- β au cours de la dénaturation a été décrite, pour plusieurs protéines, et ce phénomène a été corrélé à un phénomène d'agrégation (Joly 1965 ; Strzelecka-Golaszewska *et al.* 1985). Nos résultats obtenus en CD indiquent donc la possibilité d'une éventuelle agrégation de l'actine G dénaturée. Cependant aucun précipité n'est observable après le chauffage de la solution d'actine G comme c'est le cas avec l'actine F. Il s'agirait donc d'agrégats constitués de dimères ou de trimères ce qui a été reporté par Kuznetsova I. M. *et*

al. (1999). Cette précipitation ne se traduit pas par l'apparition sur le thermogramme de l'actine G d'une réaction exothermique après la dénaturation comme dans le cas de l'actine F, car les agrégats formés sont de petite taille et que la dénaturation se fait de façon très graduelle sur un large intervalle de températures.

5.6. Comparaison de l'effet de la viroïsine et de la phalloïdine sur l'actine.

Le mode d'action de la phalloïdine sur l'actine a été davantage étudié que celui de la viroïsine. Dans le cas de la phalloïdine, il a été établi (Coluccio & Tilney 1984) que la toxine, qui se lie au filament, empêche le départ de monomères qui se produit normalement dans le phénomène de treadmilling. Ceci aura pour conséquence l'allongement du filament d'actine lié à la phalloïdine.

Les résultats que nous avons obtenus ne nous permettent pas d'affirmer que la viroïsine a le même effet sur l'actine F que la phalloïdine. Mais compte tenu de la similitude de leurs structures, ceci paraît fort probable.

CHAPITRE 6 : CONCLUSIONS

La DSC a permis de montrer que la viroïsine a un effet thermostabilisant sur l'actine F et G. La viroïsine se lie à l'actine globulaire et la stabilise en augmentant la température de transition et l'enthalpie de dénaturation. Aucune interaction entre la viroïsine et l'actine G n'avait été démontrée jusqu'à maintenant.

Lorsque l'on compare les thermogrammes de l'actine F et de l'actine G en présence de viroïsine, certains aspects indiquent que la stabilisation n'est pas due à la polymérisation. La forme du thermogramme de l'actine G en présence de viroïsine est différente de celle de l'actine F. La fluorimétrie a montré que l'actine G en présence de viroïsine a une conformation différente de l'actine F. La viscosité d'une solution d'actine G n'augmente pas lorsque l'on ajoute de la viroïsine comme c'est le cas lorsque l'actine polymérise. De plus, l'estimation du contenu en structures secondaires à partir des spectres obtenus en dichroïsme circulaire a montré que l'actine F et l'actine G, en présence de viroïsine avaient une conformation différente. Tous ces aspects ne sont pas en accord avec l'hypothèse selon laquelle la stabilisation de l'actine G par la viroïsine serait due à la polymérisation de l'actine.

Il semble plus probable, à la lumière des résultats que nous avons obtenus, que la viroïsine interagit directement avec le monomère d'actine et induit un changement de conformation de ce monomère. Cette modification de la structure rendrait le monomère plus stable à la dénaturation thermique. Cette hypothèse va à l'encontre de ce qui est généralement admis, soit que la viroïsine se lie de façon spécifique seulement avec la forme filamenteuse de l'actine.

Cependant la seule technique qui ait montré qu'il existe une interaction entre l'actine G et la viroïsine est la DSC. Toutes les autres techniques ont conduit à un résultat négatif. Dans ce cas, nous devons exprimer une certaine réserve quant à notre conclusion. Les résultats obtenus par DSC sont très reproductibles et ne peuvent être mis en doute, mais il n'est pas exclu que l'interprétation de ces résultats puisse être différente.

