

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

Mémoire présenté à
l'Université du Québec à Trois-Rivières

Comme exigence partielle
de la maîtrise en biophysique

Par

Benoit Pigeon

*ÉTUDE DE L'INTERACTION DIRECTE ENTRE L'ACTINE ET LES LIPIDES
MEMBRANAIRES (LIPOSOMES) PAR CALORIMÉTRIE DIFFÉRENTIELLE À
BALAYAGE ET MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE*

Décembre 1992

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.

*Je dédie ce mémoire à mon père, Antoine,
pour ses qualités exceptionnelles de persévérence,
de courage, et de soutien dont il fait preuve,
et dont il nous a si bien enseignées.*

Merci beaucoup 'pa!

RÉSUMÉ

L'actine et les membranes sont deux constituants importants des cellules. Les membranes sont une barrière semi-perméable qui délimite la frontière des cellules et qui permet de conserver l'intégrité biochimique de celles-ci. Les composantes de base d'une membrane sont les phospholipides, des molécules amphiphiles, qui s'organisent en deux lamelles opposées laissant leur partie polaire vers la partie aqueuse de part et d'autre de cette bicouche. L'actine est une protéine cytoplasmique que l'on retrouve dans la majorité des cellules eucaryotes où elle joue deux rôles principaux: un rôle structural puisqu'elle est impliquée avec d'autres protéines dans l'élaboration du cytosquelette et un rôle motile où elle est en partie responsable de phénomènes tels la phagocytose, le déplacement d'organites et la contraction musculaire.

Pour exercer ces deux fonctions, l'actine doit être liée aux membranes. Le point de vue actuel est que l'actine est attachée aux membranes par l'intermédiaire de protéines périphériques ou intégrales. Cependant, il est rarement fait mention, dans la littérature, que l'actine puisse être directement liée aux lipides membranaires. En effet, seulement quelques travaux ont montré avec des systèmes *in vitro* que l'actine peut se lier directement aux lipides membranaires, et ce, dans certaines conditions expérimentales bien précises.

L'objectif de ce projet de recherche est de mettre en évidence les paramètres qui modulent l'interaction directe actine-lipides et de rechercher le mécanisme moléculaire de cette interaction. Les méthodes choisies pour réaliser cet objectif sont la calorimétrie différentielle à balayage (DSC) et la microscopie électronique à transmission.

Nos résultats en calorimétrie différentielle à balayage montrent que la transition de phase du dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) est modifiée seulement lorsque les liposomes sont en présence d'actine et de cations bivalents. De plus, l'allure des thermogrammes de fusion du DPPC, en présence d'une concentration croissante d'actine-F, suggèrent que l'interaction actine-lipides est un phénomène de surface purement électrostatique.

Nos résultats en microscopie électronique à transmission montrent que l'interaction actine-lipides dépend de plusieurs facteurs: de la nature du phospholipide, d'une concentration seuil en cations bivalents, de la différence de densité moléculaire des phospholipides entre la phase gel et liquide-cristalline, et du nombre de charges positives en excès à la surface des liposomes.

L'analyse de nos résultats suggère donc que le mécanisme moléculaire par lequel l'actine se lie aux lipides membranaires est un attachement électrostatique direct entre les charges négatives des filaments d'actine et les charges positives des liposomes. Ce mécanisme d'interaction serait initié par une densité adéquate de charges positives en excès à la surface de la bicouche. En effet, il y aurait une densité critique de charges positives à atteindre pour qu'il y ait interaction actine-lipides.

L'implication *in vivo* d'une telle interaction directe entre l'actine et les lipides membranaires est à envisager puisque les conditions expérimentales dans lesquelles nous avons travaillé sont compatibles avec celles qui prévalent au sein des cellules.

REMERCIEMENTS

L'accomplissement d'un projet de recherche est souvent rendu possible avec la participation idéologique et technique de plusieurs intervenants. Ils sont nombreux et je ne peux tous les remercier ici, mais ils se reconnaîtront sûrement.

Par contre, je tiens à remercier personnellement certaines personnes qui ont été très significatives tout au long de la réalisation de ce projet:

Notre célèbre et notoire *Gicquosyl transférase*, mon enzyme de directeur de thèse, qui a su si bien exercer sa fonction d'entonnoir et de transfert du Savoir, et qui a fait brûler des cierges pour moi.

Fadel Chbina, avec lequel j'ai passé de longues heures enviables à la préparation de l'actine, c'est-à-dire du mignon petit lapin jusqu'à son incorporation, en solution aqueuse, aux liposomes.

Pierre Lavigne, pour les conversations très enrichissantes que nous avons eues, et pour sa fidélité à nos rendez-vous *utrèkiens* où nous avons étudié avec assiduité le rôle catabolique de l'*alcool déshydrogénase hépatique*.

Le Fonds FCAR pour son soutien financier.

Et finalement, ma femme Diane, mes enfants Valérie et Pierre-Alexandre, non seulement pour leur encouragement et leur compréhension, mais aussi pour les joies, les sourires, et l'émerveillement qu'ils me procurent.

TABLE DES MATIERES

Résumé	i
Remerciements	iii
Table des matières	iv
Liste des abréviations	vii
1.0 Introduction	1
1.1 L'actine	2
1.1.1 Les propriétés physico-chimiques de l'actine	3
1.1.2 La polymérisation de l'actine	4
1.1.3 Les structures de l'actine	6
1.1.3.1 Monomérique	6
1.1.3.2 Filamenteuse	7
1.1.3.3 Paracristalline	8
1.2 Les membranes	9
1.2.1 Les membranes naturelles	11
1.2.2 Les membranes artificielles	13
1.2.2.1 Les liposomes	14
1.2.3 La transition de phase des lipides	16
1.3 Les interactions actine-membranes	19
1.3.1 Interaction médiée par des protéines liant l'actine	19
1.3.2 Interaction directe avec les lipides	22
1.4 Objectif du projet de recherche	25
2.0 Matériel et méthodes	26
2.1 Préparation des solutions	26
2.1.1 Solutions tampons	26

2.2 Préparation de l'actine	27
2.2.1 Préparation de la poudre acétonique	28
2.2.2 Extraction de l'actine à partir de la poudre acétonique	29
2.2.3 Purification de l'actine	30
2.2.3.1 Description du protocole.....	31
2.2.3.2 Profil d'élution.....	31
2.2.3.3 Test de gélification	33
2.2.3.4 Electrophorèse.....	35
2.2.3.5 Caractéristiques de l'actine purifiée.....	37
2.3 Préparation des liposomes.....	37
2.3.1 La congélation-décongélation.....	38
2.3.2 L'ultrafiltration.....	39
2.3.3 Protocole de fabrication.....	40
2.3.4 Liste des lipides utilisés	41
2.4 La calorimétrie différentielle à balayage	42
2.4.1 Introduction	42
2.4.2 Principe de la méthode.....	44
2.4.3 Fonctionnement et caractéristiques de la méthode.....	46
2.4.4 La DSC et les membranes.....	48
2.4.4.1 Les membranes modèles lipidiques.....	48
2.4.4.2 Les systèmes membrane-protéines.....	52
2.4.5 Protocole d'utilisation du DSC	54
2.4.6 Reproductibilité de la méthode.....	54
2.5 La microscopie électronique à transmission.....	56
3.0 Résultats	57
3.1 Étude de l'interaction actine-lipides par calorimétrie différentielle à balayage.....	57
3.1.1 Effet de l'actine et du MgCl ₂ sur la transition de phase du DPPC	57
3.1.2 Influence de la concentration du MgCl ₂ sur la transition de phase du DPPC.....	64
3.1.3 Influence de la concentration d'actine sur la transition de phase du DPPC	68
3.1.4 Interprétation des résultats obtenus en DSC	72

3.2 Étude de l'interaction actine-lipides par microscopie électronique.....	75
3.2.1 Étude des mélanges utilisés en DSC.....	76
3.2.2 Étude de l'interaction entre l'actine et différents phospholipides	82
3.2.3 Étude de l'interaction actine-lipides en fonction de la densité de charges.....	93
3.2.4 Interprétation des résultats obtenus en microscopie électronique	97
4.0 Discussion	99
4.1 Analyse des résultats.....	99
4.2 Proposition d'un mécanisme d'interaction.....	104
4.3 Poursuite des études sur l'interaction actine-lipides.....	110
4.4 Implication <i>in vivo</i> de l'interaction directe actine-lipides.....	113
5.0 Conclusions.....	114
Références	116

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABP	Protéine liant l'actine
AS	Acide stéarique
ATP	Adénosine triphosphate
ADP	Adénosine diphosphate
CU	Unité coopérative
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholine
DOPC	Dioléylphosphatidylcholine
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholine
DPPS	Dipalmitoylphosphatidylsérine
DSPC	Distéarylphosphatidylcholine
DSC	Calorimétrie différentielle à balayage
LUV	Liposome unilamellaire de grande taille
MLV	Liposome multilamellaire
OLV	Liposome oligolamellaire
PC	Phosphatidylcholine
PCboeuf	Phosphatidylcholine de cerveau de boeuf
PCoeuf	Phosphatidylcholine de jaune d'oeuf
SA	Stéarylamine
SUV	Liposome unilamellaire de petite taille
T _c	Température de transition principale
T _p	Température de prétransition
ΔC _p	Variation de capacité calorifique
ΔH ^c _{cal}	Enthalpie de transition principale calculée
ΔH ^p _{cal}	Enthalpie de prétransition calculée
ΔH _{vH}	Enthalpie de van't Hoff
ΔT _{1/2}	Écart de température à mi-hauteur de transition

1.0 INTRODUCTION

L'importance de l'actine et des membranes dans les systèmes biologiques est indiscutable. Des centaines de revues en font état, et ce, autant chez les organismes primitifs que chez les organismes évolués et bien organisés.

Une interaction étroite existe entre l'actine et les membranes qui composent la barrière cellulaire. Le point de vue actuel est que l'actine, via plusieurs types de protéines liantes, se lie aux membranes de diverses façons pour jouer un rôle dynamique dans les cellules. Mais, outre les interactions médiées par les protéines liantes, l'actine peut-elle interagir directement avec les lipides membranaires? Selon les conclusions de quelques travaux, il semble, en effet, que l'actine possède une affinité de surface avec les lipides membranaires. Le cas échéant, quel est la dynamique interactive, le mécanisme moléculaire de cette interaction directe?

Ce mémoire de recherche se veut, d'une part, un appui aux travaux précédents sur la possibilité d'une liaison directe actine-lipides et, d'autre part, une étude sur le mécanisme de cette interaction directe.

La présente section introduit les concepts fondamentaux reliés à l'actine et aux membranes. En premier lieu, une revue des propriétés et des structures de l'actine, en tant que macromolécule, sera faite. Les membranes seront abordées par la suite dans le but d'avoir les outils nécessaires pour faire état des connaissances sur les interactions entre l'actine et les lipides membranaires. Enfin, les objectifs du projet de recherche seront clairement présentés.

1.1 L'actine

L'actine est une protéine qui fut identifiée pour la première fois en 1942 par Straub. Ses recherches sur les muscles squelettiques ont montré que l'actine est l'une des deux principales protéines du muscle, l'autre étant la myosine. Dix ans plus tard, Loewry (1952) isole de l'actine d'une cellule non-musculaire; un myxomycète. Par la suite, l'actine fut reconnue dans de nombreuses cellules, tant musculaires que non-musculaires. Il est admis aujourd'hui que l'on retrouve de l'actine dans presque toutes les cellules eucaryotes.

Deux rôles majeurs sont attribués à l'actine: un rôle motile et un rôle structural. En ce qui concerne la motilité, la contraction musculaire en est un bon exemple; le glissement parallèle des filaments de myosine le long des filaments d'actine induit un raccourcissement du sarcomère, ce qui provoque la contraction du muscle (Adelstein et Eisenberg, 1980; Mannherz et Goody, 1976; Stull, 1980). Les phénomènes motiles des cellules non-musculaires sont aussi attribuables, en partie, à la présence d'actine. Le mouvement amiboïde (Condeelis et Taylor, 1977; Taylor *et al.*, 1973), le déplacement d'organites (Burridge et Phillips, 1975; Moore *et al.*, 1976) et l'exocytose (Burridge et Phillips, 1975; Tsilibary et Williams, 1983) en sont des exemples.

Au niveau structural, l'actine est impliquée dans l'élaboration du cytosquelette. Par exemple, la forme biconcave des érythrocytes est due à l'interaction de l'actine avec certaines protéines membranaires (Palek et Shih, 1981; Sheetz *et al.*, 1976), et la structure typique des microvillosités de l'épithélium intestinal est aussi due à des faisceaux d'actine qui déforment la membrane (Mooseker et Tilney, 1975).

Malgré cette extraordinaire diversité d'espèces dans lesquelles on retrouve l'actine, celle-ci s'est étonnamment bien conservée au cours de l'évolution. En effet, des différences mineures sont observables d'une espèce à l'autre au niveau de la structure primaire, du poids moléculaire et du point isoélectrique (Ogievetskaya, 1977; Vandekerckhove et Weber, 1978). De même, d'un point de vue fonctionnel, l'actine a conservé toutes ses propriétés physiologiques (Gordon *et al.*, 1977; Nakamura *et al.*, 1979).

1.1.1 Les propriétés physico-chimiques de l'actine

L'actine est une protéine globulaire hydrosoluble composée de 375 acides aminés et ayant un poids moléculaire d'environ 42500 daltons (Elzinga *et al.*, 1973). Son point isoélectrique se situe à pH 5.0, ce qui implique qu'à pH physiologique l'actine possède une charge globale négative (Vandekerckhove et Weber, 1978).

Les monomères d'actine possèdent un site spécifique pour un ion Ca^{2+} et un site à nucléotides, habituellement l'ATP (Barden *et al.*, 1982). De plus, l'actine possède plusieurs sites de haute et de basse affinité pour les cations bivalents. Sans ATP et sans calcium, l'actine se dénature rapidement (Strzelecka-Golaszewska *et al.*, 1974) et perd ses propriétés biologiques (Lal *et al.*, 1984).

Une des propriétés fondamentales de l'actine est sa capacité de polymérisation: selon les conditions ioniques du milieu, les monomères d'actine, que l'on nomme actine-G, s'assemblent pour former de longs filaments, l'actine-F. Ces filaments peuvent ensuite interagir ensemble pour créer des superstructures paracristallines, l'actine-P (voir figure 1.1).

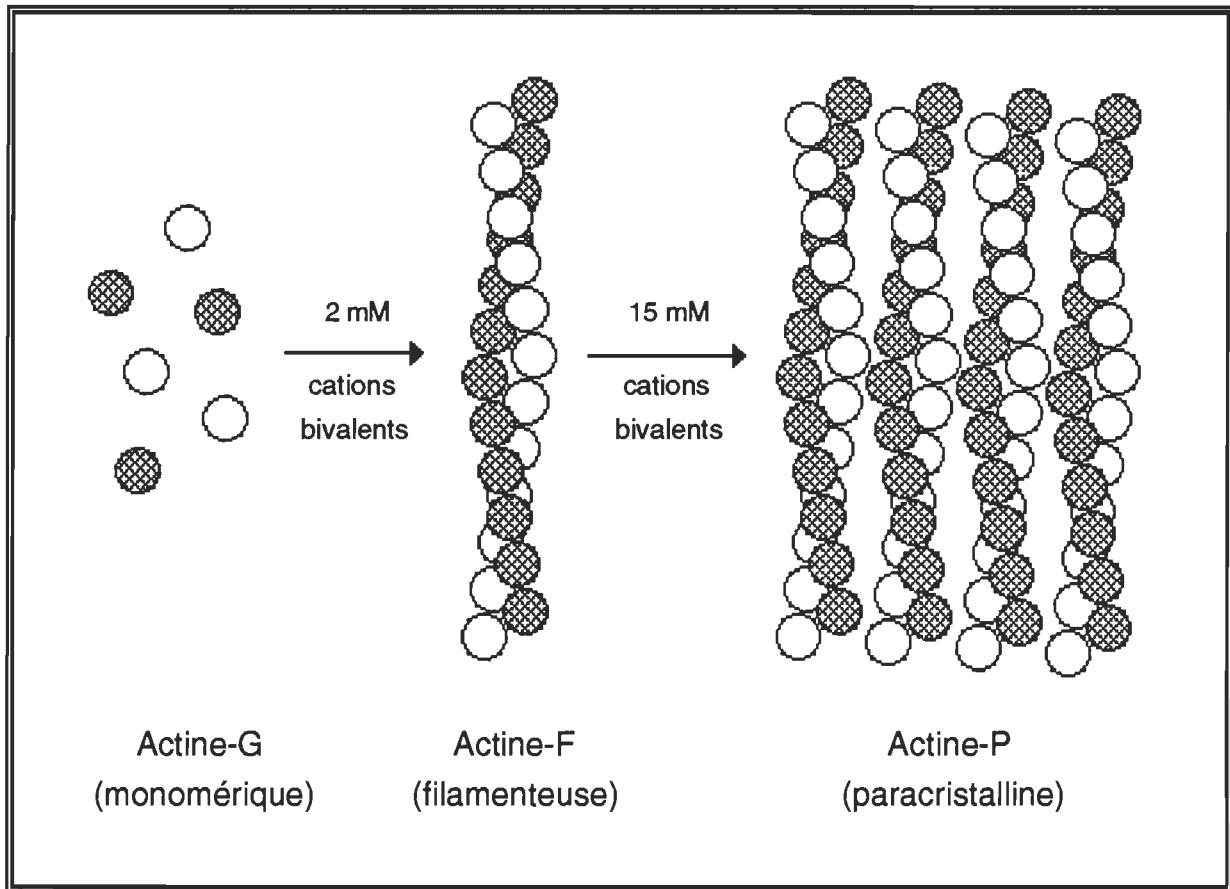


Figure 1.1: Formation de filaments et de paracristaux d'actine à partir de monomères.

1.1.2 La polymérisation de l'actine

La polymérisation de l'actine est induite par une saturation des sites d'affinité aux cations. Les sels les plus couramment utilisés sont le KCl, le $MgCl_2$ et le $CaCl_2$ aux concentrations de l'ordre du cent millimolaire pour le KCl et du millimolaire pour les cations bivalents (Frieden, 1983; Gershman *et al.*, 1984; Maruyama et Tsukagoshi, 1984).

Puisque la formation des filaments est induite par les cations, il est admis que c'est la neutralisation des charges négatives des monomères d'actine qui induit la polymérisation (Strzelecka-Golaszewska *et al.*, 1978).

Le processus de polymérisation comprend trois phases: la nucléation, l'elongation, et l'état stationnaire (Oosawa et Kasai, 1971; Tobacman et Korn, 1983; Wegner, 1982).

La nucléation est la formation d'un noyau formé de 3 monomères. Cette étape est lente et constitue l'étape limitante de la réaction.

L'elongation est l'étape où il y a ajout de monomères aux deux extrémités du noyau. Cependant, une extrémité polymérisé plus rapidement que l'autre car l'affinité des monomères est différente pour chaque extrémité. Rapidement, un long filament d'actine se formera.

L'état stationnaire est caractérisé par un phénomène appelé "treadmilling". En équilibre avec la concentration d'actine-G disponible dans le milieu, le filament ne s'allonge plus mais polymérisé à une extrémité à la même vitesse qu'il dépolymérisé à l'autre extrémité. Ce phénomène de "treadmilling" permet un échange entre les monomères du filament et ceux du milieu.

Au cours de la polymérisation, il se produit une hydrolyse de l'ATP lié aux monomères. L'actine possède, par conséquent, une activité enzymatique, quoique très faible, d'ATPase (Kabsch et Vandekerckhove, 1992). Cette hydrolyse n'est cependant pas un prérequis pour la polymérisation puisqu'un monomère-ADP peut aussi former des filaments (Cooke, 1975).

Un fait intéressant à noter est que le processus de la polymérisation est réversible. En conséquence, la plupart des techniques de purification d'actine sont basées sur des cycles de polymérisation-dépolymérisation (Kabsch et Vandekerckhove, 1992).

1.1.3 Les structures de l'actine

1.1.3.1 Monomérique

L'actine-G a une forme globulaire ovoïde asymétrique ayant une dimension de $3.3 \times 5.6 \times 5.0$ nm. Des études en microscopie électronique et reconstitutions structurales de feuillets cristallins d'actine pure ont montré que les monomères d'actine sont constitués d'un grand et d'un petit domaine (Kabsch et Vandekerckhove, 1992; Pollard et Cooper, 1986; Smith, 1984).

Quarante pour cent des résidus amino-acides se retrouvent dans le petit domaine, où se situe l'extrémité NH_2 -terminale, tandis que soixante pour cent constituent le grand domaine dans lequel on retrouve l'extrémité C-terminale.

La figure 1.2 schématise la structure de l'actine monomérique.

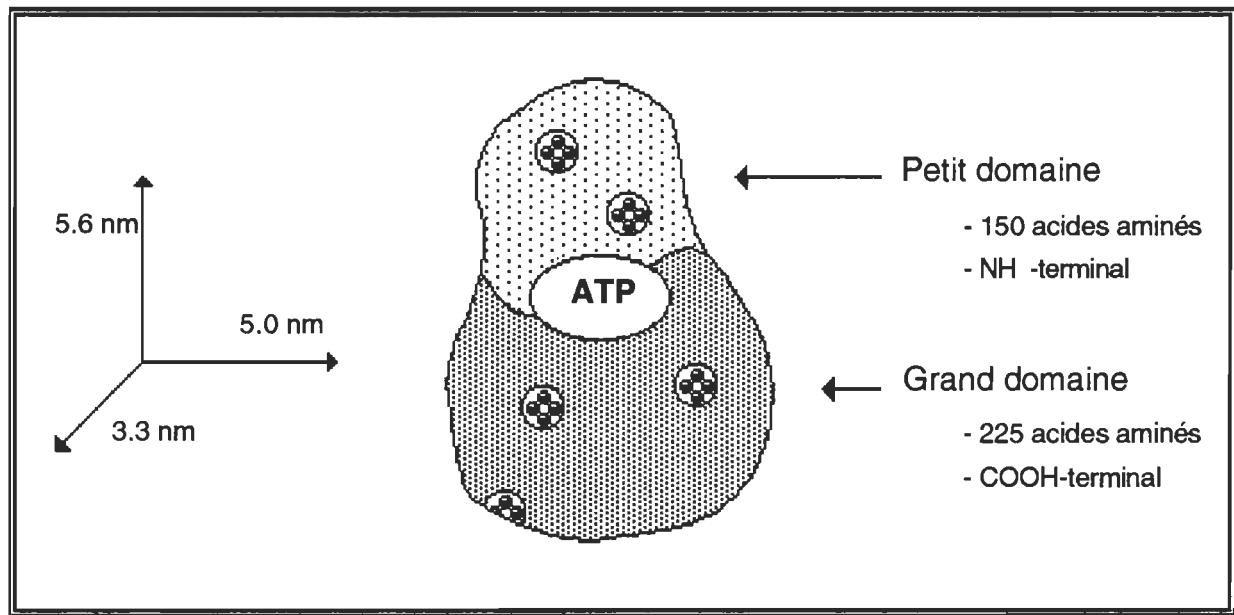


Figure 1.2: Structure de l'actine-G.

1.1.3.2 Filamenteuse

Le polymère de l'actine est une structure hélicoïdale formée de deux brins torsadés (voir figure 1.3). Les monomères se juxtaposent au nombre de 13 par période de la double hélice, ce qui représente une périodicité de 37.5 nm (De Rosier et Tilney, 1984). Le diamètre du filament est de 7 nm et la distance entre deux monomères est de 5.5 nm. Un filament d'actine peut atteindre une longueur de plusieurs centaines de monomères.