RÉFÉRENCES

- 1) Allen, P.G., Laham, L.E., Way, M., & Janmey, P.A. Binding of Phosphate, Aluminium Fluoride or Beryllium Fluoride to F-Actin Inhibits Severing by Gelsolin. *J. Biol. Chem.*, 1996, **271**, 4665-4670.
- 2) Asakura, S., Taniguchi, M., & Oosawa, F. Mechano-Chemical Behaviour of F-Actin. *J. Mol. Biol.*, 1963, **7**, 55-60.
- 3) Barden, J.A., Chuen-Shang, C.W., & Dos Remedios, C.G. Actin Monomer Conformation under Polymerizing Conditions Studied by Proton Nuclear Magnetic Resonance and Circular Dichroism Spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, 1983, **748**, 230-235.
- 4) Bertazzon, A., Tian, G. H., Lamblin, A., & Tsong, T. Y. Enthalpic and Entropic Contribution to Actin Stability : Calorimetry, Circular Dichroism, and Fluorescence Study and Effect of Calcium. *Biochemistry*, 1990, **29**, 291-298.
- 5) Bhaskaran, R., & Chin, Y. NMR Spectra and Restrained Molecular Dynamics of the Mushroom Toxin Viroisin. *Int. J. Peptides Protein Rev.*, 1994, **43**, 393-401.
- 6) Bombardier, H. *Stabilisation de l'actine F par l'ATP*. MSc en biophysique, Université du Québec à Trois-Rivières, 1995, 108 pages.

- 7) Brahms, S., & Brahms, J. Determination of Protein Secondary Structure in Solution by Vacuum Ultraviolet Circular Dichroism, *J. Mol. Biol.*, 1980, **138**, 149-178.
- 8) Bremer, A., Henn, C., Goldie, K.N., Engel, A., Smith, P.R., & Aepli, U. Towards Atomic Interpretation of F-Actin Filament Three-Dimensional Reconstruction. *J. Mol. Biol.*, 1994, **242**, 683-700.
- 9) Buku, A., Faulstich, H., Wieland, T., & Dabrowski, J. 2,3-trans-3,4-dihydroxy-L-proline: An Amino Acid in Toxic Peptides of *Amanita virosa* Mushrooms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1980, **77**, 2370-2371.
- 10) Carlier, M.-F. Actin : Protein Structure and Filament Dynamics. *J. Biol. Chem.*, 1991, **266**, 1-4.
- 11) Carlier, M.-F., Measurement of Pi Dissociation from Actin Filaments Following ATP Hydrolysis Using a Linked Enzyme Assay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, **143**, 1069-1075.
- 12) Carlier, M.-F., & Pantaloni, D. Direct Evidence for ADP-Pi-F-Actin as the Major Intermediate in ATP-Actin Polymerization. Rate of Dissociation of Pi from Actin Filaments. *Biochemistry*, 1986, **25**, 7789-7792.
- 13) Carlier, M.-F., Pantaloni, D., & Korn, E.D. Polymerization of ADP-actin and ATP-actin under Sonication and Characteristics of the ATP-actin Equilibrium Polymer. *J. Biol. Chem.*, 1985, **260**, 6565-6571.

- 14) Chen, G.C., & Yang, J.T. Two Point Calibration of Circular Dichrometers with d-10-camphorsulfonic Acid, *Anal. Lett.*, 1977, **10**, 1195-1207.
- 15) Chik, J.K., Lindberg, U., & Schutt, C. E. The Structure of an Open State of β -Actin at 2.65Å Resolution. *J. Mol. Biol.*, 1996, **263**, 607-623.
- 16) Clark, J., & Steele, J. Phase-Separation Inhibitors and Prevention of Selenite Cataract. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1992, **89**, 1720-1722.
- 17) Coluccio, L.M., & Tilney, L.G. Phalloidin Enhances Actin Assembly by Preventing Monomer Dissociation, *J. Cell Biol.*, 1984, **99**, 529-535.
- 18) Cooke, R. The Role of Bound Nucleotide in the Polymerization of Actin. *Biochemistry*, 1975, **14**, 3250-3256.
- 19) Cooper, G.M. *La Cellule*. Paris, De Boeck Université, Sinauer Associates, Inc., 1999.
- 20) Cooper, J.A. Effect of Cytochalasin and Phalloidin on Actin. *J. Cell Biol.*, 1987, **105**, 1473-1478.
- 21) Cooper, J.A., Walker, S.B., & Pollard, T.D. Pyrene Actin: Documentation of the Validity of a Sensitive Assay for Actin Polymerization. *J. Musc. Res. Cell Motil.*, 1983, **4**, 253-262.
- 22) Danker, P. Stabilization of Actin Filaments by ATP and Inorganic Phosphate. *Z. Naturforsch.*, 1989, **44**, 698-704.

- 23) Danker, P., & Hess, L. Phalloidin Reduces the Release of Inorganic Phosphate During Actin Polymerization. *Biochim. Biophys. Acta*, 1990, **1035**, 197-200.
- 24) Danker, P., Low, I., Nasselbach, W., & Wieland, T. Interaction of Actin with Phalloidin : Polymerization and Stabilization of F-Actin. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1975, **400**, 407-414.
- 25) De La Cruz, E., & Pollard, T. D. Transient Kinetic Analysis of Rhodamine Phalloidin Binding to Actin Filament. *Biochemistry*, 1994, **33**, 14387-92.
- 26) DeRosier, D.J., & Klug, A. Reconstruction of Three Dimensional Structures from Electron Micrographs. *Nature*, 1968, **217**, 130-134.
- 27) DeVries, I., Schäfer, A.J., Faulstich, H., & Wieland, T. Protection of Actin from Heat Denaturation by Various Phallotoxins. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 1976, **357**, 1139-1143.
- 28) DeVries, I., & Wieland, T. Influence of Phallotoxins and Metal Ions on the Rate of the Proteolysis of Actin. *Biochemistry*, 1978, **17**, 1965-1968.
- 29) Dolgikh, D. A., Gilmanshin, R. I., Brazhnikov, E. V., Bychkova, V. E., Semisotnov, G. V., Venyaminov, S. Yu., & Ptitsyn, O. B. α -Lactalbumin : Compact State with Fluctuating Tertiary Structure? *FEBS Lett.*, 1981, **136**, 311-315.
- 30) Estes, J. E., Selden, L. A., & Gershman, L. C. Mechanism of Action of Phalloidin on the Polymerization of Muscle Actin. *Biochemistry*, 1981, **20**, 708-712.

- 31) Estes, J. E., Selden, L. A., Kinosian, H. J., & Gershman, L. C. Tightly-Bound Divalent Cation of Actin. *J. Muscl. Res. Cell Motil.*, 1992, **13**, 272-284.
- 32) Faulstich, H., Buku, A., Bodenmuller, H., & Wieland, T. Virotoxins: Actin Binding Cyclic Peptides of *Amanita virosa* Mushrooms. *Biochemistry*, 1980, **19**, 3334-3343.
- 33) Faulstich, H., Schäfer, A. J., & Weckauf, M. The Dissociation of the Phalloidin-Actin Complex. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 1977, **358**, 181-184.
- 34) Faulstich, H. & Wieland, T. Amatoxins, Phallotoxins, Phallalysin and Antamanide; the Biologically Active Components of Poisonous *Amanita* Mushrooms. *CRC Critical Rev. Biochem.*, 1978, **5**, 184-260.
- 35) Fausnaugh, J.L., Blazyc, J.F., El Saleh, S.C., & Johnson, P. Calorimetric Studies on Monomeric and Polymeric Actin. *Experientia*, 1984, **40**, 83-84.
- 36) Frieden, C., Lieberman, D., & Gilbert, H. A Fluorescent Probe for Conformational Changes in Skeletal Muscle G-Actin. *J. Biol. Chem.*, 1980, **255**, 8991-8993.
- 37) Freuer, G., Molnar, F., Pettko, E., & Straub, F.B. The Composition and Polymerization of Actin. *Hung. Acta Physiol.*, 1948, **1**, 150-163.
- 38) Gabbiani, G., Montesano, R., Tuchweber, B., Salas, M., & Orci, L. Phalloidin-Induced Hyperplasia of Actin Filaments in Rat Hepatocytes. *Lab. Investigation*, 1975, **33**, 562-569.