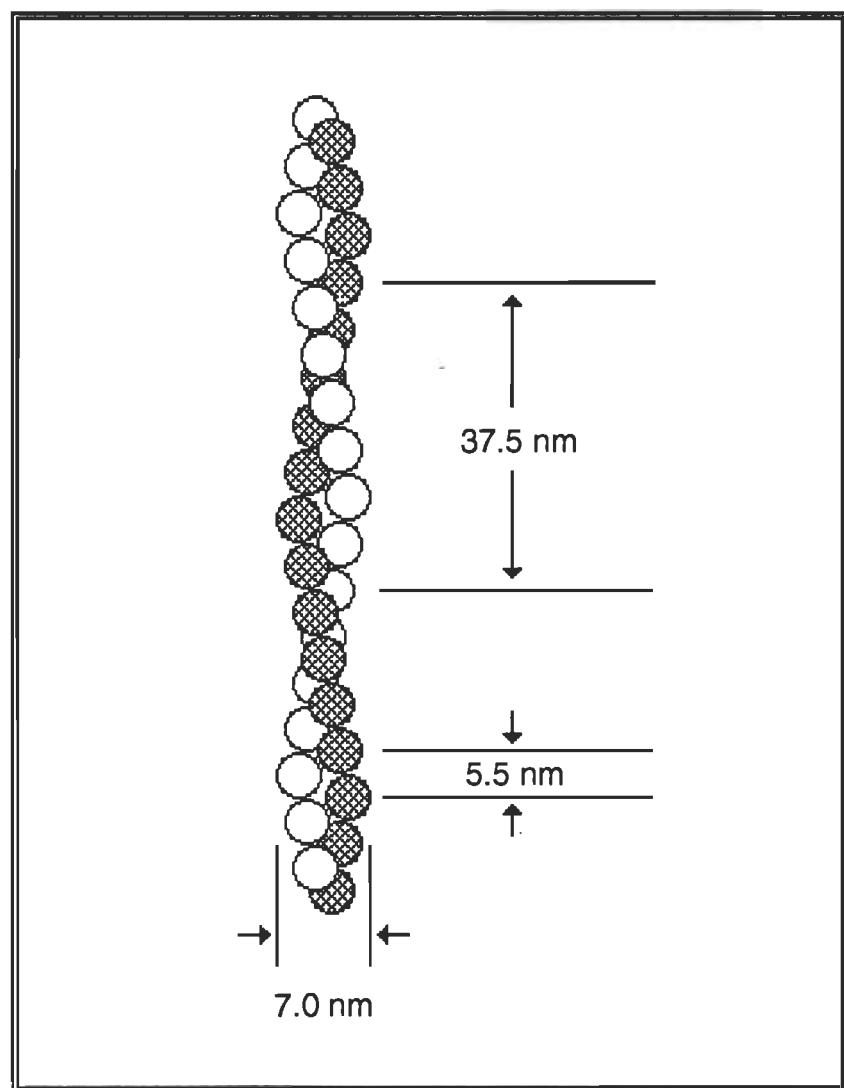


Figure 1.3: Structure de l'actine-F.

C'est sous cette forme, en filaments, que l'actine joue ses rôles dans la cellule en tant que constituant du cytosquelette et en tant qu'élément impliqué dans les phénomènes motiles.

1.1.3.3 Paracrystalline

Dans certaines conditions, les filaments d'actine peuvent s'assembler et former des structures régulières appelées paracristaux. Ces structures sont obtenues de plusieurs façons, soit par de fortes concentrations en ions Mg^{2+} (Hanson, 1976; Strzelecka-Golaszewska *et al.*, 1978), soit en présence d'ions lanthanides (Barden *et al.*, 1982), en particulier le gadolinium (Dos Remedios et Dickens, 1978). On peut aussi former des paracristaux en abaissant le pH au point isoélectrique de l'actine (Kawamura et Maruyama, 1970).

Selon les conditions expérimentales, différentes structures paracrystallines peuvent être obtenues:

- A) les paracristaux de Hanson;
- B) les paracristaux de Kawamura;
- C) les microcristaux de Dos Remedios.

Les paracristaux de Hanson (Hanson, 1976) sont formés de filaments d'actine, disposés en phase, parallèlement les uns aux autres (voir figure 1.1). Ces paracristaux ont donc une périodicité de 37.5 nm qui correspond à celle du filament d'actine. Ils sont obtenus en présence d'un excès de cations bivalents, généralement le Mg^{2+} .

Les paracristaux de Kawamura (Kawamura et Maruyama, 1970) sont généralement formés par des filaments d'actine entrecroisés à la manière d'un filet. Ces super-structures sont obtenues en incubant l'actine à son point isoélectrique.

Enfin, les microcristaux de Dos Remedios (Barden *et al.*, 1982; Dos Remedios et Dickens, 1978) sont constitués par l'accolement latéral et régulier de monomères d'actine disposés en monocouche. Ils sont obtenus par la présence d'ions lanthanides.

Il faut souligner que les conditions dans lesquelles sont formés ces paracristaux sont très différentes de celles qui prévalent *in vivo*. On a cependant retrouvé, dans des cellules, des structures paracristallines formées d'actine mais associées à d'autres protéines (De Rosier et Tilney, 1984; Small et Celis, 1978).

1.2 Les membranes¹

Comme il a été souligné en prémissé, les membranes ont été d'une grande importance dans le développement et l'évolution des systèmes biologiques. En effet, cette composante des cellules crée une véritable frontière sélective entre l'environnement et la dynamique biochimique intracellulaire. La barrière membranaire permet non seulement de circonscrire les organites en un ensemble viable, mais aussi de jouer un rôle dynamique dans la cellule et, souvent, de lui conférer une spécificité propre.

L'unité de base d'une membrane est le phospholipide (voir figure 1.4). Ce type de lipide est formé d'une extrémité soluble et polaire, et d'une extrémité non soluble composée de deux chaînes hydrocarbonées. Cette dualité hydrophile-hydrophobe permet une extraordinaire spontanéité organisationnelle en milieu aqueux: la bicouche phospholipidique.

¹ Les principaux ouvrages consultés pour la rédaction de cette section, sauf la sous-section 1.2.3 "La transition de phase des lipides", sont: Alberts *et al.*, 1983; Bangham *et al.*, 1974; Blume, 1991; Knight, 1981; Leserman et Barbet, 1982; Lichtenberg et Barenholz, 1987; Papahadjopoulos et Kimelberg, 1973; Pigeon, 1988; Rawn, 1989; St-Onge, 1988; Skoza et Papahadjopoulos, 1980.

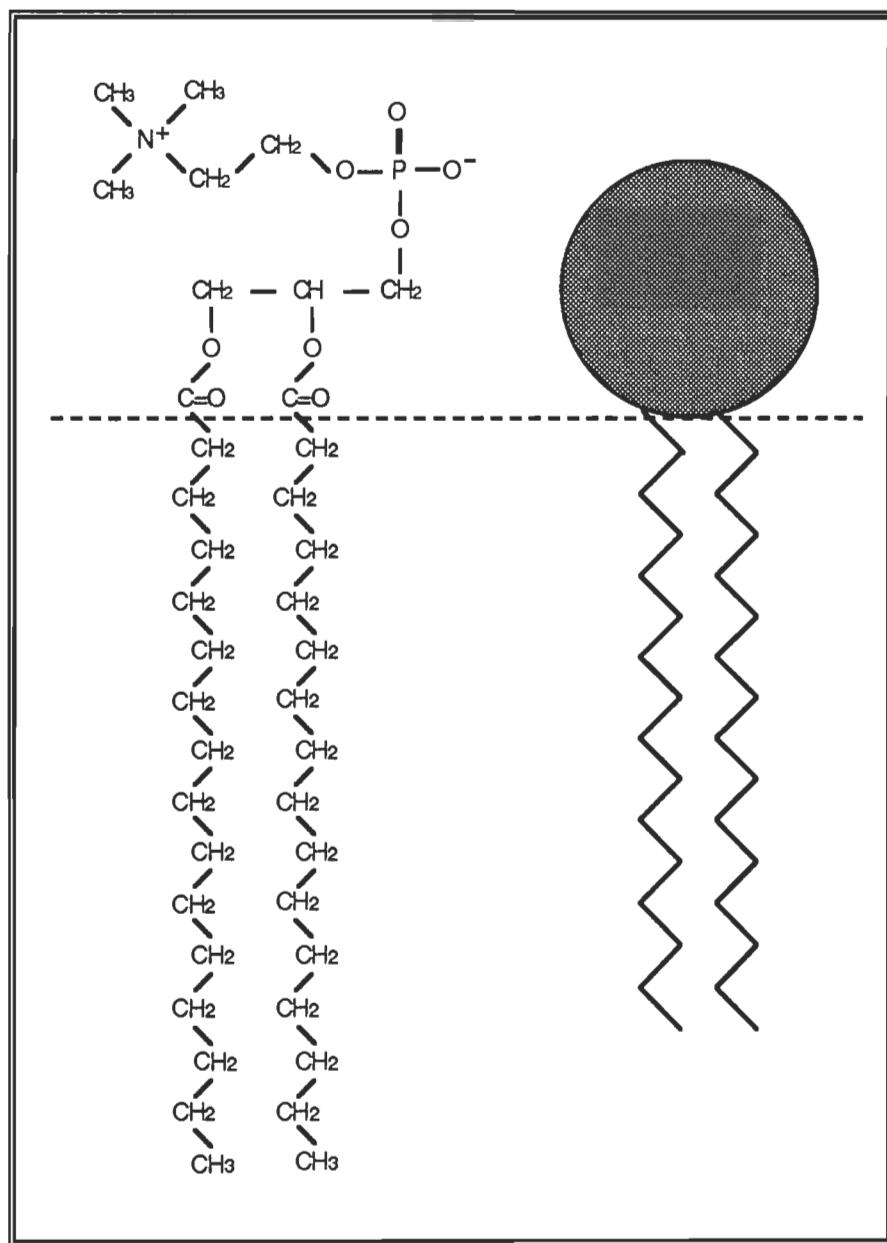


Figure 1.4: Structure d'un phospholipide, le 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC). On retrouve à gauche, sa structure chimique et à droite, la représentation schématisée d'un phospholipide. Au-dessus du pointillé est la région hydrophile et au-dessous, la partie hydrophobe.

La région hydrophile, ou tête polaire des phospholipides naturels est zwitterionique ou négative à pH physiologique. On peut cependant créer des membranes artificielles chargées positivement.

Les chaînes aliphatiques de la région hydrophobe sont habituellement constituées de 14 à 24 carbones de long et ayant un degré d'insaturation de 1 à 4 doubles liaisons. Pour les membranes artificielles, la variabilité des chaînes est souvent laissée à l'imagination des chercheurs et aux limites des méthodes de synthèse organique. On utilise par contre, et ce, plus souvent qu'autrement, des modèles simples comportant deux chaînes identiques pour mieux caractériser les propriétés des bicouches recréées *in vitro*. C'est le cas entre autre du dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) illustré à la figure 1.4.

Si les membranes naturelles ont joué un rôle clé dans l'élaboration de la vie, on peut affirmer que les membranes artificielles ont joué un rôle tout aussi important dans la recherche sur la connaissance de la vie.

1.2.1 Les membranes naturelles

Les membranes naturelles sont principalement composées de différents types de phospholipides et de protéines. Le modèle membranaire en mosaïque fluide proposé par Singer et Nicolson en 1972 est représenté par une mer de lipides dans laquelle baignent des protéines (Weissman et Claiborne, 1975).

Le rapport protéines-lipides est très variable d'une membrane à l'autre. En général, les protéines sont en quantité égale à la quantité de lipides. Les protéines sont donc une composante importante de la membrane.

Les interactions protéines-lipides peuvent être de trois types (voir figure 1.5), et ce, autant du côté externe que du côté cytoplasmique de la membrane (Papahadjopoulos *et al.*, 1975):

- 1) interaction électrostatique;
- 2) interaction combinée électrostatique et hydrophobe;
- 3) interaction hydrophobe.

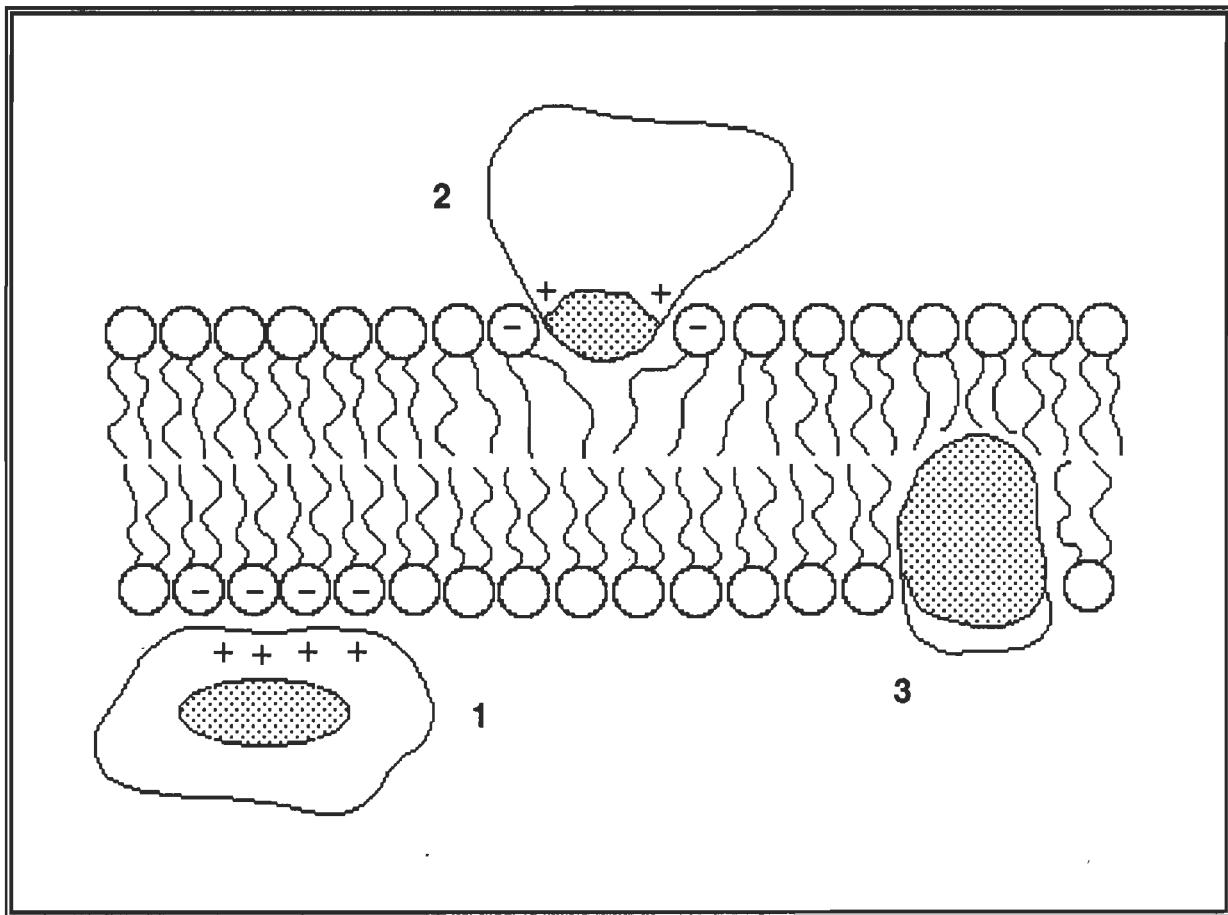


Figure 1.5: Représentation des divers types d'interaction protéine-bicouche phospholipidique selon Papahadjopoulos (voir texte).

Etant donné le rôle majeur que joue la membrane, plusieurs modèles membranaires artificiels ont été mis au point pour étudier, d'une part, les propriétés de la membrane et, d'autre part, les mécanismes d'interactions protéines-lipides.

1.2.2 Les membranes artificielles

Il existe trois principaux types de modèle membranaire: les monocouches, les bicouches et les liposomes.

Les monocouches, comme leur nom l'indique, ne comprennent qu'une seule couche phospholipidique située à l'interface air-eau. L'extrémité hydrophile est dirigée vers le bas, en contact avec le solvant aqueux, tandis que la portion hydrophobe est au-dessus du bain, en contact avec l'air.

Les bicouches de type BLM sont formées d'une réelle bicouche phospholipidique où les portions hydrophobes sont en contact les unes avec les autres et se font face. On les obtient en plaçant les lipides dans un minuscule orifice qui sépare deux compartiments aqueux.

Les liposomes sont des petites vésicules, tel un ballon, délimitées par une bicouche phospholipidique et possédant un espace intravésiculaire aqueux.

Ces trois types de modèle membranaire possèdent leurs propres caractéristiques et avantages. Selon le type d'information à obtenir, l'un ou l'autre des modèles, ou même les trois, peuvent être utilisés par le chercheur qui tente de percer les secrets de Dame Nature.

Nous nous limiterons ici seulement à la description des liposomes puisqu'il s'agit du système membranaire qui a été utilisé au cours du présent projet de recherche.

1.2.2.1 Les liposomes

Les vésicules phospholipidiques ont été décrites pour la première fois il y a plus de vingt ans par Bangham *et al.* (1965). Ils ont observé pendant l'hydratation de phospholipides la formation de vésicules composées d'un grand nombre de membranes lamellaires disposées les unes sur les autres. Depuis, ce phénomène a été élucidé et largement exploité.

Selon les méthodes de fabrication, on distingue trois grandes familles de liposomes: les MLV, LUV et SUV.

Les liposomes multilamellaires (MLV) sont caractérisés par un grand nombre de bicouches concentriques superposées les unes sur les autres et très peu hydratées. Leur dimension est en général supérieure à 500 nm. Leur méthode de fabrication est très rapide mais très peu reproductible.

Les liposomes unilamellaires de grande taille (LUV) possèdent une seule bicouche et, par conséquent, une cavité intravésiculaire importante. Leur taille peut atteindre le micromètre. Selon la méthode utilisée, leur fabrication peut être longue et délicate, et plus ou moins reproductible.

Les liposomes unilamellaire de petite taille (SUV) sont similaires aux LUV mais se différencient par leur petite dimension qui varie entre 50 à 400 nm. La fabrication est en général plus ou moins rapide mais très reproductible.

La figure 1.6 schématise une coupe transversale d'un liposome unilamellaire. On remarquera sur cette figure l'espace intravésiculaire et la bicouche phospholipidique qui délimite la taille du liposome.

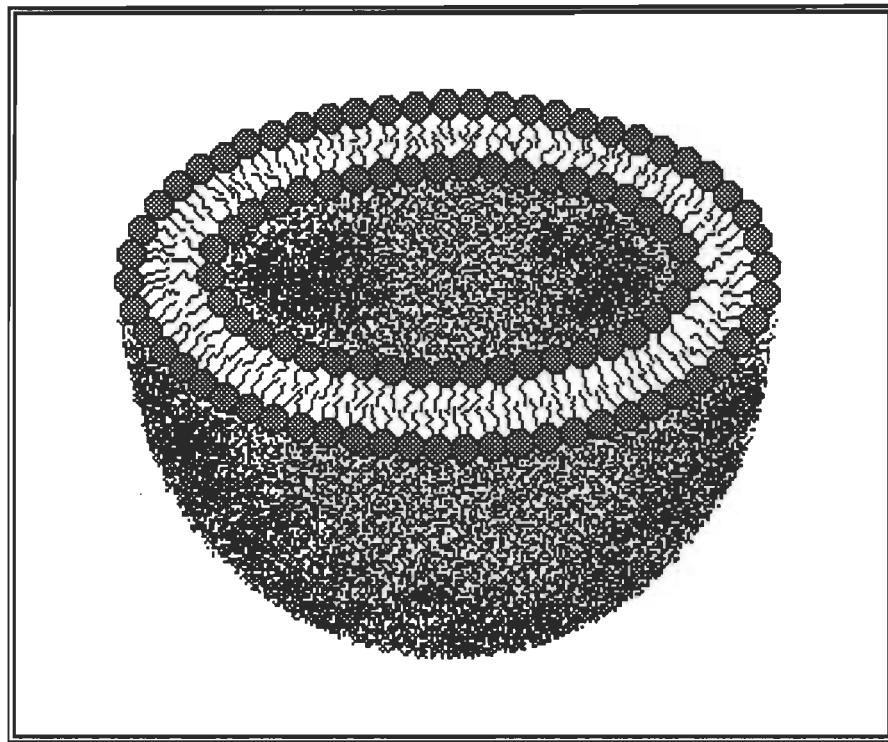


Figure 1.6: Coupe transversale d'un liposome unilamellaire.

L'utilisation des liposomes peut comporter plusieurs avantages. Ce sont de véritables vésicules qui miment les cellules, ils ont certaines propriétés des membranes naturelles et peuvent être composés d'un seul type de lipide ou d'un mélange complexe de divers lipides. En fait, on peut faire varier la longueur ou le taux d'insaturation des chaînes aliphatiques, les têtes polaires peuvent être constituées, par exemple, d'une choline, sérine ou d'un inositol, et l'incorporation d'autres types de lipides tel le cholestérol est possible.

Tout ceci fait des liposomes un système versatile et très intéressant en recherche, particulièrement pour les études d'interaction protéines-lipides. On les utilise aussi dans de nombreux autres domaines, tels la pharmacologie, l'ophtalmologie et la cosmétologie.

1.2.3 La transition de phase des lipides ²

Une des caractéristiques importantes des phospholipides est leurs transitions de phase thermotropique et lyotropique. Ces changements de phases induits soit par la température, soit par le degré d'hydratation, confèrent aux bicouches des propriétés et des structures spatiales différentes. Nous nous attarderons dans le présent contexte seulement à la transition thermotropique puisque les membranes naturelles et les liposomes utilisés sont pleinement hydratés et baignent dans un excès d'eau.

Cette transition température-dépendante a été décrite pour la première fois vers le milieu des années '60 avec les travaux microcalorimétriques réalisés par Chapman *et al.* (Chapman, 1965; Chapman *et al.*, 1967; Chapman, 1968; Ladbrooke *et al.*, 1968; Ladbrooke et Chapman, 1969). Elle se définit comme étant le passage d'un état "gel" à un état "liquide-cristallin" qui se produit en augmentant la température de l'échantillon.

L'état gel est caractérisé par une phase quasi-cristalline où les chaînes d'acide gras sont en conformation tout-*trans*. Une très grande cohésion existe alors entre les molécules de phospholipides qui forment une bicouche plus épaisse et plus rigide. La diffusion latérale et la perméabilité membranaire sont nettement plus faibles (Blume, 1991).

² Les principaux articles de revue consultés pour la rédaction de cette section sont: Bach, 1984; Blume, 1988; Blume, 1991; Mabrey-Gaud, 1981; McElhaney, 1986; Papahadjopoulos et Kimelberg, 1973; Wilkinson et Nagle, 1981; Wilschut, 1982.

L'état liquide-cristallin est caractérisé par une phase beaucoup plus fluide où les chaînes aliphatiques comportent plusieurs isomérisations *trans-gauche*. Les molécules phospholipidiques sont plus mobiles et forment une bicouche plus lâche et moins épaisse.

La figure 1.7 illustre de façon schématique les changements morphologiques d'une bicouche lors de la transition de phase. Ce processus se produit à une température spécifique pour chaque type de phospholipide: la température de transition (T_c).