- 39) Gershman, L.C., Selden, L.A., Kinosian, H.J., & Estes, J.E. Preparation and Polymerization Properties of Monomeric ADP-Actin. *Biochim. Biophys. Acta*, 1989, **995**, 109-115.
- 40) Gerstein, M., & Altman, R. Average Core Structure and Variability Measures for Protein Families Application to the Immunoglobulins. *J. Mol. Biol.*, 1995, **251**, 161-175.
- 41) Gicquaud, C., & Paré, M. Virotoxins Polymerize Actin and Induce Membrane Fragmentation in Cytoplasmic Preparations of *Amoeba proteus*. *Biochem. Cell Biol.*, 1992, **70**, 719-723.
- 42) Gicquaud, C., & Turcotte, A. Des Peptides de *Amanita virosa* : viroïdine et viroïsine sont plus efficaces que la phalloïdine pour protéger l'actine *in vitro* contre les effets de l'acide osmique. *Eur. J. Cell Biol.*, 1983, **32**, 171-173.
- 43) Gilmanshin, R.I., Dolgikh, D.A., Ptitsyn, O.B., Finkelstein, A.V., & Shakhnovich, E.I. Protein Globule Without the Unique Three-Dimensional Structure: Experimental Data for Alpha-lactalbumins and General Model. *Biofizika*, 1982, **27**, 1005-1016.
- 44) Grazi, E., Ferri, A., & Cino, S. The Polymerization of Actin. A Study of the Nucleation Reaction. *Biochem. J.*, 1983, **213**, 727-732.
- 45) Hanson, J., Abstr. 7th. Int. Cong. Biochem. Tokyo, 1976, II-327; *Sym. Biol. Hung.*, 8:99 (1967).
- 46) Hegyi, G., & Venyaminov, Y. Absence of Gross Changes in the Secondary Structure of Actin at G-F Transition. *FEBS Letters*, 1980, **109**, 134-136.

- 47) Hegyi, G., Szilagyi, L., & Elzinga, M. Photoaffinity Labeling of the Nucleotide Binding Site of Actin. *Biochemistry*, 1986, **25**, 5793-5798.
- 48) Holmes, K.C., Popp, D., Gebhard, W., & Kabsch, W. Atomic Model of the Actin Filament. *Nature*, 1990, **347**, 44-49.
- 49) Ikeuchi, Y., Iwamura, K., Machi, T., Kaimoto, T., & Suzuki, A. Instability of F-Actin in the Absence of ATP: A Small Amount of Myosin Destabilizes F-Actin. *J. Biochem.*, 1992, **111**, 606-613.
- 50) Ikeuchi, Y., Iwamura, K. & Suzuki, A. Heat Denaturation of Rabbit Skeletal G-actin in the Presence of ATP. *J. Sci. Food Agric.*, 1990, **50**, 287-296.
- 51) Joly, M. A physico-chemical Approach to the Denaturation of Proteins. In *Molecular Biology – An International Series of Monographs and Textbooks*, Vol. 6. Academic Press, London and New York, B. Horecker, N.O.Kaplan, and H.A. Scheraga, Editors. 1965.
- 52) Johnson, W.C. Analysing Protein Circular Dichroism Spectra for Accurate Secondary Structures. *Proteins*, 1999, **35**, 307-312.
- 53) Kabsch, W., & Vandekerckhove, J. Structure and Function of Actin. *Ann. Rev, Biophys. Biomol. Struct.*, 1992, **21**, 49-76.
- 54) Kabsch, W., Mannherz, H. G., Suck, D., Pai, E. F., & Holmes, K. C. Atomic Structure of the Actin : DNase I Complex. *Nature*, 1990, **347**, 37-44.

- 55) Kasai, M., Asakura, S., & Oosawa, F. The G-F Equilibrium in Actin Solutions Under Various Conditions, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1962, **57**, 13-21.
- 56) Kessler, H., & Wein, T. Solution Structure of Phalloidin Obtained by NMR Spectroscopy in [D₆]DMSO and Molecular Dynamics Calculation in Vacuo and in Water, *Liebigs Ann. Chem.*, 1991, 179-184.
- 57) Kobayashi, N., Endo, S., Kobayashi, H., Faulstich, H., Wieland, T., & Munekata, E. Comparative Study on the Conformation of Phalloidin, Viroisin, and Related Derivatives in Aqueous Solution. *Eur. J. Biochem.*, 1995, **232**, 726-736.
- 58) Kondo, H., & Ishiwata, S. Uni-Directional Growth of F-Actin. *J. Biochem. (Tokyo)*, 1976, **79**, 159-171.
- 59) Korn, E. Actin Polymerization and its Regulation by Proteins from Non Muscle Cells. *Physiol. Rev.*, 1982, **62**, 672-737.
- 60) Kouyama, T., & Mihashi, K. Fluorimetry Study of N-(1-Pyrenyl) iodoacetamide-Labeled F-Actin. *Eur. J. Biochem.*, 1981, **114**, 33-38.
- 61) Kuznetsova, I.M., Khaitlina, S.Yu., Konditerov, S.N., Surin, A.M., & Turoverov, K.K. Changes of Structure and Intermolecular Mobility in the Course of Actin Denaturation. *Biophys. Chem.*, 1988, **32**, 73-78.

- 62) Kuznetsova, I.M., Biktahev, A.G., Khaitlina, S.Yu., Vassilenko, K.S., Tureverov, K.K. & Uversky, V.N. Effect of Self-Association on the Structural Organization of Partially Folded Proteins: Inactivated Actin. *Biophysical J.*, 1999, **77**, 2788-2800.
- 63) Le Bihan, T. & Gicquaud, C. Kinetic Study of the Thermal Denaturation of G-actin using Differential Scanning Calorimetry and Intrinsic Fluorescence Spectroscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993, **194**, 1065-1073.
- 64) LeBihan, T. *Approche cinétique de la dénaturation thermique de l'actine: Contribution expérimentale et théorique*. MSc en biophysique, Université du Québec à Trois-Rivières, 1993, 108 pages.
- 65) Lehrer, S.S., & Kerwar, G. Intrinsic Fluorescence of Actin. *Biochemistry*, 1972, **11**, 1211-1217.
- 66) Lorenz, M., Popp, D., & Holmes, K.C. Refinement of the F-Actin Model Against X-Ray Fiber Diffraction Data by the Use of a Directed Mutation Algorithm. *J. Mol. Biol.*, 1993, **234**, 826-836.
- 67) Löw, I., Danker, P., & Wieland, T. Stabilization of F-Actin by Phalloidin. Reversal of the Destabilizing Effect of Cytochalasin B, *FEBS Lett.*, 1975, **54**, 263-265.
- 68) Löw, I., & Wieland T. The Interaction of Phalloidin. Some of its Derivatives, and of Other Cyclic Peptides with Actin as Studied by Viscosimetry. *FEBS Lett.*, 1974, **44**, 340-343.