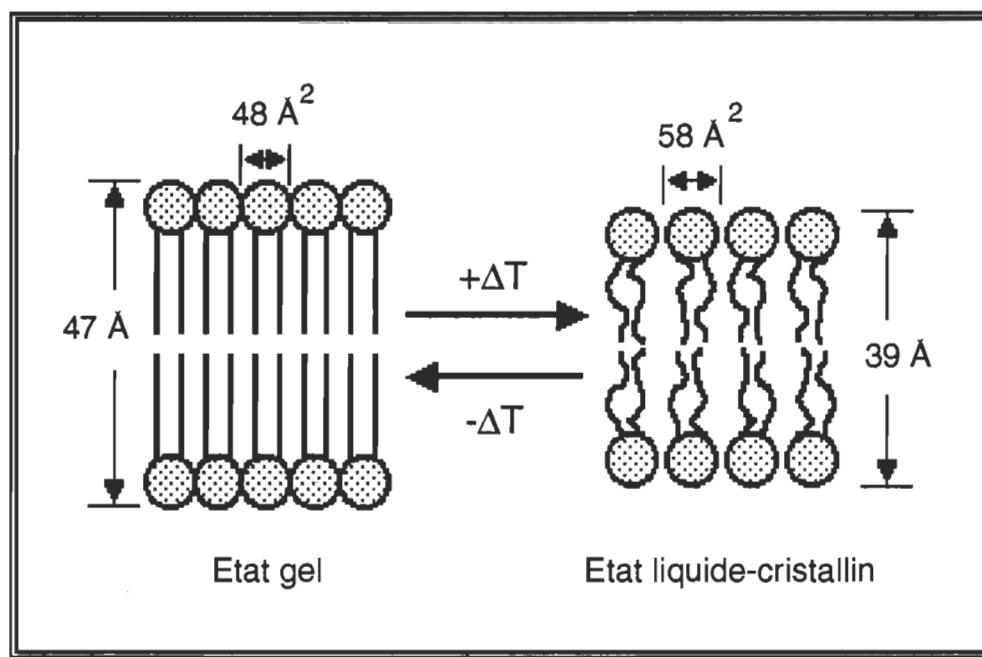


Figure 1.7: Représentation schématisée de la transition de phase d'une bicouche phospholipidique. Les dimensions données sont celles du DPPC qui a une température de transition d'environ 42°C (Papahadjopoulos et Kimelberg, 1973).

Ce phénomène thermodynamique est endothermique et possède une enthalpie de l'ordre de la kilocalorie par mole. L'enthalpie de fusion ainsi que la température de transition dépendent de plusieurs facteurs: la nature des têtes polaires, la longueur des chaînes acyles et le degré d'insaturation des chaînes.

Avec des modèles membranaires composés d'un seul type de phospholipide et ayant deux chaînes acyls identiques, la transition de phase est soudaine et s'étend sur un faible écart de température. On dit alors qu'il s'agit d'un processus très coopératif puisque tous les phospholipides participent en même temps au processus et de la même façon. Par contre, avec des phospholipides de nature variée (têtes polaires et/ou chaînes hydrocarbonées différentes) la transition de phase est plus "lente", c'est-à-dire qu'elle se produit sur un plus grand écart de température car toutes les molécules ne participent pas en même temps au processus. Il pourra alors y avoir formation de microdomaines, certains à l'état gel et d'autre à l'état liquide-cristallin en cours de processus (Bayerl *et al.*, 1988; Mabrey-Gaud, 1981; Melchior, 1986).

Chez les membranes naturelles, en plus d'être en présence de phospholipides de nature variée, la bicoche est "contaminée" avec des protéines et des glucides. La transition de phase est en conséquence d'autant plus perturbée et difficilement analysable avec les techniques microcalorimétriques actuelles. Cependant, certains travaux en microcalorimétrie ont démontré la présence d'une transition de phase chez des membranes naturelles, en particulier chez *Acholeplasma laidlawii* (McElhaney, 1982).

En fait, toute molécule interagissant avec la bicoche phospholipidique induit des perturbations à la transition de phase. Ces perturbations sont quantifiables avec des techniques microcalorimétriques appropriées. En particulier, la calorimétrie différentielle à balayage (DSC) qui est largement utilisée dans l'étude de la transition de phase des lipides et des interactions protéines-lipides. Le lecteur trouvera au chapitre 2 une section détaillée sur la DSC comme méthode d'étude de la transition de phase de lipides et des interactions protéines-lipides.

1.3 Les interactions actine-membranes

Comme il a été vu en début d'introduction, l'actine joue deux rôles importants au sein des cellules. Cependant, pour accomplir la plupart de ces fonctions, les microfilaments d'actine doivent nécessairement se lier aux membranes.

Une revue de la littérature indique que l'actine se lie aux membranes essentiellement par le biais de protéines membranaires. En effet, les travaux effectués dans le domaine des interactions actine-membranes ont surtout mis en évidence l'existence de protéines qui lient l'actine globulaire ou filamenteuse aux membranes. Les mécanismes par lesquels ces protéines attachent l'actine sont généralement bien connus. Par contre, il est rarement fait état de la possibilité d'une interaction directe entre l'actine et les lipides qui composent la membrane.

Les deux sous-sections qui suivent feront un survol de la littérature et résumeront les deux types d'interaction actine-membrane: l'interaction médiée par les protéines liant l'actine et l'interaction directe avec les lipides.

1.3.1 Interaction médiée par des protéines liant l'actine ³

Dans les systèmes biologiques, il est admis que l'actine se lie aux membranes par le biais de protéines liantes qui font partie de la grande famille des ABP (abréviation anglaise pour "actin binding proteins"). Que ce soit au cours de sa participation à des phénomènes motiles, ou en tant qu'élément du cytosquelette, les ABP-liantes peuvent attacher l'actine filamenteuse à la membrane de deux façons: perpendiculairement ou parallèlement.

³ Les principaux ouvrages consultés pour la rédaction de cette section sont: Bretscher, 1983; Burridge *et al.*, 1982; Cohen *et al.*, 1978; Davies, 1984; Geiger, 1985; Hirokawa et Tilney, 1982; Jacobson, 1980; Mangeat et Burridge, 1984; Rawn, 1989; Stossel, 1990; Tilney et Mooseker, 1976.

Par exemple, on retrouve les deux types d'attachement dans les microvillosités de l'épithélium intestinal (voir figure 1.8). L'axe central d'une microvillosité renferme des faisceaux composés d'environ 20 filaments d'actine qui maintiennent la forme du microvillus. L' α -actinin sert à ponter l'extrémité du faisceau à la plaque terminale du microvillus, tandis que de façon parallèle, le complexe 110 kD-calmoduline relie les filaments d'actine à la membrane plasmique (Mooseker et Tilney, 1975).

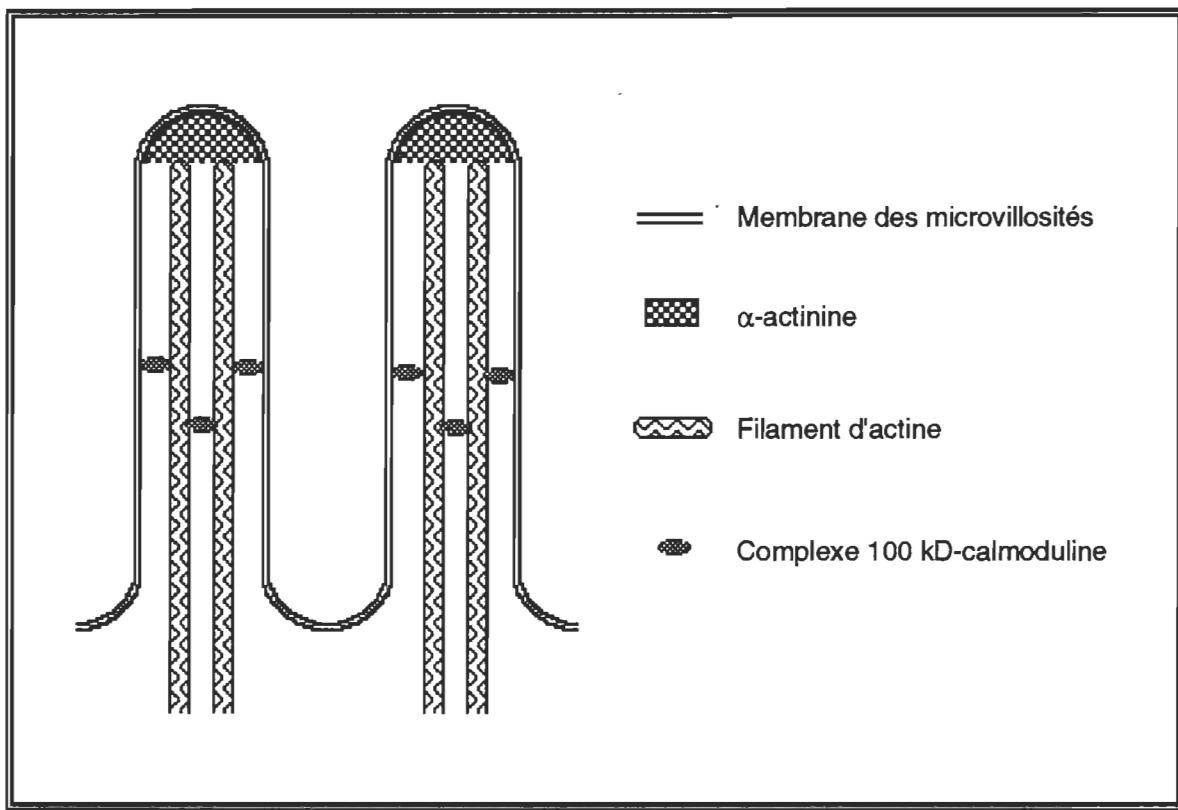


Figure 1.8: Modèle de liaisons de l'actine à la membrane de l'épithélium intestinal des bordures en brosse de l'intestin selon Mooseker et Tilney, 1975. On note un attachement perpendiculaire à la membrane par l' α -actinin et un attachement parallèle par le complexe 100 kD-calmoduline.

Les interactions actine-ABP-membranes sont fort complexes puisqu'il existe des dizaines d'ABP qui ont chacune des particularités et fonctions distinctes. Certaines ABP, en plus de lier l'actine à la membrane, attribuent un rôle

particulier aux filaments d'actine. Citons pour exemple le cas de l' α -actinin qui, d'une part, joue un rôle de pontage entre les filaments d'actine pour former des faisceaux et qui, d'autre part, est capable d'attacher les filaments d'actine aux membranes (Kabsch et Vandekerckhove, 1992).

Le tableau 1.1 ci-dessous présente les principales protéines impliquées dans les liaisons actine-membranes.

Nom de la protéine	Source	Poids moléculaire
Ponticuline	<i>Dictyostelium</i> et neutrophiles	17 000
Taline	Muscle lisse et plaquettes	215 000
Profiline	Plupart des cellules et fibroblastes	12 000 - 15 000
Spectrine	Plupart des cellules	240 000 / 235 000
α -actinin	Plupart des cellules	90 000 - 100 000
Fimbrine (plastine)	Epithélium intestinal	68 000
Villine	Epithélium intestinal	95 000
Gelsoline	Cellules de mammifères	90 000
Myosine 1 (110k-calmodul.)	Epithélium intestinal et <i>Dictyostelium</i>	110 000 - 140 000
Myosine 11	Fibroblastes	\approx 200 000
ABP-280 (filamine)	Plupart des cellules et fibroblastes	250 000
ABP-120	Plupart des cellules	120 000
Hisactophiline	<i>Dictyostelium</i>	17 000
Caldesmone	Plupart des cellules non-musculaires	70 000 - 80 000
Fragmine / severine	<i>Physarum</i> et <i>Dictyostelium</i>	42 000
Coronine	<i>Dictyostelium</i>	55 000

Tableau 1.1: Principales ABP liant l'actine aux membranes, leur source et poids moléculaire (Luna et Hitt, 1992).

1.3.2 Interaction directe avec les lipides

L'interaction directe actine-lipides n'a jamais été démontrée dans les systèmes *in vivo*. Certains travaux ont cependant montré que, dans des conditions *in vitro*, l'actine peut se lier aux membranes modèles sans intermédiaire. Principalement, deux groupes de recherches se sont penchés sur ce problème.

Le groupe de Okimasu *et al.* a montré que l'actine-F est capable de se lier à des vésicules de phosphatidylcholine. Cette interaction directe serait plus intense à la température de transition du lipide mais inhibée de façon progressive avec une incorporation croissante de cholestérol dans les liposomes (Okimasu *et al.*, 1986; Okimasu *et al.*, 1987; Utsumi *et al.*, 1982). Leurs études, même si elles sont compatibles avec les conditions qui prévalent *in vivo*, mènent à la conclusion que l'interaction directe actine-lipides est peu probable dans les systèmes biologiques puisque le cholestérol a un effet inhibiteur et que la température de transition des membranes naturelles est souvent loin des températures auxquelles vivent les cellules.

Le second groupe est celui de Gicquaud *et al.* Leurs premiers travaux ont montré que des membranes chargées positivement, par l'ajout de stéarylamine, interagissent avec l'actine-F (Rioux et Gicquaud, 1985) et sont capables d'induire la polymérisation de l'actine-G à la surface des liposomes pour former des structures paracristallines (Laliberté et Gicquaud, 1988). Ces travaux ont cependant peu d'intérêt *in vivo* puisque les membranes naturelles sont essentiellement composées de lipides neutre et négatif (Yamamoto *et al.*, 1987).

Une autre série de travaux de ce groupe de recherche (St-Onge et Gicquaud, 1989; St-Onge et Gicquaud, 1990) a établi que l'actine se lie aux membranes artificielles neutres et négatives en présence d'un minimum de 3 mM de cations

bivalents (Ca^{2+} ou Mg^{2+}) et que l'ajout de cation monovalent (K^+) n'induit pas d'interaction. De plus, cette interaction ne serait pas inhibée par l'ajout de cholestérol aux vésicules, ce qui est en contradiction avec les travaux de Okimasu *et al.*

D'autres travaux isolés ont été effectués sur cette interaction directe. Par exemple, Llerenas (1985) a montré une affinité de l'actine pour des monocouches de phosphatidylcholine. Selon cet auteur, l'actine-F interagit avec la monocouche et l'ajout de Ca^{2+} intensifie l'interaction.

Dans tous les cas, on remarque que les phénomènes de charges (liposomes positifs, neutres ou négatifs; ajout ou non de cations bivalents ou monovalents) sont décisifs sur l'observation -ou non- d'une interaction actine-lipides. D'ailleurs, les conclusions de ces travaux proposent qu'il s'agit d'une interaction de surface, où les forces électrostatiques sont impliquées. Les études de St-Onge et Gicquaud en 1989 proposent un pontage des filaments d'actine aux membranes par le biais des cations bivalents (voir figure 1.9). Par contre, leurs travaux de 1990 et ceux de Okimasu *et al.* réalisés à la température de transition suggèrent plutôt une interaction de type 2 (selon Papahadjopoulos; voir figure 1.5); c'est-à-dire une association hydrophobe et électrostatique.

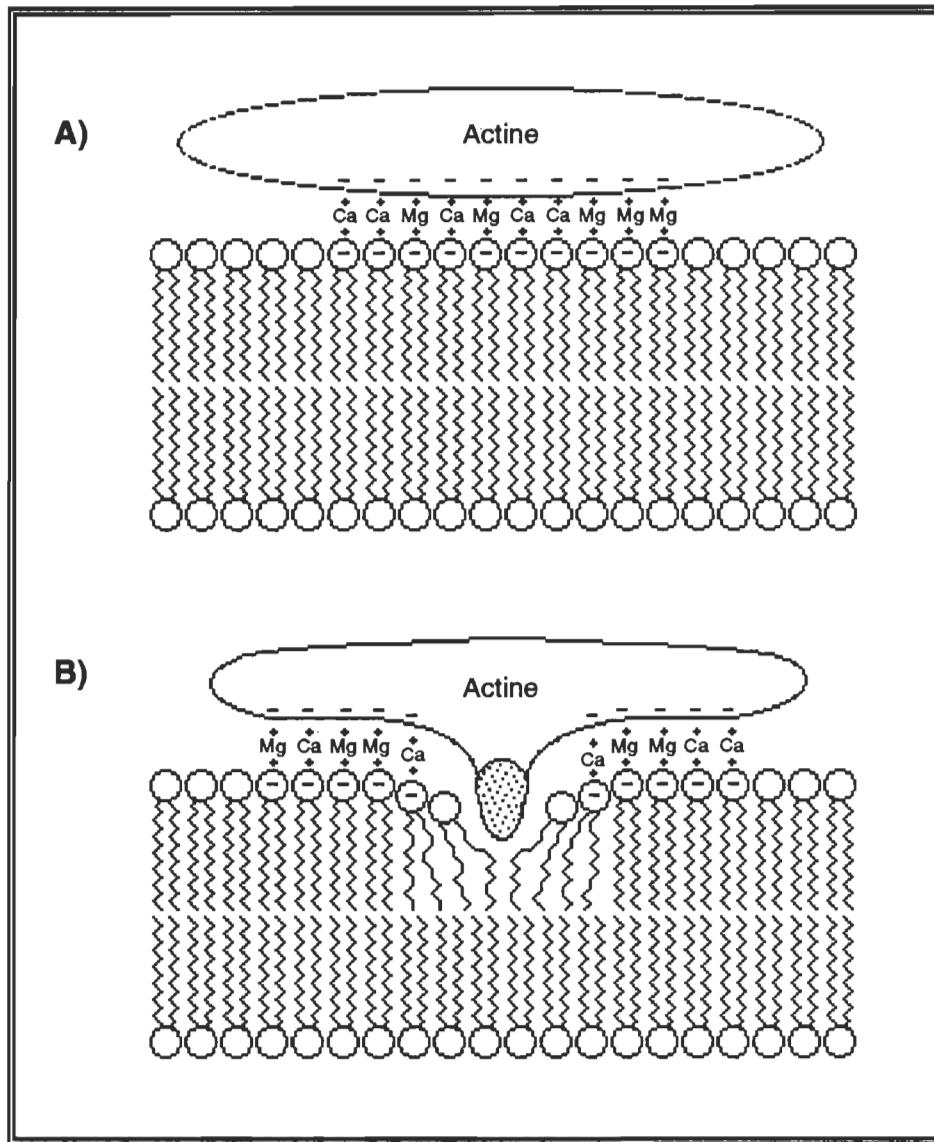


Figure 1.9: Représentation du mécanisme d'interaction actine-lipides suggéré par les travaux de St-Onge et Gicquaud (1989), en A, et St-Onge et Gicquaud (1990), en B (voir texte).

1.4 Objectif du projet de recherche

Ce projet de recherche a pour objectif de poursuivre les études sur l'interaction directe entre l'actine et les lipides membranaires dans le but de parfaire nos connaissances sur ce phénomène, et plus particulièrement dans le but d'éclaircir les bases mécanistiques de l'interaction. Pour ce faire, nous utiliserons la calorimétrie différentielle à balayage et la microscopie électronique à transmission pour étudier le comportement d'un système composé d'actine purifiée et de liposomes fabriqués avec des phospholipides synthétiques purs.

Les manipulations en calorimétrie différentielle à balayage permettront d'étudier le comportement de la transition de phase de liposomes composés de DPPC en présence et en absence d'actine monomérique et filamenteuse (i.e. avec et sans cations bivalents). Au travers des expériences, nous ferons varier la concentration en actine et en cations bivalents dans le but de quantifier et d'évaluer la nature de l'interaction. En effet, suivant le genre de perturbations que l'actine causera à la transition de phase du DPPC il sera possible de déterminer la nature du mécanisme d'interaction (voir section 2.4.4.2). Il est à noter que les résultats que nous obtiendrons seront originaux puisqu'aucune étude de l'interaction entre l'actine purifiée et les lipides membranaires par calorimétrie différentielle à balayage n'a été effectuée auparavant.

La microscopie électronique permet d'observer directement l'interaction actine-lipides. Par conséquent, nous pourrons évaluer de façon qualitative l'importance de différents phospholipides sur cette interaction directe. C'est-à-dire que nous ferons varier la composition des liposomes et la concentration en cations bivalents dans le but de déterminer quelles sont les conditions qui modulent l'attachement des filaments d'actine à la surface des liposomes. Nos résultats seront originaux puisque les lipides et les faibles concentrations en cations bivalents que nous allons utiliser n'ont jamais été étudiés précédemment par microscopie électronique.

2.0 MATÉRIEL ET MÉTHODES

Une description détaillée du matériel et des techniques utilisées sera faite dans ce chapitre. De plus, pour certaines méthodes, il sera fait état de la théorie relative à la technique employée, et ce, plus particulièrement pour la calorimétrie différentielle à balayage. Enfin, certains résultats non pertinents aux objectifs du projet, mais directement reliés aux méthodologies utilisées, seront présentés.

2.1 Préparation des solutions

Les produits utilisés sont généralement de grade ACS et ils proviennent principalement de chez Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, USA), Fisher Scientifique (Ontario, Canada) et Sigma Chemical Co. (St-Louis, Mo, USA).

Toutes les solutions mères contenaient 0.1% d'azide de sodium et elles étaient conservées au réfrigérateur de façon à minimiser une éventuelle contamination bactérienne.

L'eau utilisée était de la meilleure qualité possible: l'eau déminéralisée était distillée et ensuite filtrée par un appareil Sybron/Barnstead modèle Nanopure (Boston, MA, USA) à une résistivité supérieure à 11 mégohm-cm.

2.1.1 Solutions tampons

A) Tampon G: tampon Tris-HCl pH 8.0, 2 mM;
ATP, 0.2 mM;
CaCl₂, 0.2 mM;
β-mercaptopéthanol, 0.5 mM;
azide de sodium, ≈ 0.01%.

B) Tampon G_{aca}: identique au tampon G, mais en lui ajoutant:
KCl, 20 mM;
bleu de bromophénol, \approx 1 %.

2.2 Préparation de l'actine

L'actine a été purifiée à partir de la poudre acétonique du muscle squelettique de lapin. La première étape de la purification est l'extraction de l'actine à partir de la poudre acétonique selon la méthode de Spudich et Watt (1971), modifiée par Nonomura *et al.* (1975), et que nous avons aussi modifiée pour améliorer le rendement. La purification de l'actine, proprement dite, est finalement réalisée en chromatographie liquide d'exclusion selon la méthode de Fowler et Bennett (1984) modifiée. Les modifications que nous avons apportées aux méthodes d'extraction de l'actine et de purification en chromatographie d'exclusion seront précisées plus loin aux sections 2.2.2 et 2.2.3.

La concentration de l'actine est déterminée en spectrophotométrie à 290 nm selon la relation de Lambert-Beer ($A = \varepsilon bc$), où le coefficient d'extinction molaire vaut: $\varepsilon^{290\text{nm}} = 0.63 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Lehrer et Derwar, 1972).

Pour toutes les manipulations effectuées, l'actine a été préparée et utilisée dans du tampon G, c'est-à-dire sous forme monomérique. L'actine filamenteuse a été obtenue en ajoutant du CaCl_2 ou du MgCl_2 aux solutions à des concentrations allant de 1 à 15 mM. Il est à noter que les concentrations en cations divalents mentionnées dans ce manuscrit ne tiennent pas compte du 0.2 mM en CaCl_2 déjà présent dans le tampon G, sauf lorsqu'il en sera fait spécifiquement mention.

2.2.1 Préparation de la poudre acétonique

La recette originale de la poudre acétonique fut produite par Feuer *et al.* (1948). Par la suite, elle fut tellement modifiée par de nombreux auteurs pour l'adapter à l'extraction de l'actine qu'il est pratiquement impossible d'associer un nom à la recette que nous utilisons aujourd'hui. Voici la procédure employée:

- A) *Préparation du hachis de muscle.* Saigner complètement deux lapins et découper les muscles du dos et des cuisses. Enlever graisse, nerfs et tendons des muscles et laisser tremper dans de l'eau distillée froide (4°C) de façon à refroidir rapidement la viande. Passer au hachoir. Réserver 800 à 900 g de hachis.
- B) *Extraction au KCl.* Ajouter un litre de KCl 100 mM au hachis et homogénéiser au mélangeur électrique par portions. Compléter à 4 L avec du KCl et de l'eau distillée froide de façon à obtenir KCl 0.6 M. Agiter 30 minutes au réfrigérateur et centrifuger 15 minutes à 7000g (5000 rpm avec une centrifugeuse Sorvall RC-3 munie un rotor HG-4L). Laver les culots en complétant à 4 L avec du KCl 0.3 M, centrifuger (10 minutes à 7000g). Laver de nouveau les culots, mais avec du KCl 0.1 M cette fois-ci, centrifuger (4 minutes à 7000g). Toutes ces manipulations se font à froid (4°C).
- C) *Extraction au NaHCO_3 .* Laver les culots en complétant à 4 L en ayant NaHCO_3 5 mM et KCl 0.1 M et en agitant à température ambiante pendant 30 minutes. Centrifuger (4 minutes à 7000g).
- D) *Extraction au KCl.* Laver les culots en complétant à 4 L avec KCl 0.1 M froid, centrifuger (4 minutes à 7000g). Répéter cinq fois cette opération.
- E) *Extraction à l'eau.* Laver les culots en complétant à 4 L avec de l'eau distillée froide, centrifuger (4 minutes à 7000g). Répéter cinq fois cette opération.

- F) *Extraction à l'acétone.* Laver les culots dans 4 L d'acétone en mélangeant bien à la main et en effritant les gros morceaux. Filtrer sans essorer. Répéter cette opération deux ou trois fois, ou jusqu'à ce que l'acétone ne soit plus savonneuse.
- G) *Séchage.* Laisser sécher la poudre quelques heures sur un papier buvard. Le rendement est d'environ 35 g par kilogramme de muscle. Cette poudre acétonique se conserve plusieurs mois au congélateur.

2.2.2 Extraction de l'actine à partir de la poudre acétonique

Cette étape dans la préparation de l'actine est celle de Spudich et Watt (1971) modifiée par Nonomura *et al.* (1975). Nous avons modifié légèrement ce protocole de façon à augmenter le rendement afin d'obtenir de l'actine très concentrée pour réaliser la purification en chromatographie liquide (voir section 2.2.3). La procédure expérimentale se fait comme suit:

- A) *Extraction.* Prendre 3.0 à 3.5 g de poudre acétonique et ajouter 150 mL de tampon G frais, très froid. Laisser agiter régulièrement sur glace pendant 45 à 60 minutes puis filtrer deux fois sur Buchner avec du papier Whatman #4 et #5 respectivement. Centrifuger une heure à 4°C à 120000g (40000 rpm avec une ultracentrifugeuse Beckman L8-M munie d'un rotor 70.Ti).
- B) *Polymérisation.* Ajouter au surnageant du $MgCl_2$ en solution à 100 mM pour obtenir 2 mM. Laisser agiter 15 à 20 minutes à température ambiante.
- C) *Lavage au KCl: enlèvement de la tropomyosine.* Ajouter lentement du KCl en poudre à la solution pour avoir 0.6M. Placer au réfrigérateur et laisser agiter doucement toute la nuit.

- D) *Sédimentation de l'actine filamenteuse.* Centrifuger la solution d'actine-F pendant 2 heures à 120000g à 4°C. Jeter le surnageant et rincer les tubes deux fois avec du tampon G avant de décoller les culots. Pour faciliter le décollement des culots, il est possible de placer les tubes avec un peu de tampon G qui recouvre les culots sur glace pendant 30 à 60 minutes. Récupérer les culots et resuspendre avec un homogénéisateur en teflon dans 10 à 15 mL de tampon G. Le volume de tampon ajouté à cette étape est déterminant pour la concentration finale de l'actine.
- E) *Dépolymérisation.* Mettre en dialyse à 4°C pour 24 à 48 heures en changeant de 2 à 4 fois le tampon avec du tampon G frais. Centrifuger 2 heures à 120000g à 4°C. Doser le surnageant en spectrophotométrie à 290 nm; $\epsilon=0.63 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Ce protocole permet d'obtenir 10 à 15 mL d'actine-G à une concentration d'environ 10 mg/mL et à environ 85-90% de pureté. L'actine-G ne se conserve pas longtemps, mais on peut augmenter sa conservation jusqu'à 7-8 jours en la maintenant sur glace au réfrigérateur.

2.2.3 Purification de l'actine

Cette dernière étape nous permet d'obtenir de l'actine à $\approx 98\%$ de pureté. C'est la méthode de Fowler et Bennett (1984), modifiée selon nos besoins, qui a été employée. Nous verrons dans les lignes qui suivent le protocole détaillé de la purification en chromatographie liquide d'exclusion, le profil d'élution de l'actine, les tests de gélification effectués sur les fractions recueillies, le tracé électrophorétique de l'actine purifiée et, finalement, les caractéristiques de l'actine purifiée.

2.2.3.1 Description du protocole

L'actine est purifiée sur une colonne de 1 L (Pharmacia Fine Chemicals, Suède) remplie avec de l'Ultrogel ACA 44 (LKB Products, Suède). La colonne, placée à 4°C, est montée avec une pompe péristaltique (modèle P-3 de Pharmacia Fine Chemicals, Suède) et la poussée est contre la force gravitationnelle (i.e. l'élution se fait du bas vers le haut de la colonne).

Avant d'effectuer le dépôt, on purge le gel toute la nuit avec du tampon G frais. Afin de ne pas saturer la colonne, pas plus de 100 mg ou 10 mL (le premier maximum atteint) d'actine doivent être déposés. Suite au dépôt, ≈ 3 mL de tampon G sont pompés.

Le tampon d'élution est le tampon G_{aca}: ce tampon diffère du tampon G avec 20 mM de KCl et ≈ 1 % de bleu de bromophénol en plus. Le KCl est pour faire obstacle aux effets de charges qui peuvent nuire à une bonne résolution dans les tampons de faible force ionique (Fowler et Bennett, 1984). Le bleu de bromophénol n'est ni plus ni moins qu'un marqueur qui colore le tampon, de cette façon, une erreur d'inattention est improbable et le rinçage de la colonne est complet quand il n'y a plus de coloration bleu (le Kd du bleu de bromophénol est de 1). La vitesse d'élution est fixée à 0.5 mL/min et des fractions de 4 mL chacune sont recueillies.

L'actine est recueillie à un volume d'élution d'environ 200 mL et on dose les fractions en spectrophotométrie à 290 nm.

2.2.3.2 Profil d'élution

Un spectrophotomètre à flux continu (Single Path Monitor UV-1 de Pharmacia Fine Chemicals, Suède, relié à une table traçante Kipp and Zonen BD-40) était branché sur le montage. Le profil d'élution à 280 nm semble montrer qu'il y a

seulement un pic de détectable. Cependant, lorsqu'on observe de plus près ce pic, on se rend compte qu'il est asymétrique, et qu'il est constitué de deux maxima d'absorption qui se chevauchent. Ces deux maxima deviennent facilement distinguables lorsqu'on augmente la sensibilité du spectrophotomètre, la vitesse de déroulement du papier de la table traçante et lorsqu'on diminue la quantité d'actine déposée (voir figure 2.1).

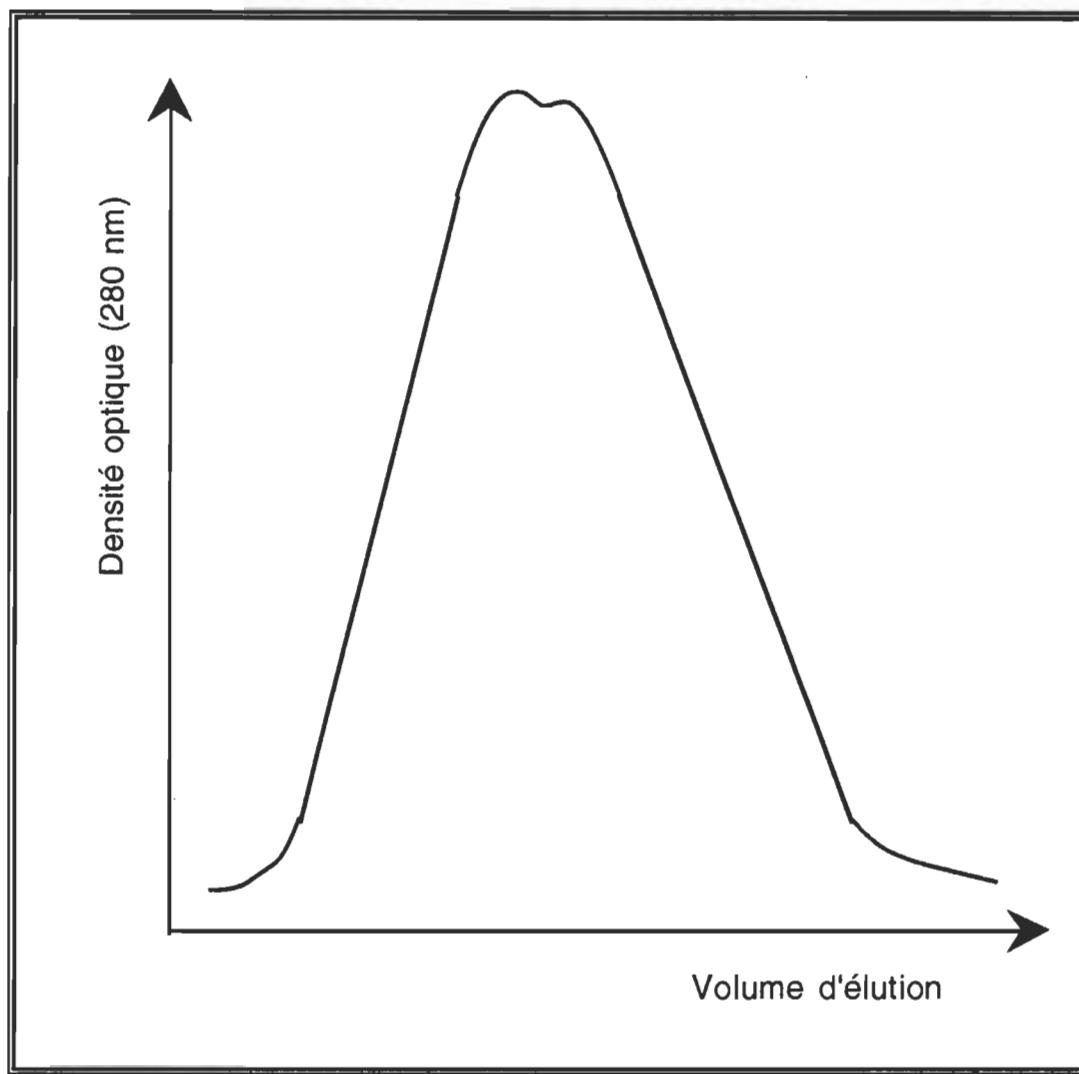


Figure 2.1: Profil d'élution de l'actine lors de sa purification sur gel d'exclusion en chrotamographie liquide (Ultrogel ACA 44). Vitesse d'élution = 0.5 mL/min, densité optique mesurée à 280 nm.

2.2.3.3 Test de gélification

Pour chaque fraction recueillie, un test de gélification était effectué. Ce test nous donne un indice de la "viabilité" de l'actine fraîchement purifiée. Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, l'actine polymérisé et a tendance à former des paracristaux lorsqu'on augmente la force ionique du milieu. Ce faisant, la viscosité de la solution est d'autant augmentée. Or, ce test de gélification est en réalité une mesure de microviscosimétrie qui indique la capacité de l'actine à polymériser et qui reflète la vitalité des monomères d'actine. Ainsi, les fractions, ou même toute la préparation, qui n'avaient pas un test de gélification satisfaisant étaient jetées.

Ce test est réalisé en mélangeant 90 μL d'actine à 1 mg/mL avec 90 μL de tampon G frais et 20 μL de solution 1/10 (KCl 1 M + MgCl_2 20 mM). Ce mélange est immédiatement pipetté dans un tube capillaire de 100 μL et le bas du tube est bouché avec de la plasticine. Par la suite, on laisse reposer les tubes à la verticale pendant une heure et demi pour que la polymérisation soit complète. Finalement, la viscosité relative est mesurée en chronométrant le temps de chute d'une bille d'acier inoxydable de 0.25 mm de diamètre.

Les résultats du test de gélification sont assez surprenants. On observe sur la figure 2.2 que la viscosité augmente en fonction du volume d'élution. Au début, dès qu'il y a de l'actine qui commence à être éluée, elle ne gélifie pas. Par contre, la viscosité augmente de façon exponentielle au fur et à mesure que l'on se rapproche de la dernière fraction qui contient de l'actine.

Compte tenu de ces résultats de gélification, seulement les dernières fractions étaient conservées pour fin de manipulation, c'est-à-dire les fractions après la fraction ayant une absorbance maximale. En général, les fractions conservées étaient mélangées pour effectuer un cycle de polymérisation-dépolymérisation afin d'homogénéiser la préparation d'actine utilisée et augmenter la

concentration de cette préparation. La polymérisation s'effectuait en ajoutant du tampon G frais, du KCl 50 mM et du MgCl₂ 1 mM (concentrations finales) et en agitant doucement toute une nuit à 4°C. La dialyse était utilisée pour la dépolymérisation et les culots d'actine filamenteuse étaient resuspendus dans un volume de tampon G précis de façon à obtenir la concentration voulue pour notre solution de travail (voir section 2.2.2 pour des procédures plus précises sur la polymérisation et dépolymérisation). Cette dernière solution était conservée sur glace et était utilisée dans les 7 jours qui suivaient.

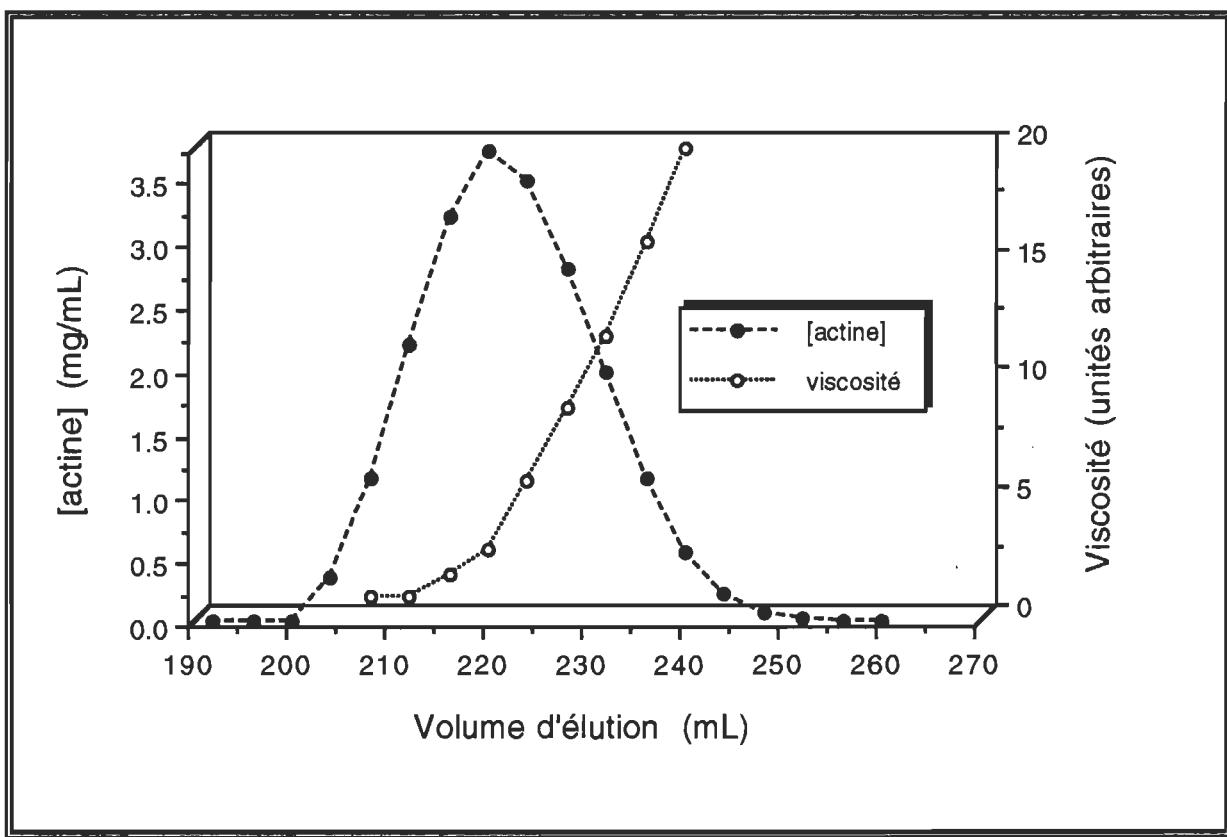


Figure 2.2: Graphique de la concentration d'actine et de la viscosité des fractions recueillies (4 mL) lors de la purification de l'actine sur gel de filtration en fonction du volume d'élution. La concentration de l'actine est déterminée en spectrophotométrie à 290 nm et la viscosité est déterminée en mesurant le temps de chute d'une bille d'acier inoxydable de 0.25 mm dans un tube capillaire. Les unités arbitraires de la viscosité sont en réalité le temps de chute de la bille en seconde.

Le lecteur intéressé trouvera un excellent article de revue sur les techniques de préparation et de purification de l'actine dans "Methods in Enzymology" (Pardée et Spudich, 1982).

2.2.3.4 Electrophorèse

Une électrophorèse a été effectuée avec les diverses fractions d'actine purifiée et l'actine non-purifiée avec un appareil Protean II (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) sur gel de polyacrylamide-sulfate dodecyl de sodium (SDS-PAGE). Le chlorure d'argent a été utilisé comme agent colorant.

Au niveau du tracé électrophorétique des fractions de l'actine purifiée en chromatographie liquide, les résultats sont les mêmes pour toutes les fractions analysées: seulement deux bandes sont révélées et les poids moléculaires respectifs de ces deux bandes sont les mêmes pour toutes les fractions (voir figure 2.3). La première bande ayant un poids moléculaire de 42.5 ± 0.4 kd représente environ 98% du matériel; cette bande correspond à l'actine. La seconde bande, une impureté de 39.5 ± 0.8 kd, contamine notre solution à environ 2%. Ces résultats sont tout-à-fait en accord avec les résultats de Pardée et Spudich (1982). Selon ces mêmes auteurs, la bande de 39.5 kd est probablement due à un fragment de la chaîne légère de la myosine ou à un gros fragment d'actine protéolysé. En effet, une mauvaise extraction de la myosine lors de la préparation de la poudre acétonique ou une contamination bactérienne conférant une activité protéolytique à la préparation d'actine seraient les deux principales sources de cette contamination.

La figure 2.3 donne aussi l'électrophorégramme d'un aliquot de la solution d'actine non-purifiée (puits D), c'est-à-dire la préparation après extraction de la poudre acétonique. On observe dans ce puits jusqu'à 14 bandes ayant des poids moléculaires allant de 14.3 à 96.9 kd. La bande principale, celle de l'actine, se situe à 42.5 kd et représente environ 85-90 % du matériel.

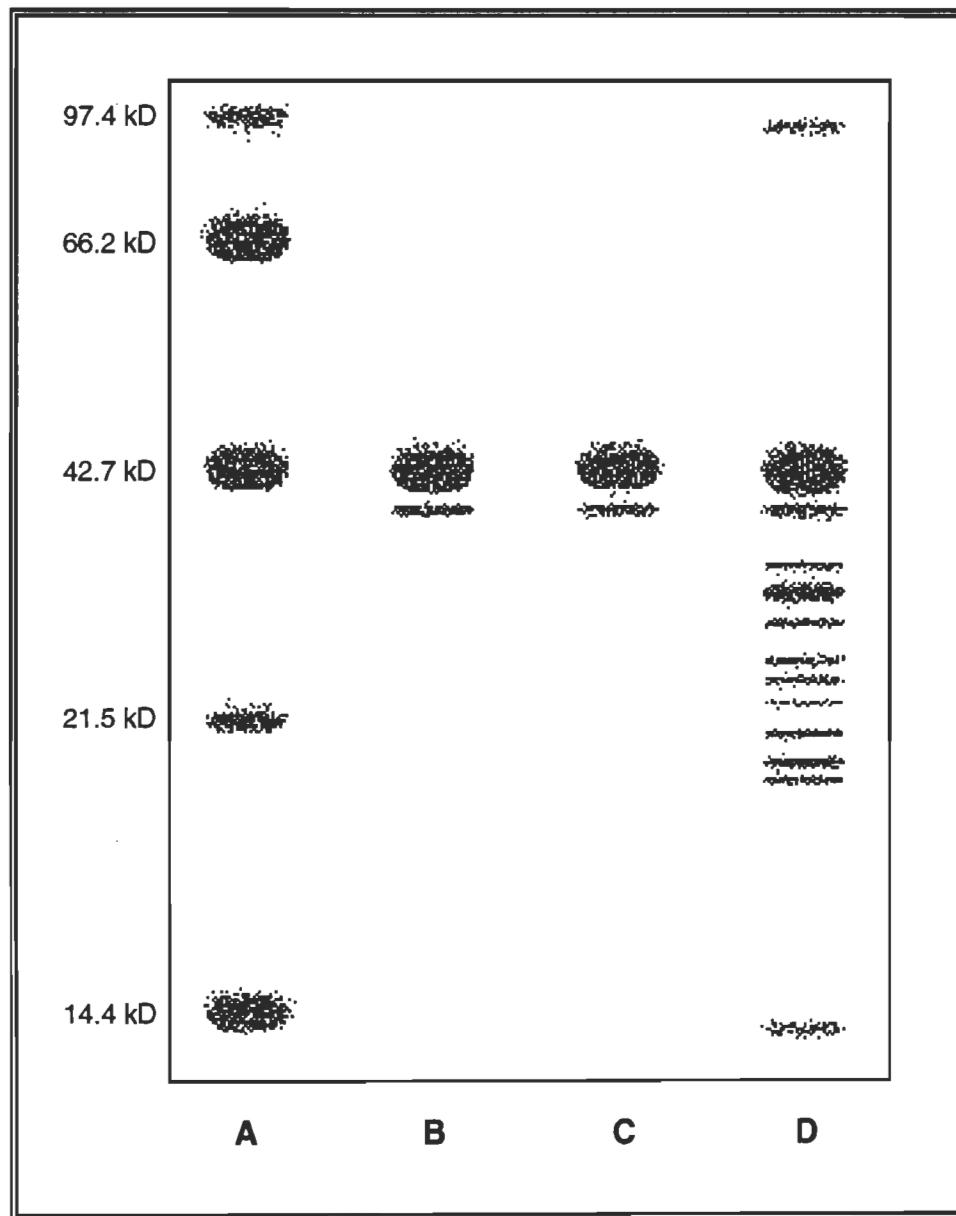


Figure 2.3: Reproduction du tracé électrophorétique de diverses fractions d'actine sur gel SDS-PAGE. Puits A: marqueurs; B et C: fractions d'actine purifiée sur Ultrogel ACA-44 avant et après (respectivement) le maxima d'absorption asymétrique; D: aliquot d'actine avant purification.

2.2.3.5 Caractéristiques de l'actine purifiée

Comme nous l'avons vu dans les sous-sections précédentes, l'actine des diverses fractions n'a pas tout à fait les mêmes caractéristiques. On peut donc se poser la question suivante: pourquoi le profil d'élution est-il asymétrique et que seules les dernières fractions polymérisent convenablement?

Malheureusement, aucune réponse précise ne peut être rendue à l'heure actuelle. D'une part parce que la littérature ne fait pas mention de ce profil d'élution asymétrique, et d'autre part parce que nous n'avons pas fait d'analyses plus approfondies à ce sujet car ce n'est pas l'objectif du projet de recherche.

Toutefois, on peut émettre certaines hypothèses. Les résultats suggèrent qu'il y a deux populations d'actine qui semblent s'éluer lors de la purification: une qui gélifie bien et l'autre qui semble polymériser partiellement ou, du moins, ne semble pas former un réseau dense de filaments. Les premières fractions, celles qui ne gélifient pas, pourraient contenir une actine-ADP ou une actine partiellement dénaturée, ce qui expliquerait qu'elle polymérise moins bien. Une autre hypothèse est que nous sommes en présence d'une actine acylée, donc d'une actine ayant un poids moléculaire légèrement supérieur qui possèderait une plus faible activité de "crosslinking" entre filaments. Mais jusqu'à quel point l'actine du muscle de lapin est-elle acylable?

2.3 Préparation des liposomes

Il existe plusieurs méthodes de fabrication de liposomes. Cependant, il nous fallait une méthode qui soit reproductible et qui donne des vésicules unilamellaires. Ces deux critères sont très importants en calorimétrie différentielle à balayage puisque l'allure de la courbe de fusion des lipides dépend en partie de la méthode de préparation des liposomes (voir section 2.4.4). La méthode retenue est la congélation-décongélation jumelée à l'ultrafiltration.

Cette méthode de préparation offre plusieurs avantages: reproductibilité, unilamellarité et homogénéité de la taille des liposomes produits. Cependant, le désavantage majeur de cette technique est que les liposomes sont de petite taille, ce qui devient un inconvénient certain en microscopie électronique pour l'observation d'une interaction entre les filaments d'actine et les liposomes. Ce sujet sera traité plus en détail dans la section résultat.