- 69) Ludescher, R. D., & Liu, Z. Characterization of Skeletal Muscle Actin Labeled with the Triplet Probe Erythrosin-5-iodoacetamide. *Photochem. Photobiol.*, 1993, **58**, 858-866.
- 70) Manavalan, P., & Johnson, W.C.Jr., Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra. *J. Biosc.*, 1985, **8** (Suppl), 141-149.
- 71) Mannherz, H. G. Crystallization of Actin in Complex with Actin-binding Proteins. *J. Biol. Chem.*, 1992, **267**, 11661-11664.
- 72) Massry, S., & Glasscock, R. Textbook of Nephrology. Baltimore, Williams and Wilkins, 1983.
- 73) McLaughlin, P.J., Gooch, J.T., Mannherz, H.G., & Weeds, A.G. Structure of Gelsolin Segment 1 α -Actin Complex and the Mechanism of Filament Severing. *Nature*, 1993, **364**, 685-692.
- 74) Miyamoto, Y., Kuroda, E., Munekata, E., & Masaki, Y. Stoichiometry of Actin and Phalloidin Binding : One Molecule of the Toxin Dominates Two Actin Subunits. *J. Biochem. (Tokyo)*, 1986, **100**, 1677-1680.
- 75) Moore, P.B., Huxley, H.E., & deRosiers, D.J. Three-Dimensional Reconstruction of F-actin, Thin Filaments and Decorated Thin Filaments. *J. Mol. Biol.*, 1970, **50**, 279-295.
- 76) Murphy, A. J. Circular Dichroism of the Adenine and 6-Mercaptopurine Nucleotide Complexes of Actin. *Biochemistry*, 1971, **10**, 3723-3728.

- 77) Nagy, B., & Strzelecka-Golaszewska, H. Optical Rotatory Dispersion and Circular Dichroic Spectra of G-Actin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1972, **150**, 428-435.
- 78) Nonomura, Y., Katayama, E., & Ebashi, S. Effect of Phosphates on the Structure of the Actin Filament. *J. Biochem. (Tokyo)*. 1975. **78**, 1101-1104.
- 79) O'Brien, E.J., Couch, J., Jonhson, G.R.P. & Morris, E.P. in Actin, Dos Remedios, C. G. & Barden J.A. Eds., 3-15, Academic Press, New-York, 1983.
- 80) Ohgushi, M., & Wada, A. 'Molten-Globule State' : a Compact Form of Globular Proteins with Mobile Side-Chains. *FEBS Lett.*, 1983, **164**, 21-24.
- 81) Oosawa, F., Asakura, S., Hotta, K., Imai, N. et Ooi, T. 1959, *J. Polymer Sci.*, **37**, 323-336.
- 82) Orlova, A., & Egelman, E.H. A Conformational Change in the Actin Subunit can Change the Flexibility of the Actin Filament. *J. Mol. Biol.*, 1993, **232**, 334-341.
- 83) Pollard, T. D. Rate Constants for the Reactions of ATP- and ADP-Actin with the Ends of Actin Filaments. *J. Cell Biol.*, 1986, **103**, 2747-2754.
- 84) Pollard, T. D. Actin. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1990, **2**, 33-40.

- 85) Pollender, J.-M., & Gruda, J. Effect of Phalloidin on Actin Proteolysis as Measured by Viscometry and Fluorimetry. *Can. J. Biochem.*, 1979, **57**, 49-55.
- 86) Privalov, P. L. & Gill, S. J. Stability of Protein Structure and Hydrophobic Interaction. *Adv. Protein Chem.*, 1988, **39**, 191-234.
- 87) Privalov, P.L., Tiktopulo, E.I., Venyaminov, S.Y., Griko, Y.V., Makhatadze, G.I. & Khechinashvili, N.N. Heat Capacity and Conformation of Proteins in the Denatured State. *J. Mol. Biol.*, 1989, **205**, 737-750.
- 88) Privalov, P.L., Stability of Protein. *Adv. Prot. Chem.*, 1979, **33**, 167-241.
- 89) Ptitsyn, O.B. Molten Globule and Protein Folding. *Adv. Protein, Chem.*, 1995, **47**, 83-229.
- 90) Rebello, C.A., & Ludescher, R.D. Influence of Tightly Bound Mg^{2+} and Ca^{2+} , Nucleotides, and Phalloidin on the Microsecond Torsional Flexibility of F-Actin. *Biochemistry*, 1998, **37**, 14529-14538
- 91) Roustan, C., Benyamin, Y., Boyer, M., Bertrand, R., Audemard, E. & Jaureguiadell, J. Conformational Changes Induced by Mg^{++} on Actin Monomers. *FEBS Letters*, 1985, **181**, 119-123.
- 92) Rouyarenc, J.F. & Travers, F. The First Step in the Polymerization of Actin. *Eur. J. Biochem.*, 1981, **116**, 73-77.
- 93) Sampath, P., & Pollard, T.D. Effects of Cytochalasin, Phalloidin, and pH on the Elongation of Actin Filaments. *Biochemistry*, 1991, **30**, 1973-1980.