Nous avons donc fabriqué deux types de liposomes: des petits liposomes par la technique combinée de congélation-décongélation et ultrafiltration pour utiliser en calorimétrie différentielle à balayage, et des gros liposomes par congélation-décongélation seulement pour utiliser en microscopie électronique.

2.3.1 La congélation-décongélation

Une suspension brute de lipides en solution aqueuse donne de grosses vésicules multilamellaires. Ces vésicules sont caractérisées par un grand nombre de bicouches phospholipidiques superposées et très peu hydratées. On donne l'abréviation anglaise de MLV (multilamellar vesicles) à ces vésicules que l'on schématisé souvent en faisant référence à des pelures d'oignon (Mayer *et al.*, 1985).

Lorsque l'on soumet des MLV à des cycles de congélation-décongélation, d'importants changements surviennent au niveau de la morphologie et des propriétés des liposomes: Nayar *et al.* (1984) ont montré que des cycles répétés de congélation-décongélation augmentent considérablement l'hydratation entre les bicouches et entre les têtes polaires des lipides; Mayer *et al.* (1985) ont observé une augmentation importante du volume et du taux d'encapsulation et ont montré que la congélation-décongélation permet une meilleure distribution des solutés, c'est-à-dire l'atteinte d'un état d'équilibre au niveau des concentrations des solutés intra et extravésiculaires; Hope *et al.* (1985) ont

observé que la taille des vésicules devenaient beaucoup plus uniforme; et enfin, Mayer *et al.* (1986) ont montré une augmentation considérable du degré d'unilamellarité des vésicules.

Le mécanisme par lequel ces changements surviennent est relativement simple à visualiser. Lors de la congélation, le volume de l'eau augmente d'environ 10% dû à la cristallisation, cette augmentation provoque un éclatement des MLV qui est suivi par une restructuration des vésicules et, par le fait même, un changement de morphologie au moment de la décongélation (Lichtenberg et Barenholz, 1987). On atteint un maximum d'effet avec environ 5 cycles de congélation-décongélation.

Ces vésicules traitées par des cycles de congélation-décongélation ont leur abréviation de OLV (oligolamellar large vesicles). Elles sont caractérisées par de grosses vésicules, de tailles inhomogènes, qui sont plurilamellaires et qui possèdent des inclusions.

2.3.2 L'ultrafiltration

L'ultrafiltration n'est pas une technique de fabrication de liposomes en soit, elle est plutôt une méthode de transformation de liposomes, c'est-à-dire que pour l'utiliser nous devons déjà être en présence de liposomes (SUV, LUV ou OLV). Il est très difficile d'obtenir des liposomes ultrafiltrés à partir d'une suspension brute de lipides (MLV) pour la simple raison que les agrégats lipidiques bouchent le système (Pigeon, 1988).

Le principe de cette technique est simple: il s'agit de faire passer les vésicules au travers d'un filtre de polycarbonate dont les pores sont calibrés à la grandeur voulue. Cette technique est rapide et très efficace. Les vésicules obtenues sont des SUV (small unilamellar vesicles) et elles sont caractérisées par un excellent

degré d'unilamellarité (dépendamment de la taille des pores du filtre utilisé), un bon taux d'encapsulation et une population de taille très homogène (Hope *et al.*, 1985; Mayer *et al.*, 1986; Pigeon, 1988).

2.3.3 Protocole de fabrication

Les *MLV* sont obtenues en dissolvant 80 mg de lipide dans environ 5 mL de chloroforme. Le chloroforme est par la suite évaporé sous un vide réduit au rotoévaporateur pendant environ 30 minutes de façon à obtenir un film de lipide sur la paroi du ballon. Afin d'enlever toute trace de solvant, le ballon est placé dans une cloche de verre sous un vide poussé pendant un minimum de 90 minutes. On obtient les *MLV* en ajoutant 8 mL de tampon G et quelques billes de verre dans le ballon et en plaçant ce dernier au rotoévaporateur sous atmosphère d'azote dans un bain thermostaté au-dessus de la température de transition du lipide utilisé, en laissant agiter vigoureusement quelques minutes.

Les *OLV* sont obtenues en transférant immédiatement les *MLV* dans un tube Nalgene Cryovial de 10 mL et en faisant subir à la solution 4 cycles de congélation-décongélation. La congélation est réalisée dans l'azote liquide à -196°C. On décongèle dans un bain thermostaté au-dessus de la température de transition du lipide utilisé, suivi d'un vortex vigoureux avant la prochaine congélation.

Les *SUV* sont obtenues en faisant passer cinq fois la solution de *OLV* dans un appareil à ultrafiltration (The Extruder de Lipex Biomembranes Inc., Vancouver, Canada) équipé avec deux épaisseurs de filtre de polycarbonate ayant des pores de 400 nm (Nuclepore Corporation, Pleasanton, CA, USA). Tout ce montage est placé dans un bain thermostaté au-dessus de la température de transition du lipide utilisé.

La conservation des liposomes se fait comme suit: immédiatement après la fabrication des OLV (pour la microscopie électronique) ou des SUV (pour la calorimétrie différentielle à balayage), des aliquots de liposomes sont pipettés dans des tubes Eppendorf, congelés dans l'azote liquide et placés au congélateur. Lors de l'utilisation subséquente des liposomes, ceux-ci sont décongelés rapidement dans un bain thermostaté au-dessus de la température de transition du lipide utilisé, suivi d'un vortex vigoureux.

Ce protocole de conservation n'affecte en rien la structure des SUV car Oser *et al.* (1988) et Anzai *et al.* (1990) ont montré que pour des vésicules bien hydratées et unilamellaires, une décongélation rapide n'entraîne pas de changement de morphologie notable et que le volume intravésiculaire reste constant. Cependant, la décongélation doit être rapide car, selon ces mêmes auteurs, une décongélation lente entraîne une fusion de vésicules. Nos observations en microscopie électronique confirment ces résultats.

2.3.4 Liste des lipides utilisés

Plusieurs types de lipides ont été utilisés, et plus particulièrement pour la microscopie électronique où une étude de l'interaction entre l'actine et différents types de lipides a été faite. En calorimétrie différentielle à balayage, seul le DPPC (Sigma) fut utilisé. Tous les lipides ont été utilisés tel quel, sans analyse de pureté et sans autre purification. Les compagnies d'où proviennent ces lipides sont: Avanti-Polar Lipids (APL) (Birmingham, AL, USA), Serdary Research Laboratories (SRL) (London, Ontario, Canada), Sigma Chemical Co. (St-Louis, Mo, USA) et P.-L. Biochemicals (PLB) (Milwaukee, WI, USA).

Azolectine	Sigma	#P-5638
Phosphatidylcholine de cerveau de boeuf (PCboeuf)	SRL	#A-30
Dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC)	Sigma	#P-6392
Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)	Sigma	#P-6267

Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)	PLB	#6604
Distéaroylphosphatidylcholine (DSPC)	Sigma	#P-6517
Distéaroylphosphatidylcholine (DSPC)	PLB	#6606
Dioléoylphosphatidylcholine (DOPC)	Sigma	#P-1013
Dioléoylphosphatidylcholine (DOPC)	APL	#850375
Stéarylamine (SA)	Sigma	#S-6755

2.4 La calorimétrie différentielle à balayage⁴

Cette section nous permettra de mieux comprendre la calorimétrie différentielle à balayage (DSC; abréviation anglaise utilisée pour Differential Scanning Calorimetry), et de savoir de quelle façon elle a été utilisée dans ce projet de recherche.

Après une brève introduction sur l'historique, les possibilités et les applications de la DSC, le lecteur trouvera aussi dans cette section le principe de la méthode, son fonctionnement et ses caractéristiques comme méthode d'étude des modèles membranaires. Enfin, le protocole technique d'utilisation et les résultats des tests de reproductibilité sur l'appareil utilisé seront donnés.

2.4.1 Introduction

Qu'est-ce que le pain, le chocolat, les membranes et les protéines ont en commun? Il y a sûrement plusieurs réponses intéressantes à cette question, mais dans notre contexte, c'est qu'ils subissent tous d'importantes transformations en les chauffant.

⁴ Les principaux articles de revues consultés pour la rédaction des sections 2.4.1, 2.4.2 et 2.4.3 sont: Biltonen and Freire, 1978; Brown, 1988; Freire *et al.*, 1990; Mabrey and Sturtevant, 1978; Mabrey-Gaud, 1981; Mraw, 1988; McNaughton and Mortimer, 1975; Privalov, 1979.

L'étude de l'effet de la chaleur sur la matière date de longtemps: il y a plusieurs millénaires déjà on utilisait la chaleur pour la production de poterie. Par la suite est venue la fabrication du verre... jusqu'au développement de la thermométrie et de la calorimétrie. C'est à la fin du XIX^e siècle qu'ont eu lieu les premières expériences calorimétriques contrôlées et quantitatives; ceci étant surtout dû à la venue de la balance analytique. De toutes les techniques calorimétriques connues, la DSC (et ses dérivées: par exemple la titration calorimétrique isothermale) est la plus récente. C'est en 1950 que la Société Perkin-Elmer (Norwalk, CT, USA) développa le premier calorimètre différentiel à balayage.

Depuis sa mise en marché, la DSC a suscité beaucoup d'intérêt. Même si cette méthodologie est relativement récente, la littérature sur la DSC est très abondante, et on l'utilise dans des domaines variés: de l'étude du lait et des fromages, des polymères et des cristaux semi-conducteurs, jusqu'aux systèmes biologiques complexes.

La DSC a été utilisée pour déterminer des constantes physiques de substances variées, et aussi, pour mesurer à la fois des enthalpies de réactions chimiques et de changements de phase. Les exemples qui suivent sont choisis de manière à illustrer ses applications possibles:

- détermination d'enthalpies de fusion, vaporisation et sublimation;
- détermination de températures de transition, de point d'ébullition;
- établissement de diagramme de phase;
- évaluation de paramètres cinétiques;
- identification de degré d'hydratation;
- identification de mélange et d'indice de pureté;
- mesures de capacité calorifique;
- mesures de conductivité thermique et électrique;
- mesures de l'émissivité thermique;
- etc.

2.4.2 Principe de la méthode

Lorsque l'on augmente la température d'un matériau, il peut subir un changement d'état physique telle une fusion ou une transition d'une forme cristalline à une autre, ou encore, ce composé peut réagir chimiquement. Dans de tels processus, de la chaleur est soit absorbée (endothermique), soit dégagée (exothermique).

Les DSC sont conçus pour déterminer les enthalpies de ces processus en mesurant le flux de chaleur différentiel nécessaire pour maintenir l'échantillon de matériau et une référence inerte à la même température. Cette température est le plus souvent réglée en programmation linéaire.

Le principe sur lequel repose la DSC est celui de la compensation de puissance. La figure 2.4 schématise les deux boucles de contrôle du système. L'une sert au contrôle de la température: l'échantillon et la référence sont chauffés de façon constante à une vitesse prédéterminée. La seconde boucle permet, lorsqu'une différence de température se produit entre la cellule échantillon et la cellule de référence (à cause d'un processus endothermique ou exothermique), d'ajuster la puissance d'entrée de manière à réduire cette différence. C'est le principe de la compensation de puissance.

De ces deux boucles de contrôle, deux variables sont enregistrées. La première est la température (en abscisse) et l'autre est le courant différentiel appliqué aux résistances des deux cellules (en ordonnée) de façon à maintenir une température identique entre celles-ci. Cette dernière variable se traduit en unité de chaleur que l'on peut finalement calibrer en unité de capacité calorifique (cal/deg).

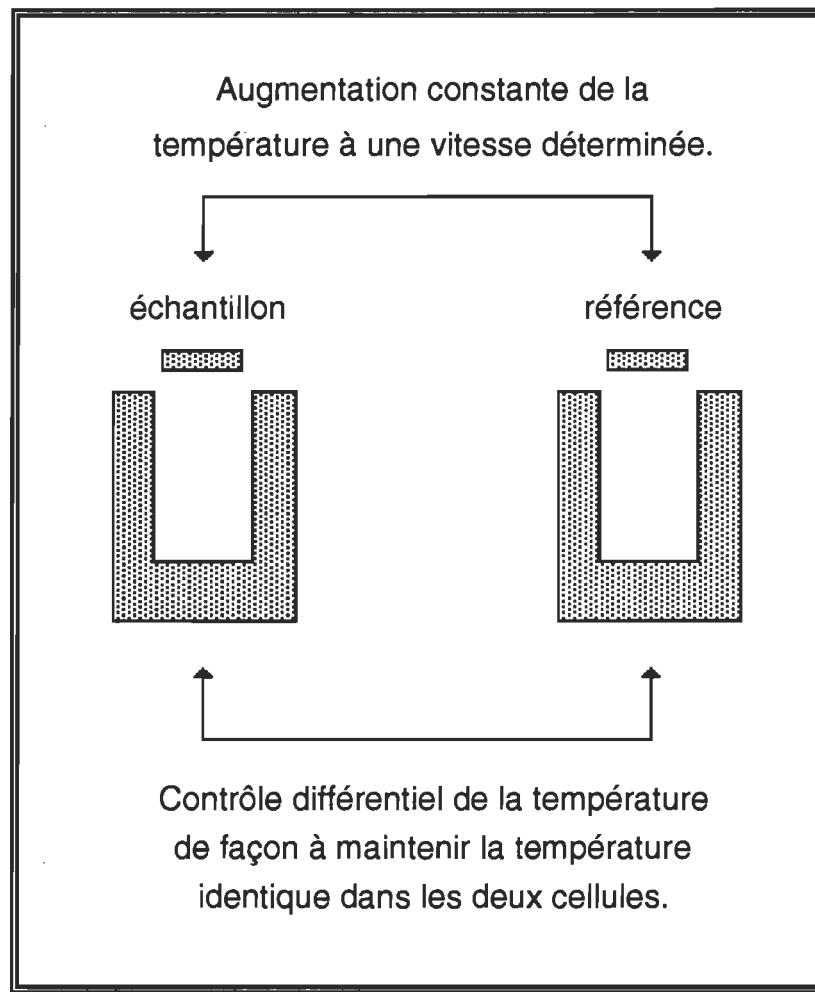


Figure 2.4: Représentation schématique des boucles de contrôle du DSC.

La figure 2.5 montre un thermogramme idéal où l'on retrouve sur l'enregistrement la chaleur différentielle fournie en fonction de la température. Deux paramètres importants peuvent être calculés à partir de ce thermogramme. L'un est la température critique du processus, T_c , où, cinétiquement parlant, 50 % de la population de la substance s'est transformée. L'autre est l'enthalpie, ΔH , qui est obtenue en intégrant l'aire sous la courbe (région hachurée). Par convention, en DSC, tout processus endothermique est signalé par une déviation positive de la ligne de base.

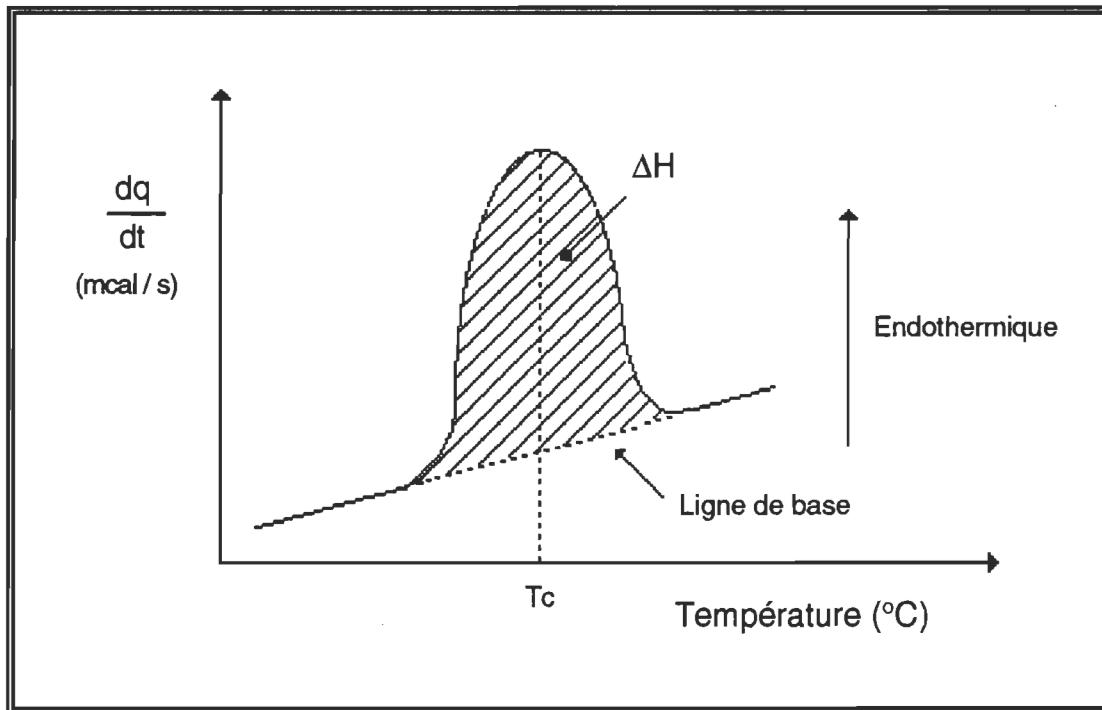


Figure 2.5: Thermogramme DSC idéal. Lorsqu'un processus endothermique se produit, par exemple, le DSC répond en fournissant plus de chaleur à la cellule échantillon de manière à compenser pour le surplus de chaleur absorbée dans cette cellule. Ceci se traduit par une déviation positive de la ligne de base. T_c : température critique du processus; ΔH : enthalpie du processus (aire sous la courbe).

2.4.3 Fonctionnement et caractéristiques de la méthode

Le fonctionnement d'un DSC est assez simple. Tout d'abord, l'appareil est muni de plusieurs éléments: un boîtier de contrôle principal qui règle les fonctions du DSC, une enceinte adiabatique qui contient les deux cellules, une pompe à vide (afin de ne pas mesurer la capacité calorifique de l'air durant le balayage) et un enregistreur. Ainsi, il suffit d'injecter l'échantillon et la référence dans les cellules, d'attendre l'équilibre thermique du système pour enfin procéder au balayage. Ces opérations se réalisent habituellement en un minimum de trois ou quatre heures, dépendamment de la vitesse de balayage et de l'écart de température sur lequel on effectue le balayage.

Les caractéristiques du DSC en font une technique très avantageuse. C'est une méthode relativement rapide et directe: peu de traitements des données sont nécessaires et les résultats sont obtenus directement du thermogramme. Aucune sonde ou marqueur moléculaire ne vient perturber le système à l'étude. Très peu d'échantillon est nécessaire pour réaliser une expérience: quelques µg suffisent. D'où sa grande sensibilité de l'ordre de la microcalorie puisque qu'un DSC détecte des enthalpies d'environ 1 cal/g (d'ailleurs on nomme souvent un DSC un microcalorimètre). Un entretien minime est requis, comparativement à d'autres méthodes où des réactifs et matériaux sont nécessaires à chaque manipulation. Cette technique est aussi polyvalente et facile d'emploi, surtout avec les nouveaux DSC qui sont pourvus d'un refroidisseur et où le traitement des données est informatisé.

Cependant, cette technique seule ne suffit pas, il faut la jumeler avec d'autres méthodes, car très peu d'informations sur la structure et la dynamique du système à l'étude sont obtenues. De plus, pour des valeurs très précises, il faut faire beaucoup de correction. Par exemple, la valeur de l'enthalpie mesurée augmente, quoique faiblement, de façon linéaire avec une vitesse de balayage croissante (Armand et Vergnaud, 1988; Marini *et al.* 1988). Pour obtenir la valeur "absolue" de l'enthalpie, il faut l'extrapoler à une vitesse de balayage nulle (Ratna et Chandrasekhar, 1988).

Dans l'ensemble, c'est une technique très efficace et reproductible qui jouit actuellement d'une grande popularité dans le domaine de la recherche. D'autant plus que sa technologie et ses applications s'améliorent d'année en année.

2.4.4 La DSC et les membranes ⁵

Comme nous l'avons vu à la section 1.2.3, les bicouches phospholipidiques changent de phase à leur température de transition, passant d'un état gel à un état liquide-cristallin. Cette transition ordre-désordre est endothermique et possède une enthalpie variant de la kilocalorie à une dizaine de kilocalories par mole de lipide. Ainsi, il est tout indiqué d'utiliser la DSC comme méthode d'étude des membranes.

Nous nous attarderons dans cette section seulement à la transition de phase des membranes artificielles composées de phospholipides synthétiques ayant deux chaînes hydrocarbonées saturées identiques, et ce, plus particulièrement pour le DPPC qui a été utilisé au cours de ce projet et qui a été fréquemment utilisé dans la littérature. Nous verrons par la suite le comportement de la transition de phase en présence de protéines.

2.4.4.1 Les membranes modèles lipidiques

Comme il a été représenté à la figure 1.7 du chapitre 1, les bicouches sont caractérisées par un changement d'état gel à liquide-cristallin en fonction d'une augmentation de la température. Ces deux phases, que l'on dénote L_β et L_α pour les états gel et liquide-cristallin respectivement, sont propres à la plupart des phospholipides tels les acides phosphatidiques (PA) et les phosphatidyl-éthanolamines (PE).

Cependant, les phosphatidylcholines (PC), tel le DPPC, ont une transition plus complexe. L'état gel est légèrement différent et comporte, en plus, une

⁵ Les principaux articles de revue consultés pour cette section sont: Bach, 1984; Blume, 1988; Blume, 1991; Mabrey-Gaud, 1981; McElhaney, 1982; McElhaney, 1986; Schwarz et Kirchhoff, 1988; Wilkinson et Nagle, 1981.

phase intermédiaire. La phase gel, dénommée ici $L\beta'$, est caractérisée par les molécules de lipides qui font un angle de 30° relativement à la normale de la bicouche. La phase intermédiaire ($P\beta'$) qui apparaît à plus haute température montre une bicouche qui se déforme en un arrangement périodique sinusoïdal ou plus probablement en "dents de scie" (Blume, 1991). La figure 2.6 schématisé l'arrangement moléculaire de chacune des ces phases.