- 94) Schäfer, A., DeVries, I., Faulstich, H., & Wieland, T. Phalloidin Counteracts the Inhibitory Effect of Actin on Desoxyribonuclease 1. *FEBS Lett.*, 1975, **57**, 51-54.
- 95) Schutt, C. E., Myslik, J. C., Rozycki, M. D., Goonesekere, N. C. & Lindberg, U. The Structure of Crystalline Profilin- β -Actin. *Nature*, 1993, **365**, 810-816.
- 96) Selve, N., & Wegner, A. Rate of Threadmilling of Actin Filaments *in vitro*. *J. Mol. Biol.*, 1986, **187**, 627-631.
- 97) Spudich, J.A., & Watt, S. The Regulation of Rabbit Skeletal Muscle Contraction: Biochemical Studies of the Interaction of Tropomyosin-troponin Complex with Actin and Proteolytic Fragments of Myosin. *J. Biol. Chem.*, 1971, **246**, 4866-4871.
- 98) Steinmetz, M., Goldie, K. N., & Aebi, U. A Correlative Analysis of Actin Filament Assembly, Structure, and Dynamics. *J. Cell Biol.*, 1997, **138**, 559-574
- 99) Straub, F.B. Actin. *Stud. Szeged.*, 1942, **2** 3-15.
- 100) Strzelecka-Golaszewska, H., Nagy, G., & Gergely, J. Changes in Conformation and Nucleotide Binding of Ca, Mn, or Mg-G-Actin Upon Removal of the Bound Divalent Cation. Studies of Ultraviolet Difference Spectra and Optical Rotation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1974, **161**, 559-569

- 101) Strzelecka-Golaszewska, H., Prochniewicz, E., & Drabikowski, W. Interaction of Actin with Divalent Cations. 1. The Effect of Various Cations on the Physical State of Actin. *Eur. J. Biochem.*, 1978a, **88**, 219-227.
- 102) Strzelecka-Golaszewska, H., Prochniewicz, E., & Drabikowski, W. Interaction of Actin with Divalent Cations. 1. Characterization of Protein-Metal Complexes. *Eur. J. Biochem.*, 1978b, **88**, 229-237.
- 103) Strzelecka-Golaszewska, H., Venyaminov, S. Yu., Zmorzynski, S., & Mossakowska, M. Effect of Various Amino Acid Replacements on the Conformational Stability of G-Actin. *Eur. J. Biochem.*, 1985, **147**, 331-342.
- 104) Tanford, C. Protein Denaturation. *Adv. Protein Chem.*, 1968, **23**, 121-282.
- 105) Tatunashvili, L.V., & Privalov, P.L. Calorimetric Investigation of G-actin Denaturation. *Biofizika*, 1984, **29**, 583-585.
- 106) Tirion, M.M., Ben-Avraham, D., Lorenz, M., & Holmes, K.C. Normal Modes as Refinement Parameters for the F-actin Model. *Biophys. J.*, 1995, **68**, 5-12.
- 107) Thompson, J. T., de Bustros, S., Michels, R. G., & Rice, T. A., Results and pronostic factors in vitrectomy for diabetic vitreous hemorrhage. *Arch. Ophthalmol.*, 1987, **105**, 191-195.
- 108) Tsou, C. L. Conformational Flexibility of Enzyme Active Sites. *Science*, 1993, **282**, 380-381.

- 109) Tuchweber, B., & Gabbiani, G. Phalloidin-Induced Hyperplasia of Actin Filaments in Rat Hepatocytes. In *The liver, Quantitative Aspects of Structure and Function*. Aulendorf, Ed. R. Preisig, J. Bitcher et G. Paumgartner, 1975.
- 110) Turcotte, A. *Séparation des virotoxines du champignon Amanita virosa et étude de leurs interactions sur l'actine in vitro*. MSc en Sciences de l'environnement, Université du Québec à Trois-Rivières, 1983, 108 pages.
- 111) Turcotte, A., Gicquaud, C., Gendreau, M., & St-Pierre, S. Separation of the virotoxins of the mushroom *Amanita virosa* and comparative study of their interaction on actin in vitro. *Can. J. Cell. Biol.*, 1984, **62**, 1327-1334.
- 112) Uversky, V.N., & Fink, A.L. Structural Effect of Association on Protein Molecules in Partially Folded Intermediates. *Biochemistry*, 1998, **63**, 456-462.
- 113) Uversky, V.N., Segel, D.J., Doniach, S., & Fink, A.L. Association-Induced Folding of Globular Proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, **95**, 5480-5483.
- 114) Valentin-Rank, C. & Carlier, M. F. Role of ATP-bound Divalent Metal Ion in the Conformation of Actin. *J. Biol. Chem.*, 1991, **266**, 7668-7675.
- 115) Vandekerckhove, J., Deboben, A., Nassal, M., & Wieland, T. The Phalloidin Binding Site of F-Actin. *The EMBO Journal*, 1985, **4**, 2815-2818.

- 116) Vedenkina, N.S., Kalinichenko, L.P., & Permyakov, E. A. Effect of Phalloidin on the Stability of F- and G-Actin. *Molecular biol.*, 1995, **29**, 349-352.
- 117) Wanger, M., Kieser, T., Neuhaus, J.M., & Wegner, A. The Actin Treadmilling. *Can. J. Biochem.*, 1985, **63**, 414-421.
- 118) Wegner, A. Treadmilling of Actin at Physiological Salts Concentrations: an Analysis of the Critical Concentrations of Actin Filaments. *J. Mol. Biol.*, 1982, **161**, 607-615.
- 119) Wegner, A. & Engel, J. Kinetics of the Cooperative Association of Actin Filaments. *Biophys. Chem.*, 1975, **3**, 215-225.
- 120) Wendel, H., & Danker, P. Influence of Phalloidin on ATP Hydrolysis During Actin Polymerization. *Biochim. Biophys. Acta*, 1987, **915**, 205-209.
- 121) Wetzel, R., Perry, L. J., Mulkerrin, M. G. & Randall, M. Unfoldind and Activation. Genetic and Chemical Approaches to the Stabilization of T4 Lysozyme and Human Interferon Gamma against Irreversal Thermal Denaturation. Chap. 5., Protein Design and the Development of new Therapeutics and Vaccines. J. B. Hook et G. Poste (Eds)., Plenum Publishing Corporation, 1990.
- 122) Wieland, T. Interaction of Phallotoxins with Actin. *Adv. enzyme Regulations*, 1977a, **15**, 285-300.

- 123) Wieland, T. Modification of Actins by Phallotoxins. *Naturwissenschaften*, 1977b, **64**, 303-309.
- 124) Wieland, T. Peptides of Poisonous Amanita Mushrooms. Springer-Verlag, New-York, Berlin, Heidelberg, London, Paris, Tokyo, Alexander Rich eds., 1986.
- 125) Wieland, T., DeVries, J. X., Schafer, A., & Faulstich, H. Spectroscopic Evidence for the Interaction of Phalloidin with Actin. *FEBS Lett.*, 1975, **54**, 73-75.
- 126) Zanotti, G., Kobayashi, N., Muneata, E., Zobeley, S., & Faulstich, H. D-Configuration of Serine Is Crucial in Maintaining the Phalloidin-Like Conformation of Viroisin. *Biochemistry*, 1999, **38**, 10723-10729.