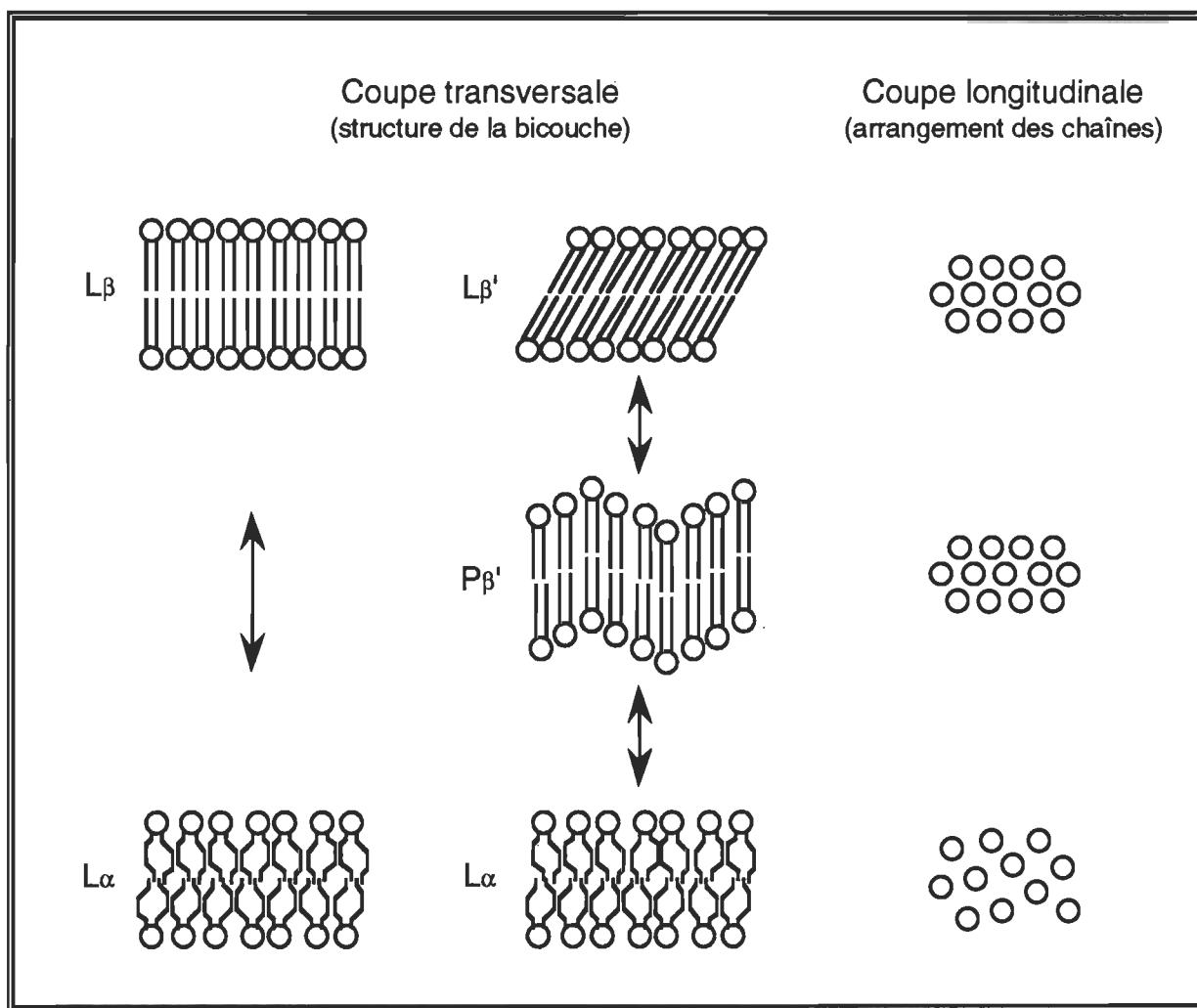


Figure 2.6: Représentation schématique des transitions de phase thermotropiques des phospholipides. A gauche, les phases correspondant à la plupart des phospholipides; au centre, les phases pour les PC ayant deux acides gras saturés identiques; et à droite, l'arrangement des chaînes acylées de chacune des phases (Blume, 1991).

Le passage de la phase $L\beta'$ à la phase $P\beta'$ est nommé "prétransition", tandis que celle de $P\beta'$ à $L\alpha$ (ou $L\beta$ à $L\alpha$ pour les lipides autres que les PC comportant deux chaînes saturées identiques) est nommé "transition de phase principale" ou simplement "transition de phase".

La DSC a été beaucoup utilisée pour étudier les transitions de phase des lipides. La figure 2.7 représente un thermogramme type de fusion d'une bicouche de PC synthétique montrant la prétransition et la transition principale.

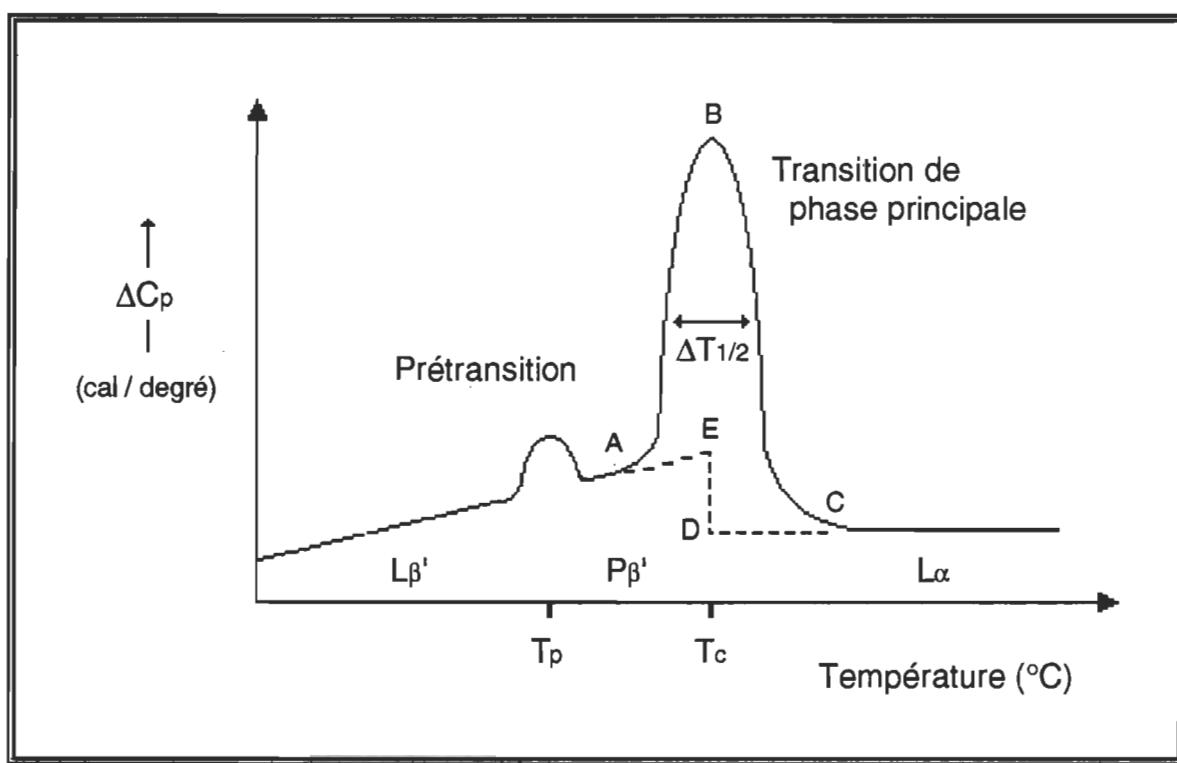


Figure 2.7: Thermogramme type des PC composées de deux chaînes hydrocarbonées saturées identiques.

D'un tel type de thermogramme, plusieurs informations peuvent être tirées sur les propriétés thermodynamiques des transitions de phases des phospholipides. Au niveau de la prétransition, la température critique (T_p) se mesure directement et l'enthalpie (ΔH_{cal}^p) s'obtient en intégrant l'aire sous la courbe. Pour la transition de phase principale, on retrouve aussi la température critique (T_c) et

l'enthalpie (ΔH^C_{cal}) qui correspond à l'aire délimitée par les points A-B-C-D-E. La distance D-E fournit la variation de capacité calorifique (ΔC_p) entre les phases gel et liquide-cristalline, et à partir de la largeur à mi-hauteur ($\Delta T_{1/2}$), il sera possible de calculer le degré de coopérativité intermoléculaire entre les molécules de phospholipide dans le processus de transition. Ce degré s'obtient en approximant l'enthalpie de van't Hoff par l'équation $\Delta H_{vH} \approx 4RT_c^2 / \Delta T_{1/2}$ et en calculant le ratio $CU = \Delta H_{vH} / \Delta H^C_{cal}$ (McElhaney, 1982). Le ratio (CU) donne le nombre d'unités coopératives en terme de molécules. Pour un processus idéal, CU tend vers l'infini, mais expérimentalement les valeurs types de CU varient de 20 à 2000 selon le degré de pureté et la structure chimique des lipides (Blume, 1991). En fait, ce n'est pas la valeur numérique de CU qui importe le plus, mais plutôt son comportement relatif suivant les fluctuations des conditions expérimentales.

Dans le cas du DPPC, les températures de transition sont de l'ordre de $T_p \approx 35^\circ\text{C}$ pour la prétransition et $T_c \approx 42^\circ\text{C}$ pour la transition principale, tandis que les enthalpies (ΔH_{cal}) sont environ 1.5 et 8 kcal/mole respectivement (Blume, 1991).

Plusieurs facteurs peuvent faire varier l'allure d'un thermogramme. Il y a évidemment la structure chimique des phospholipides (têtes polaires et chaînes acyliques), tel qu'il a été discuté au chapitre 1, mais les conditions expérimentales sont aussi un facteur important. Le pH et la liaison avec certains ions peuvent faire varier la température de transition et/ou l'enthalpie de fusion (Bach, 1984; Blume, 1991). La méthode de préparation des liposomes peut aussi influencer la transition de phase de lipides (Bach, 1984; Epanet et Raymer, 1987). Ceci met en évidence l'importance de travailler dans des conditions constantes en microcalorimétrie des membranes modèles. Enfin, il y a toutes les autres substances ou molécules qui peuvent interagir avec la bicouche, telles les protéines. La DSC peut, par conséquent, être une technique avantageuse dans l'étude des interactions protéines-lipides.

2.4.4.2 Les systèmes membrane-protéines

L'introduction de protéines qui interagissent avec la bicouche provoque des modifications à la transition de phase de lipides. Plusieurs travaux réalisés avec des protéines dont les mécanismes d'interaction avec les membranes sont connus ont montré que la température de transition et l'enthalpie de fusion sont modifiées différemment suivant la nature de l'interaction.

Bach (1984) et McElhaney (1986) dans des articles de revue sur les interactions lipides-protéines montrent qu'il est possible de déterminer la nature de l'interaction par DSC selon les trois types d'interaction proposés par Papahadjopoulos (voir figure 1.5).

Selon ces auteurs, pour les interactions de type 1, T_c et $\Delta T_{1/2}$ restent constants ou augmentent légèrement, tandis que ΔH^c_{cal} augmente peu et de façon progressive avec la quantité de protéines. Les protéines de type 2 font décroître T_c , font augmenter $\Delta T_{1/2}$ et produisent une diminution considérable et progressive de ΔH^c_{cal} . Enfin, les protéines de type 3 ont peu ou pas d'effet sur T_c et $\Delta T_{1/2}$, mais provoquent un abaissement important et linéaire de ΔH^c_{cal} avec une quantité croissante de protéines. Dans tous les cas, une disparition complète de la prétransition surviendra rapidement avec des fractions molaires protéines/lipides même faibles. La figure 2.8 résume schématiquement ces modifications.

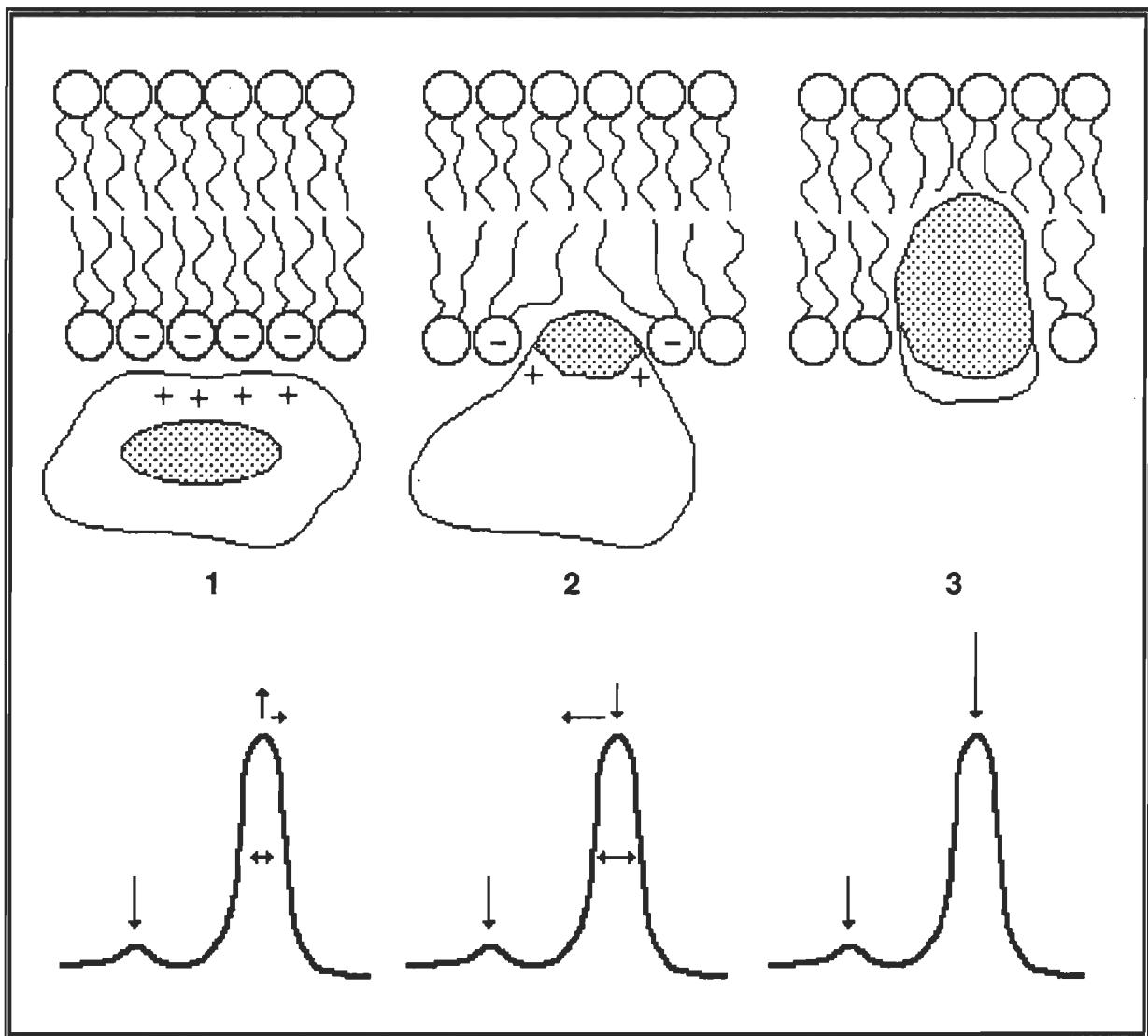


Figure 2.8: Modifications des thermogrammes de fusion des PC suivant les divers types d'interaction protéine-lipide (voir texte). L'amplitude des modifications est donnée sous forme vectorielle (flèches).

2.4.5 Protocole d'utilisation du DSC

Tous les thermogrammes ont été obtenus sur un DSC Microcal MC 1 (Microcal Inc., Amherst, Maine, USA) à une vitesse de balayage de 40°C/hr. Le volume d'échantillon injecté dans les cellules est de $918.4 \pm 0.9 \mu\text{L}$ et la cellule de référence renfermait tout ce que la cellule échantillon contenait, à l'exception des liposomes; ceux-ci étant remplacés par du tampon-G. La concentration des lipides était de 2 ou 4 mg/ml.

La séquence habituelle pour effectuer les mélanges était: liposomes, tampon-G, actine et sels, avec une période de repos avant l'ajout des sels. Les solutions étaient mélangées et incubées au-dessus de la température de transition du lipide pour une période d'environ 15 à 30 min, et un dégazage de 15 min sous un vide réduit était effectué avant d'injecter les solutions dans les cellules. Une fois l'équilibre thermique du système atteint (habituellement entre 1 et 2 hres), l'enregistrement du thermogramme était réalisé.

La calibration des axes a été réalisée à l'aide d'un chronomètre en abscisse et avec la fonction "Calibration pulse" de l'appareil en ordonnée. L'intégration des aires sous la courbe a été réalisée avec la technique du découper-peser.

2.4.6 Reproductibilité de la méthode

Afin de s'assurer de la reproductibilité de la méthode et des manipulations, une série de thermogrammes de fusion du DPPC a été enregistrée. Ces tests, au nombre de cinq chacun, ont été réalisés de trois façons, nous donnant trois niveau d'incertitude:

- A) le même échantillon analysé cinq fois;
- B) cinq échantillons provenant d'une même préparation de liposomes;
- C) cinq échantillons provenant de cinq préparations de liposomes.

Le tableau 2.1 ci-dessous résume les résultats obtenus au niveau de la température de transition principale et des enthalpies de la prétransition et de la transition principale.

	Essai	T _c (°C)	ΔH ^P _{cal} (kcal/mole)	ΔH ^C _{cal} (kcal/mole)
A	1	40.62	0.52	6.92
	2	40.56	0.46	7.01
	3	40.55	0.58	6.85
	4	40.64	0.54	7.07
	5	40.62	0.50	7.04
Moyenne		40.60 ± 0.04	0.52 ± 0.04	6.98 ± 0.09
B	1	40.58	0.64	7.06
	2	40.62	0.58	7.44
	3	40.53	0.63	8.25
	4	40.38	0.52	7.74
	5	40.51	0.59	7.15
Moyenne		40.52 ± 0.09	0.59 ± 0.05	7.53 ± 0.48
C	1	40.55	0.64	6.78
	2	41.10	0.46	6.19
	3	41.16	0.48	7.22
	4	40.69	0.79	7.88
	5	40.64	0.41	7.44
Moyenne		40.83 ± 0.20	0.56 ± 0.16	7.10 ± 0.65

Tableau 2.1: Résultats des tests de reproductibilité des variables expérimentales obtenues en calorimétrie différentielle à balayage avec du DPPC à 2 mg/ml (voir texte).

En analysant ce tableau, il ressort que les erreurs sont purement additives. Par exemple, pour ΔH^C_{cal} l'écart-type sur la valeur moyenne obtenue varie de 1%, 6% à 9% pour les séries A, B à C respectivement. La méthode en soit semble assez bien reproductible (en A) car les écart-types ne représentent que quelques pourcents seulement. Cependant, ce sont surtout les erreurs volumétriques qui semblent être nettement plus importantes (B et C),

particulièrement dans l'utilisation de préparations de liposomes différentes (C). Il est à noter que les variations de T_p et $\Delta T_{1/2}$ sont du même ordre de grandeur de celles de T_c (résultats non illustrés). Enfin, on peut aussi remarquer qu'il y a près de 30% d'incertitude sur la valeur calculée de l'enthalpie de prétransition (ΔH_{cal}^p) dans la série C.

En regard de ces résultats, il a été de mise au cours du projet de travailler autant que possible avec une même préparation de liposomes pour une série d'expériences et de ne pas associer une trop grande importance à l'interprétation des valeurs de la prétransition.

2.5 La microscopie électronique à transmission

Les observations en coloration négative ont été réalisées avec un appareil Phillips 201 fonctionnant à 60 ou 80 kV. Les échantillons, après avoir été déposés sur une grille de cuivre recouverte de formvar-carbone, étaient colorés négativement avec de l'acétate d'uranium 1% en solution aqueuse.

3.0 RÉSULTATS

3.1 Étude de l'interaction actine-lipides par calorimétrie différentielle à balayage

Les travaux de St-Onge et Gicquaud (1989 et 1990) ont montré qu'il y avait interaction entre l'actine et des liposomes composés de phospholipides de nature variée, en présence d'une concentration de l'ordre du millimolaire en cations bivalents. La présence des cations provoque la polymérisation de l'actine-G et potentialiseraient son association à la bicouche. Selon leurs travaux en turbidité différentielle, l'interaction semble maximale à une concentration d'environ 10 mM en cations bivalents pour des vésicules de phosphatidylcholine (de jaune d'oeuf).

Compte tenu de ces résultats, une première série d'expériences a été réalisée dans des conditions constantes pour étudier le comportement de la transition de phase du DPPC en présence d'actine et/ou de 10 mM en $MgCl_2$. Ces différents mélanges permettront de mettre en évidence les caractéristiques de chaque thermogramme associé aux divers systèmes composés de lipide, d'actine et de cation bivalents.

3.1.1 Évaluation de l'effet de l'actine et du $MgCl_2$ sur la transition de phase du DPPC

Cette première série d'expériences avait pour but d'évaluer l'effet de trois systèmes sur la transition de phase des bicouches de DPPC. L'actine-G seule, le $MgCl_2$ seul et un mélange d'actine-G et de $MgCl_2$ (donc de l'actine-F) ont été étudiés.

Ainsi, quatre types de thermogrammes ont été enregistrés, à savoir, les trois mélanges suivants et la solution témoin de DPPC seulement:

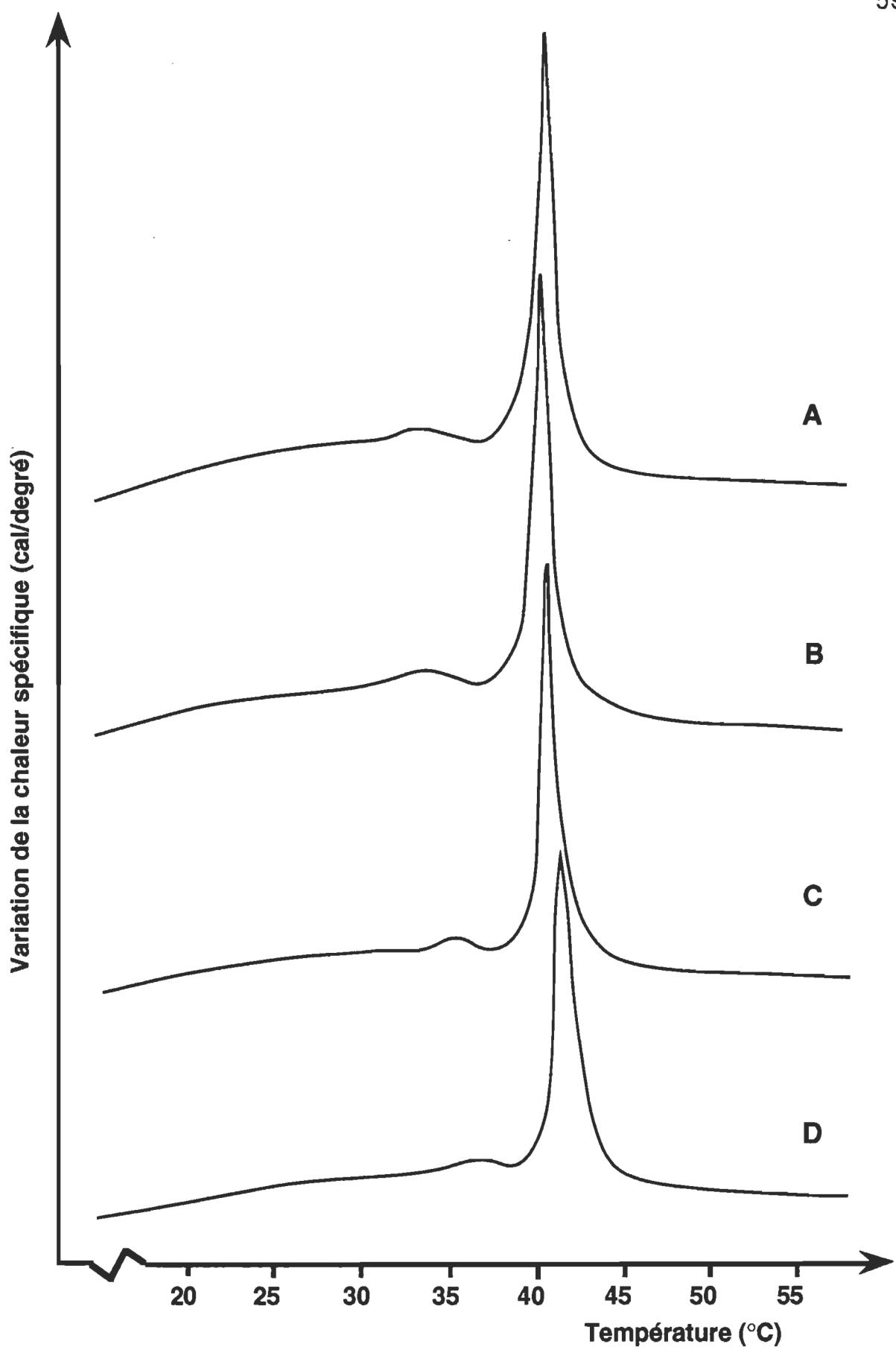
- A) DPPC (2 mg/ml);
- B) DPPC (2 mg/ml) + actine (1 mg/ml);
- C) DPPC (2 mg/ml) + $MgCl_2$ (10 mM);
- D) DPPC (2 mg/ml) + actine (1 mg/ml) + $MgCl_2$ (10 mM).

La figure 3.1 montre les courbes obtenues. On remarque de prime abord qu'il n'y a que de légères modifications entre les quatre courbes. Brièvement, on peut noter qu'en B, l'ajout d'actine aux liposomes n'induit aucune perturbation notable des transitions; l'ajout de $MgCl_2$, en C, provoque des modifications observables surtout au niveau de la prétransition; et enfin en D, le système DPPC-actine- $MgCl_2$ induit une quasi disparition de la prétransition et de faibles perturbations à la transition de phase principale. L'analyse plus complète de ces thermogrammes permettra de mieux évaluer ces perturbations.

La série de graphiques qui suit (figures 3.2 à 3.4) a été réalisée à partir de la moyenne de cinq thermogrammes provenant de cinq échantillons différents, et ce, pour chaque mélange, à l'exception du mélange DPPC-actine (B) pour lequel 4 échantillons seulement ont été analysés. La barre d'erreur correspond à l'écart-type (σ_{n-1}) sur la moyenne des valeurs calculées.

Figure 3.1: ([Page suivante](#)) Thermogrammes de fusion de liposomes SUV composés de DPPC.

En A, DPPC (2 mg/ml); en B, DPPC (2 mg/ml) et actine (1 mg/ml); en C, DPPC (2 mg/ml) et $MgCl_2$ (10 mM); en D, DPPC (2 mg/ml), actine (1 mg/ml) et $MgCl_2$ (10 mM).



La figure 3.2 donne les résultats des paramètres thermodynamiques calculés pour la prétransition. Au niveau de la température de prétransition (T_p), on note qu'il y a une augmentation de près de 1°C avec l'ajout de $MgCl_2$ et une augmentation supplémentaire de 0.5°C lorsque l'actine est ajoutée (donc sous forme d'actine-F dans le mélange). L'actine-G pour sa part n'a pas d'effet sur ce paramètre. Ces augmentations de T_p sont accompagnées par une diminution de l'enthalpie de la prétransition (ΔH^p_{cal}). L'incorporation de $MgCl_2$ au DPPC provoque une baisse d'environ 50% de l'enthalpie et le mélange actine- $MgCl_2$ provoque la quasi disparition de la prétransition. En fait, sur deux des cinq thermogrammes du mélange DPPC-actine- $MgCl_2$, la prétransition avait complètement disparue.

Au niveau de la transition de phase principale (figures 3.3 et 3.4), on remarque que seul le système DPPC-actine- $MgCl_2$ fait augmenter la température de transition (T_c) de façon significative avec une légère hausse de près de 1°C par rapport au thermogramme du DPPC seulement. L'enthalpie (ΔH^c_{cal}) pour sa part n'est pas modifiée significativement compte tenu des écart-types. Finalement, la largeur à mi-hauteur ($\Delta T_{1/2}$) de la transition est faiblement augmentée par l'ajout de $MgCl_2$ aux liposomes et n'est pas d'avantage augmentée par l'ajout subséquent d'actine. La capacité calorifique (ΔC_p) n'a pas été analysée parce qu'il y a des variations importantes pour un même mélange (i.e. pour deux des quatre mélanges, l'écart-type est supérieur à la valeur expérimentale calculée) et aucune modification significative est notable entre les différents systèmes.

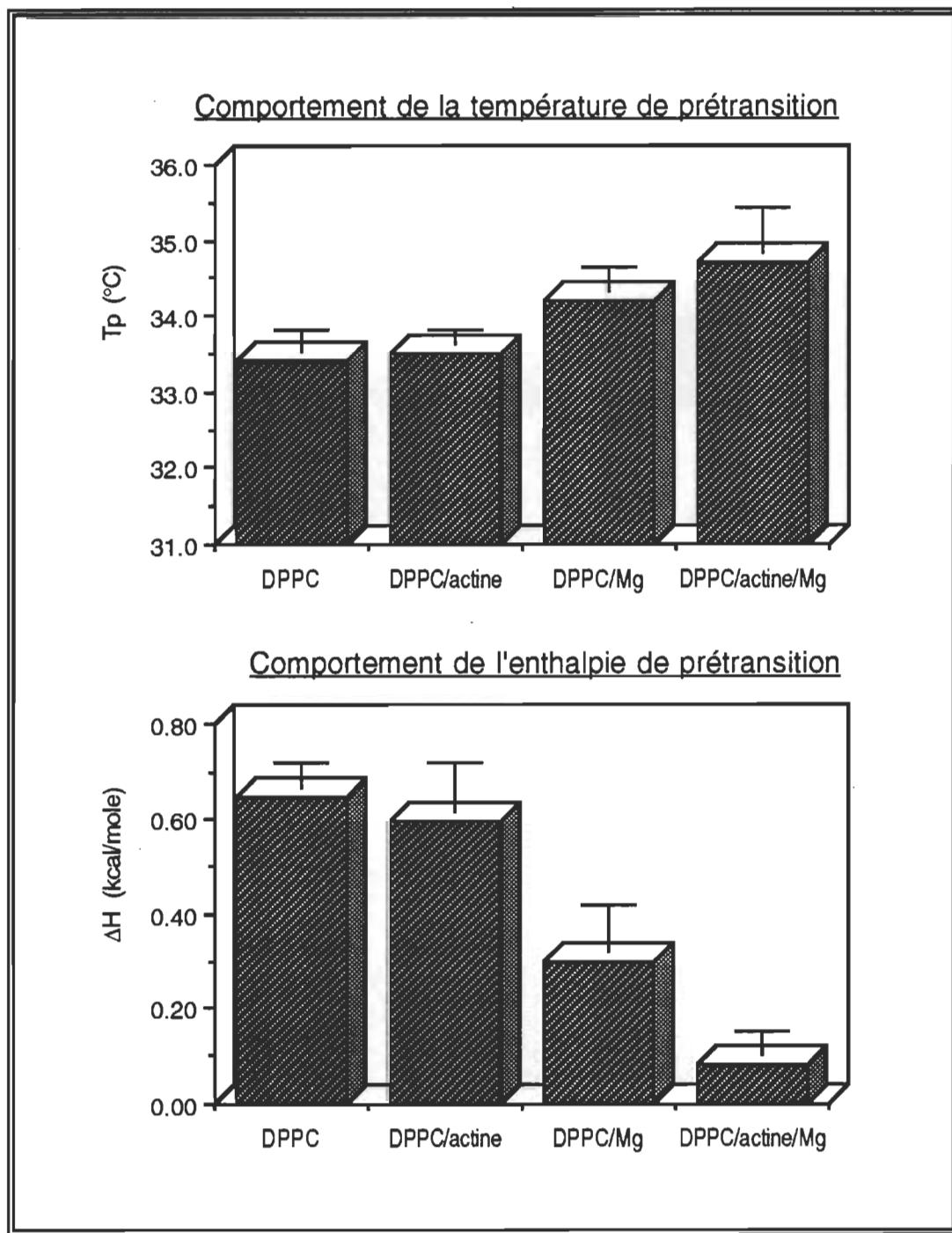
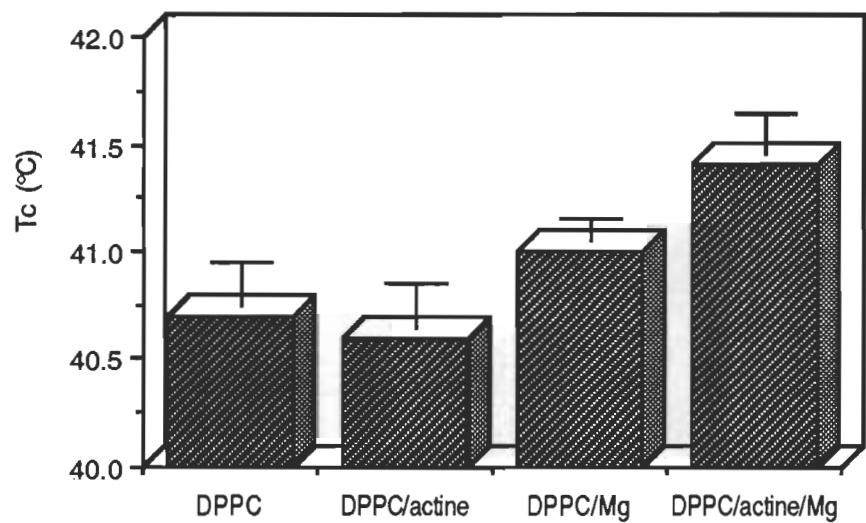


Figure 3.2: Comportement de la température (T_p) et de l'enthalpie (ΔH_p^0) de prétransition pour les différents mélanges DPPC (2 mg/ml) - actine (1 mg/ml) - $MgCl_2$ (10 mM).

Comportement de la température de transition principale



Comportement de l'enthalpie de transition principale

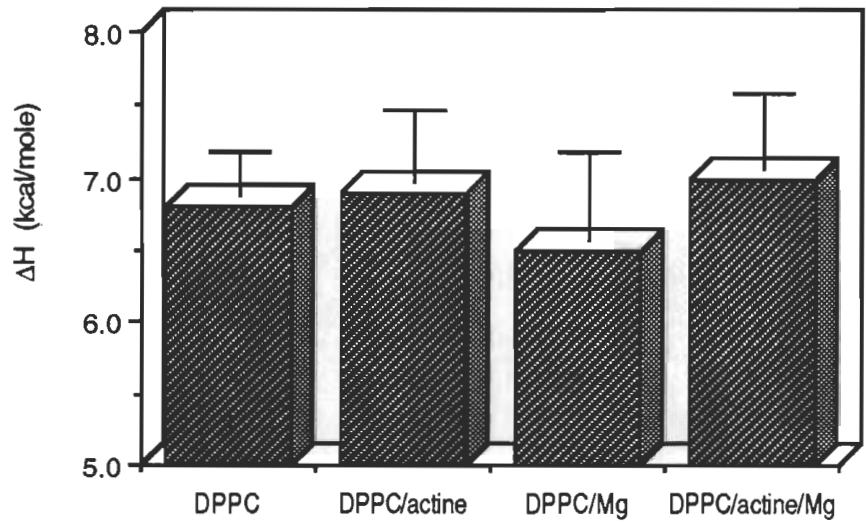


Figure 3.3: Comportement de la température (T_c) et de l'enthalpie (ΔH_c) de la transition de phase principale pour les différents mélanges DPPC (2 mg/ml) - actine (1 mg/ml) - $MgCl_2$ (10 mM).

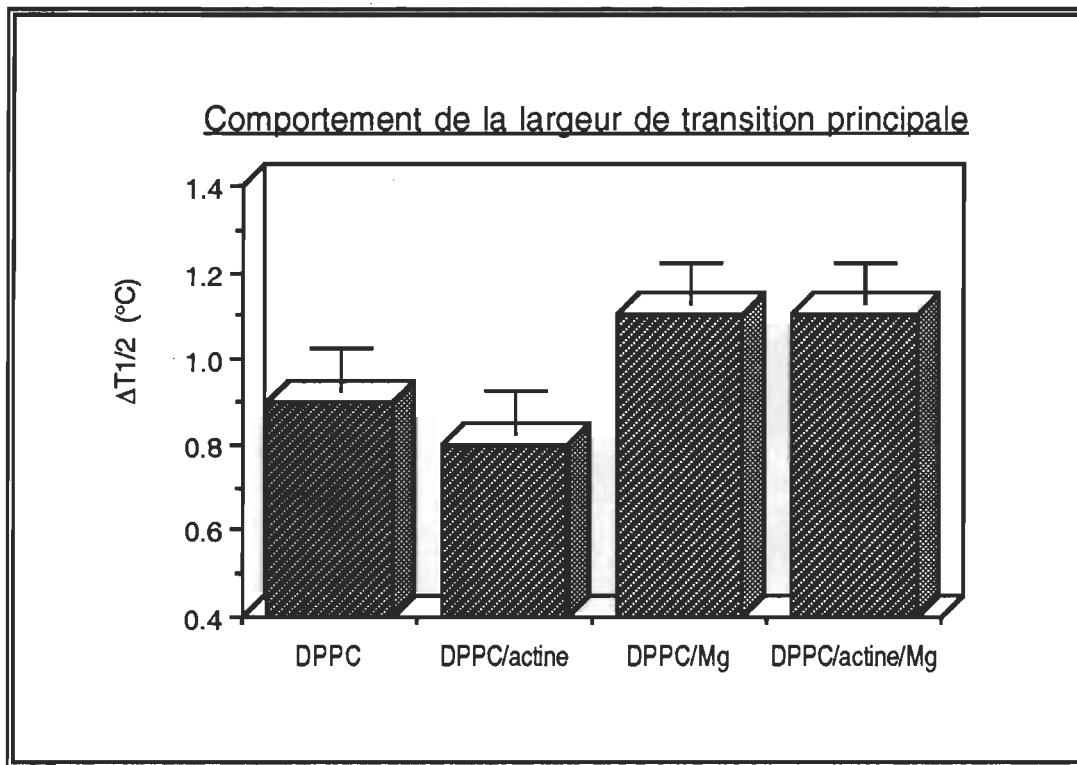


Figure 3.4: Comportement de la largeur à mi-hauteur ($\Delta T_{1/2}$) de la transition de phase principale pour les différents mélanges DPPC (2 mg/ml) - actine (1 mg/ml) - $MgCl_2$ (10 mM).

En résumé, on peut noter que lorsque de l'actine-G est ajoutée aux liposomes, aucun changement n'est observable. Par contre, l'ajout de $MgCl_2$ au DPPC provoque des perturbations mineures au DPPC, et ce, plus particulièrement au niveau de la prétransition et de la largeur à mi-hauteur de la transition principale. Ce genre de perturbations causées par l'ajout d'une concentration de l'ordre de 10 mM en cations bivalents est en accord avec la littérature (Bach, 1984; Blume, 1991; Mabrey-Gaud, 1981; McElhaney, 1982). Enfin, l'ajout d'un mélange de $MgCl_2$ et d'actine au DPPC induit des modifications légèrement plus grandes. On le note bien par exemple au niveau des températures de prétransition et de transition, ce qui suggère que les changements ne sont pas seulement dus au $MgCl_2$ mais aussi à la présence

d'actine filamenteuse dans le milieu. Cependant, il est important de mentionner que dans tous les cas, il s'agit de très faibles changements à la transition de phase du DPPC.

Avant de pouvoir interpréter ces résultats, une analyse plus approfondie est requise et d'autres manipulations sont nécessaires. Les sections qui suivent présentent les résultats obtenus sur l'influence d'une concentration croissante en $MgCl_2$ et en actine sur la transition de phase des liposomes de DPPC.

3.1.2 Influence de la concentration du $MgCl_2$ sur la transition de phase du DPPC

Les figures 3.5 à 3.7 donnent les résultats expérimentaux obtenus sur l'étude de la variation de la concentration en $MgCl_2$, en présence et en absence d'actine. Les valeurs cartésiennes présentées sont la moyenne de deux, et en quelques cas, de trois manipulations distinctes. Pour tous les thermogrammes obtenus, la concentration en DPPC était de 2 mg/ml et l'actine était à une concentration de 1 mg/ml, ce qui représente un ratio molaire lipide/protéine de 115:1.

Pour la prétransition (figure 3.5), une concentration croissante en $MgCl_2$ fait augmenter de façon progressive la température de prétransition, et la présence d'actine semble potentialiser faiblement ce phénomène. Cependant, lorsque nous sommes en présence d'actine, la prétransition disparaît complètement à une concentration supérieure à 10 mM en $MgCl_2$. L'enthalpie de prétransition diminue de façon importante dès que du $MgCl_2$ est ajouté aux liposomes, et ce, en présence d'actine ou non. Par la suite, au fur et à mesure que la concentration en $MgCl_2$ augmente, l'enthalpie diminue de façon moins importante mais progressive. Ici aussi, ce phénomène semble être potentialisé par la présence d'actine.

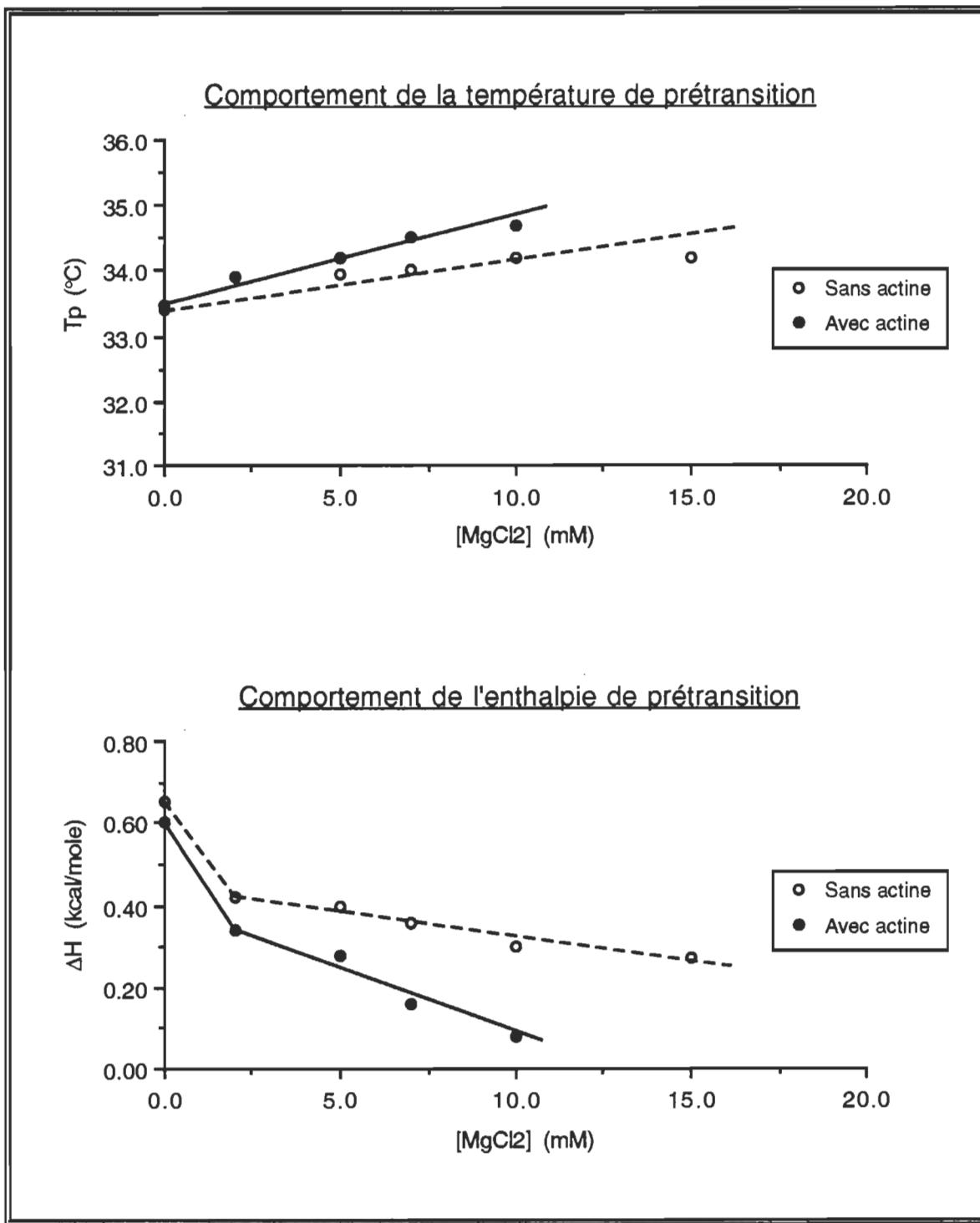


Figure 3.5: Comportement de la température (T_p) et de l'enthalpie (ΔH_{cal}^p) de prétransition en fonction d'une concentration croissante en $MgCl_2$ (DPPC = 2 mg/ml; actine = 1 mg/ml).

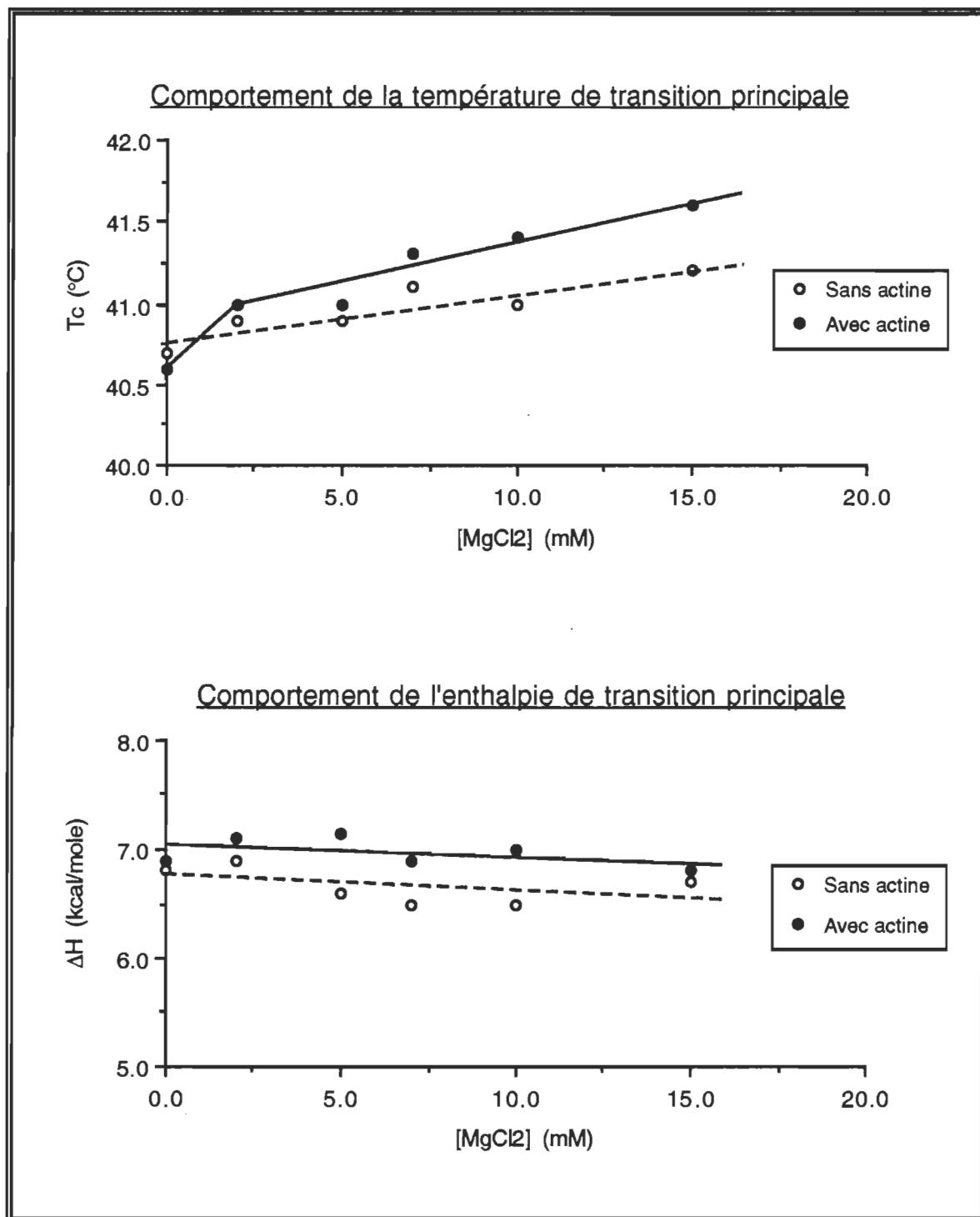


Figure 3.6: Comportement de la température (T_c) et de l'enthalpie (ΔH_{cal}^c) de la transition de phase principale en fonction d'une concentration croissante en MgCl₂ (DPPC = 2 mg/ml; actine = 1 mg/ml).

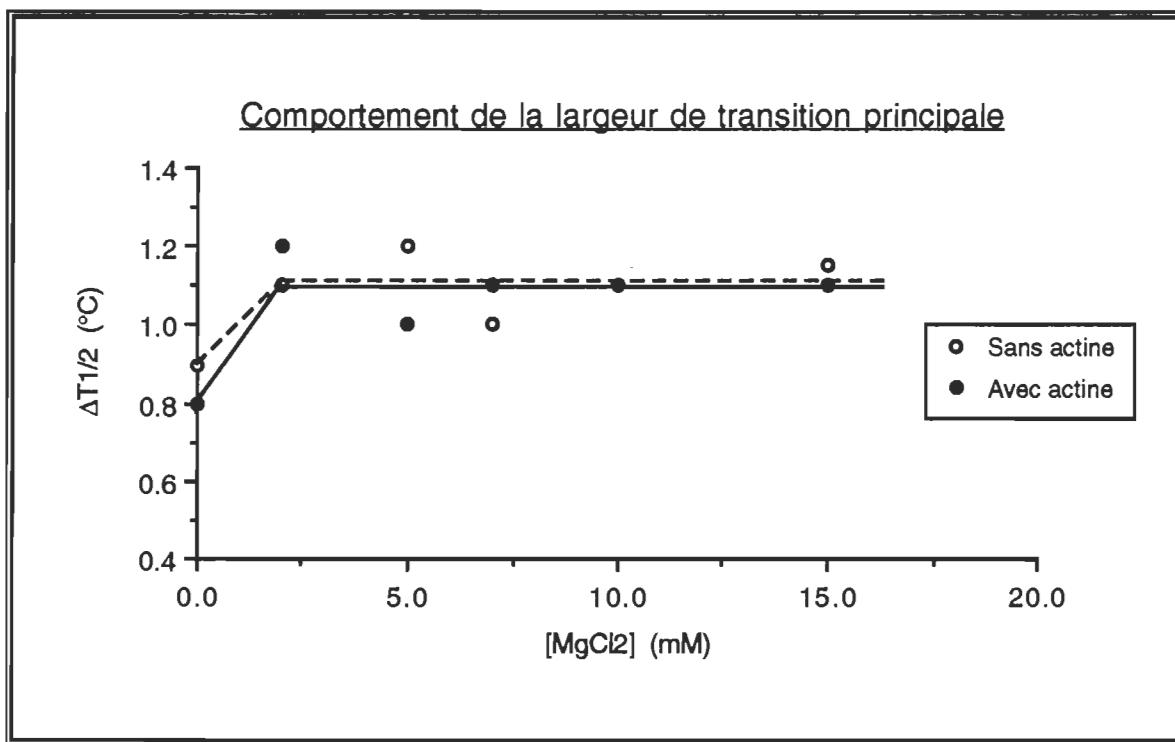


Figure 3.7: Comportement de la largeur à mi-hauteur ($\Delta T_{1/2}$) de la transition de phase principale en fonction d'une concentration croissante en $MgCl_2$ (DPPC = 2 mg/ml; actine = 1 mg/ml).

Au niveau de la transition principale (figures 3.6 et 3.7), on remarque aussi une augmentation progressive de la température de transition en fonction du $MgCl_2$, et des valeurs légèrement plus élevées sont enregistrées en présence d'actine. L'enthalpie de fusion ne varie pas de façon significative, mais semble légèrement plus grande en présence d'actine. Enfin, pour la largeur à mi-hauteur de la transition, dès l'incorporation de $MgCl_2$ il y a une faible augmentation et aucune autre variation significative est observable en présence et en absence d'actine.

L'analyse de ces résultats n'apporte pas beaucoup plus d'information de ce qu'il avait été observé avec la série d'expériences précédentes. En effet, des perturbations mineures sont induites à la transition de phase du DPPC par l'ajout du MgCl₂ et semblent être, de façon générale, potentialisées par la présence d'actine-F. On peut noter toutefois que les effets les plus importants surviennent dès que le sel est ajouté aux liposomes et qu'une augmentation subséquente de sa concentration ne provoque pas beaucoup de variations supplémentaires. Une étude à des concentrations plus élevées en MgCl₂ aurait peut-être montré des changements plus importants à la transition de phase, tel qu'il est rapporté dans la littérature. Nous avons cependant travaillé avec des concentrations se rapprochant de celles des systèmes biologiques puisque autrement, l'interprétation des résultats aurait sûrement eu peu d'intérêt physiologique.

3.1.3 Influence de la concentration d'actine sur la transition de phase du DPPC

Cette série d'expériences a été réalisée dans les mêmes conditions que celle de la variation en MgCl₂, sauf qu'ici c'est la concentration d'actine qui varie en présence et en absence de 10 mM de MgCl₂. L'écart de concentration en actine varie de 0 à 6 mg/ml, ce qui représente un ratio maximal lipide/protéine de 20:1. La borne supérieure de 6 mg/ml nous est imposée par les techniques d'extraction et de purification de l'actine avec lesquelles il est difficile d'obtenir des concentrations supérieures à 10 mg/ml. Ainsi, après dilution avec les solutions de liposomes et de MgCl₂, une concentration maximale de l'ordre de 6 mg/ml peut être obtenue. De plus, il faut mentionner qu'à cette concentration et en présence de 10 mM en cations bivalents, l'actine forme un gel très dense. La manipulation des solutions devient alors difficile.

La figure 3.8 montre le comportement de la prétransition en fonction d'une concentration croissante d'actine. En absence de $MgCl_2$, l'actine est sous forme monomérique et ne provoque aucun changement à la température de prétransition. En présence du sel cependant, la température augmente dès l'ajout d'actine et une concentration croissante d'actine n'induit pas d'autre augmentation de température. L'enthalpie de prétransition réagit aussi fortement dès la présence d'actine-F dans le milieu et subit une baisse progressive par la suite. On peut remarquer qu'à une fraction molaire de 0.035 en actine (4 mg/ml), la prétransition disparaît complètement en présence de $MgCl_2$, ce qui n'est pas le cas en son absence.

A la figure 3.9 on remarque que la température de transition réagit de façon semblable à la température de prétransition. Par contre, l'enthalpie de la transition principale se comporte de façon inusitée: en absence de $MgCl_2$ aucune modification n'est observable, mais en sa présence, une augmentation croissante d'actine provoque une hausse progressive de l'enthalpie jusqu'à une fraction molaire en actine de 0.026 et qui, par la suite, baisse progressivement jusqu'à une fraction molaire de 0.051. Enfin, la figure 3.10 montre que la largeur à mi-hauteur ne varie pas en fonction de la concentration d'actine sauf qu'elle est légèrement supérieure lorsque les conditions du milieu favorisent la polymérisation de l'actine.

En résumé, l'ajout d'une quantité croissante d'actine en absence de $MgCl_2$ ne modifie pas de façon significative les thermogrammes du DPPC. Par contre, en présence des cations bivalents, les courbes sont modifiées de façon proportionnelle à la concentration d'actine ajoutée. Une analyse plus complète de ces résultats sera faite à la section suivante.

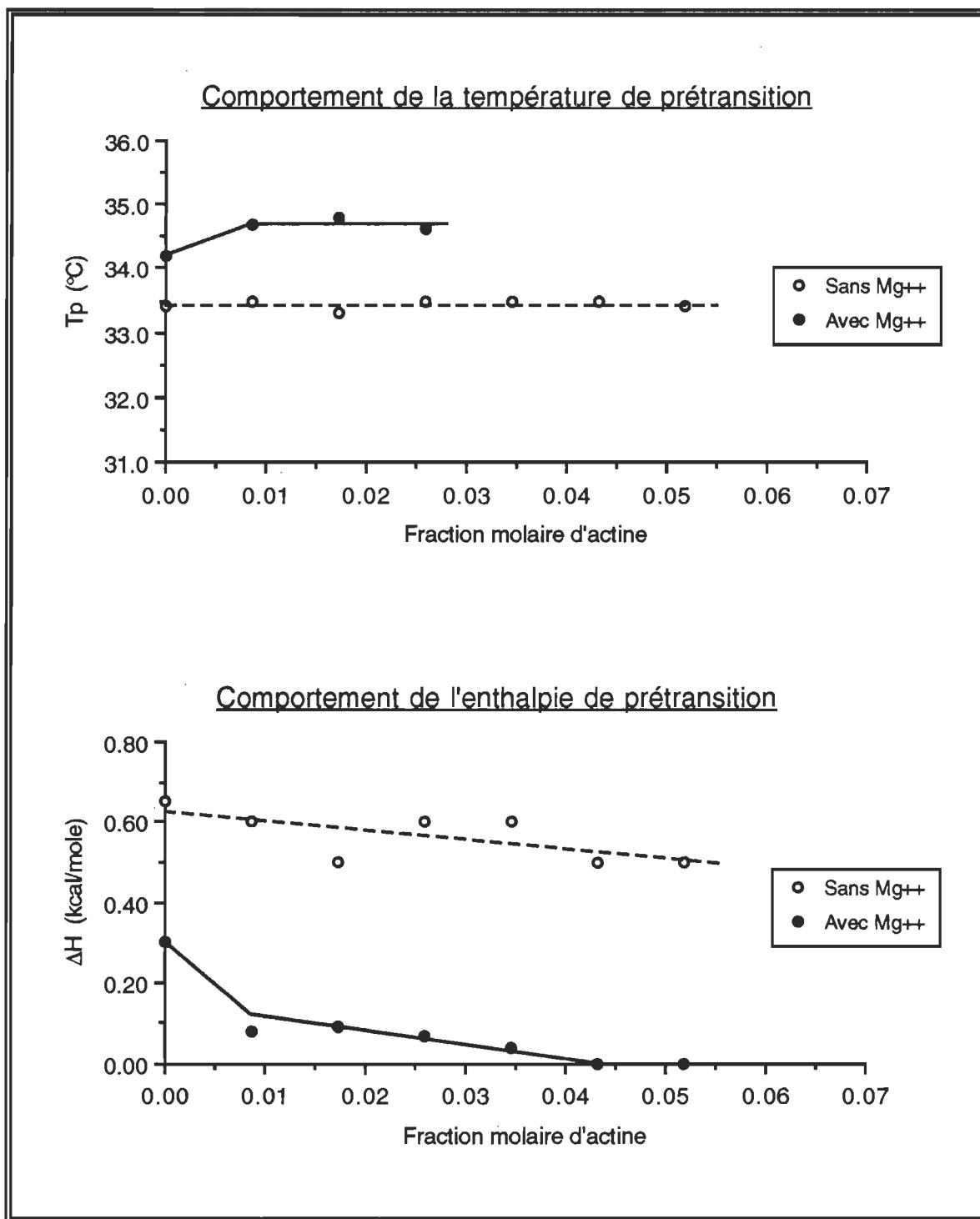


Figure 3.8: Comportement de la température (T_p) et de l'enthalpie (ΔH_{cal}^p) de prétransition en fonction d'une concentration croissante en actine (DPPC = 2 mg/ml; MgCl_2 = 10 mM).

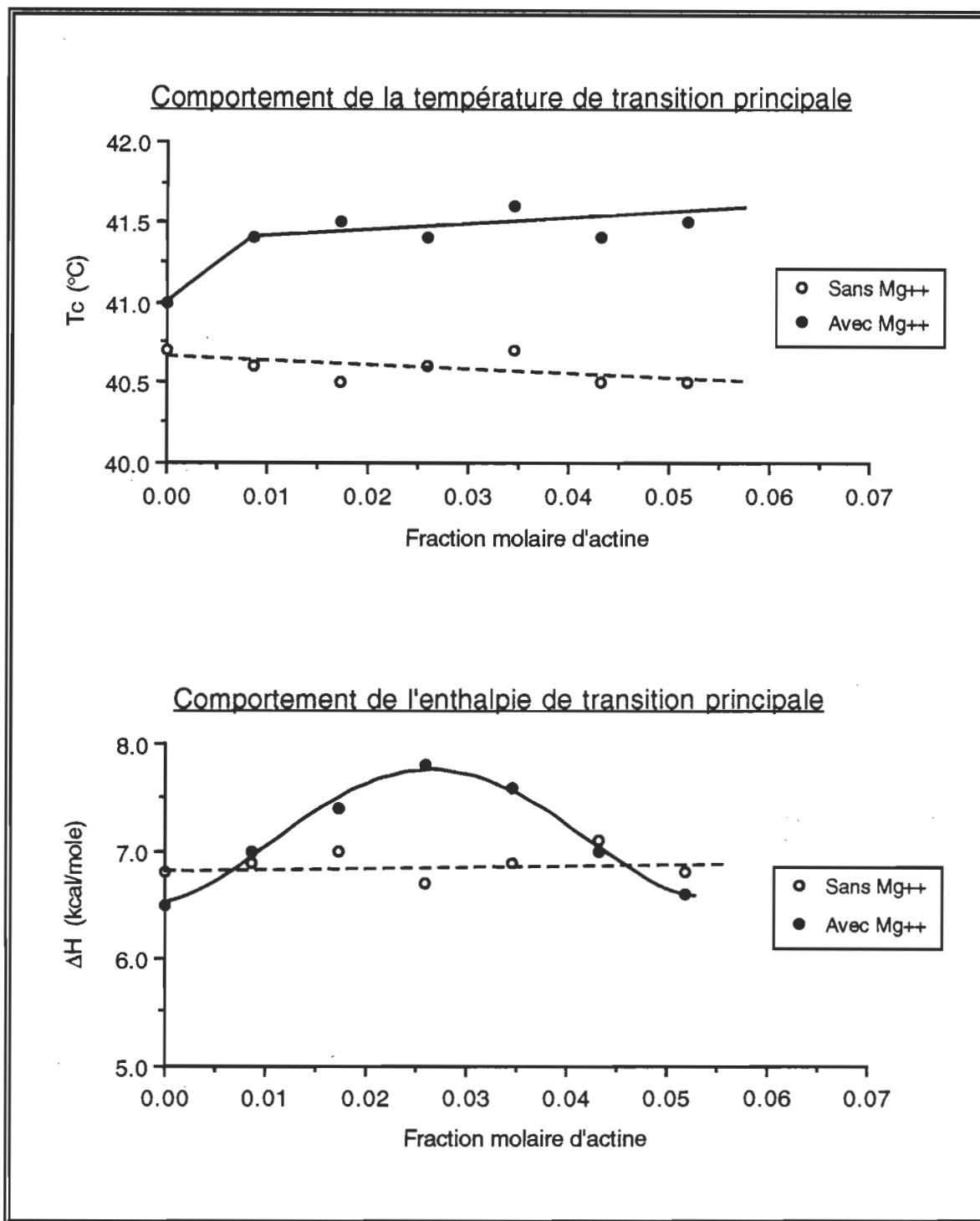


Figure 3.9: Comportement de la température (T_c) et de l'enthalpie (ΔH_{cal}^c) de la transition de phase principale en fonction d'une concentration croissante en actine (DPPC = 2 mg/ml; $MgCl_2$ = 10 mM).

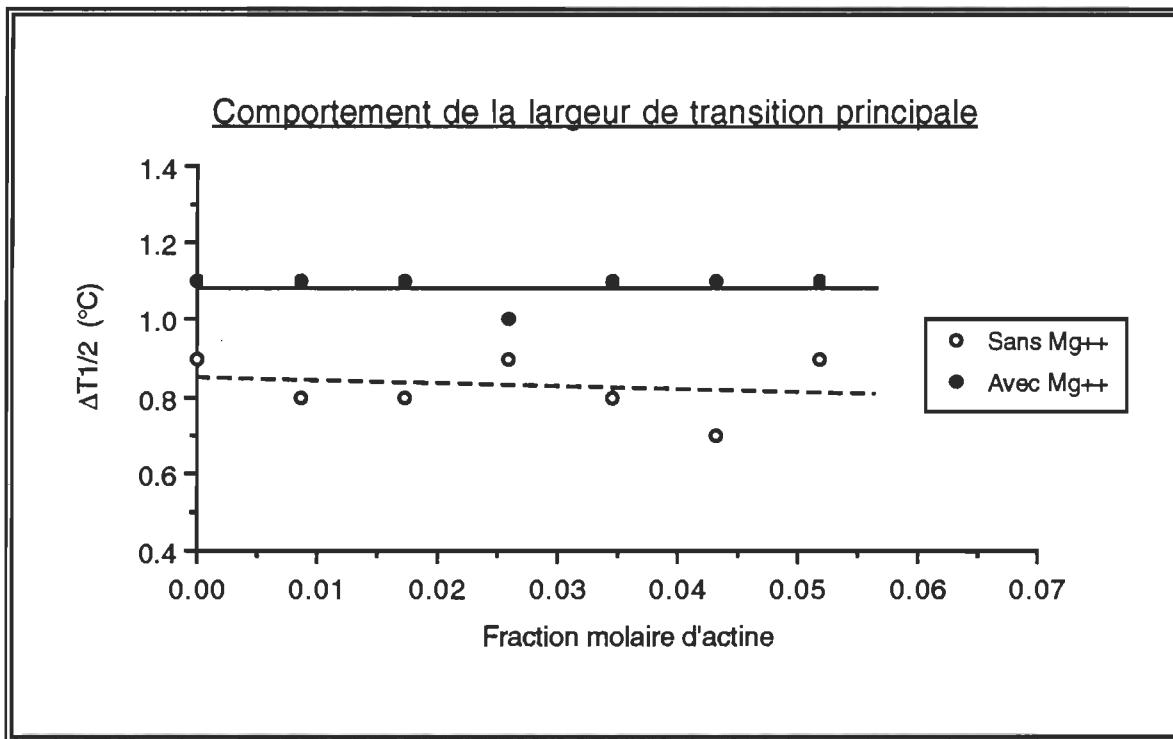


Figure 3.10: Comportement de la largeur à mi-hauteur ($\Delta T_{1/2}$) de la transition de phase principale en fonction d'une concentration croissante en actine (DPPC = 2 mg/ml; $MgCl_2$ = 10 mM).

3.1.4 Interprétation des résultats obtenus en DSC

Les trois séries de manipulations réalisées en calorimétrie différentielle à balayage permettent de mettre en évidence les points suivants:

- 1) Les courbes obtenues avec le DPPC seulement correspondent bien à ce qui est rapporté par la littérature, à l'exception que nos valeurs expérimentales calculées sont légèrement plus faibles (voir tableau 3.1). Par conséquent, la calibration de l'appareil avec un solvant organique aurait été préférable pour avoir des valeurs numériques plus justes. Cependant, cela n'influence en rien l'objectif de notre étude puisque nos résultats sont analysés par comparaison entre eux et non avec les données fournies par la littérature.

T_p (°C)	ΔH_p^0 cal (kcal/mole)	T_c (°C)	ΔH_c^0 cal (kcal/mole)	Auteurs
33.4	0.7	40.7	6.8	Présente étude
34.2	1.1	41.4	7.7	Lewis <i>et al.</i> , 1987
35.5	1.6	41.5	8.7	Blume, 1988

Tableau 3.1: Comparaison des températures et enthalpies de la prétransition et de la transition de phase principale du DPPC selon diverses études.

- 2) L'actine monomérique ne semble pas influencer la transition de phase du DPPC, ce qui suggère qu'aucune interaction existe entre l'actine et les molécules de phosphatidylcholine en absence de cations bivalents.
- 3) Les cations bivalents (Mg^{2+} dans notre cas) provoquent des perturbations à la transition de phase du DPPC. Ce phénomène est admis et largement rapporté dans la littérature. Le mécanisme par lequel ces ions interagissent avec la phosphatidylcholine serait une attraction électrostatique au niveau de la charge négative du groupement phosphate avec un rapport stœchiométrique de 2 phospholipides par ion (Akutsu et Seelig, 1981; Altenbach et Seelig, 1984). Ce pontage des phospholipides par les cations bivalents provoquerait un changement de conformation de la tête polaire où il y aurait répulsion du groupement $N^+(CH_3)_3$ vers l'extérieur de la normale de la bicouche (McIntosch, 1980; Petersheim *et al.*, 1989; Seelig *et al.*, 1987). Cette interaction Mg^{2+} -DPPC qui se situe au niveau de la partie hydrophile seulement du lipide expliquerait la disparition graduelle de la prétransition, l'augmentation progressive de la température de transition et la constance de l'enthalpie de transition principale en présence d'une concentration croissante en cations bivalents.

- 4) L'actine-F (i.e. mélange d'actine-G et de $MgCl_2$) induit aussi des modifications à la transition de phase du DPPC. Ces changements ne sont pas exclusivement causés par la présence du $MgCl_2$ puisque généralement, l'ajout d'actine amplifie de façon significative les perturbations. Par conséquent, ces résultats suggèrent qu'il y a interaction entre l'actine et les molécules de phosphatidylcholine en présence de cations bivalents.
- 5) Le comportement de la transition de phase du DPPC en présence d'une concentration croissante en actine et de 10 mM en $MgCl_2$ suggère qu'il s'agit d'une interaction lipide-protéine de type 1, à savoir de nature électrostatique seulement (voir section 2.4.4.2 et figure 2.8). En effet, puisque dans ces conditions les thermogrammes montrent qu'il y a: une augmentation progressive de la température du processus, aucun changement à la largeur à mi-hauteur, et une augmentation progressive de l'enthalpie jusqu'à une concentration en actine de 3 mg/ml. Cependant, un phénomène plus difficilement explicable est celui de la diminution de l'enthalpie à partir d'une concentration supérieure à 3 mg/ml en actine. S'agirait-il d'une incorporation partielle d'un groupement hydrophobe de l'actine dans la bicouche? Probablement pas, car il y aurait eu en même temps baisse de la température de transition et augmentation de la largeur de transition. De plus, une interaction hydrophobe entraîne habituellement des modifications importantes de l'allure du thermogramme, ce qui n'est pas le cas et qui suggère un phénomène seulement de surface. L'explication peut cependant venir du fait que l'actine forme un gel à ces concentrations. De l'actine purifiée à une concentration supérieure à 3 mg/ml et en présence de 10 mM de $MgCl_2$ forme un réseau paracristallin très dense dans la solution. Le stress provoqué par ce gel d'actine sur la transition de phase du DPPC pourrait expliquer la baisse progressive de l'enthalpie à de fortes concentrations en actine.

6) La présence des cations bivalents est nécessaire à l'interaction actine-lipides mais celle-ci n'est pas augmentée davantage par une concentration croissante en cations. En effet, dès l'incorporation de 2 mM en $MgCl_2$ il semble qu'il y ait interaction actine-DPPC et une concentration supérieure en sel ne suggère pas une interaction plus intense.

En conclusion, les résultats obtenus en DSC montrent qu'il y a interaction entre l'actine et le DPPC en présence de cations bivalents, c'est-à-dire uniquement lorsque l'actine est sous forme filamenteuse. Une concentration croissante en cations bivalents ne semble pas provoquer davantage d'interaction et cette interaction serait seulement de nature électrostatique.

3.2 Étude de l'interaction actine-lipides par microscopie électronique à transmission

La microscopie électronique est un outil qualitatif intéressant dans l'étude de l'interaction actine-lipides. D'ailleurs, l'équipe de Gicquaud *et al.* l'a déjà abondamment utilisée dans la mise en évidence de l'interaction actine-liposomes. Les travaux de Rioux et Gicquaud (1985) et de Laliberté et Gicquaud (1988) ont montré, par microscopie électronique, la formation de paracristaux d'actine à la surface de liposomes chargés positivement. Les travaux de St-Onge et Gicquaud (1989 et 1990) ont aussi montré la formation de paracristaux d'actine mais sur des liposomes neutres ou négatifs composés d'un mélange de phosphatidylcholine de jaune d'oeuf et d'autres lipides (cholestérol, acide oléique) ou phospholipides (PI, PG, PS), et ce, en présence de fortes concentrations en cations bivalents (20 mM $CaCl_2$).

Dans le cadre de la présente étude, la microscopie électronique a aussi été utilisée, d'une part pour appuyer les résultats obtenus en calorimétrie différentielle à balayage, et d'autre part pour mener un étude qualitative sur

l'interaction entre l'actine et des liposomes composés de différents phospholipides en présence de plus faibles concentrations en cations bivalents. Ces phospholipides n'ont jamais été utilisés auparavant dans l'étude de l'interaction actine-lipides par microscopie électronique.

3.2.1 Étude des mélanges utilisés en DSC

La figure 3.11 montre une solution de liposomes SUV de DPPC qui ont été utilisés en DSC. On peut remarquer sur cette figure la présence de plusieurs petits liposomes obtenus par ultrafiltration ainsi que leur forme sphérique caractéristique.

La figure 3.12 est une micrographie à plus fort grossissement d'un mélange de SUV et d'actine en absence de cations bivalents. Il ne semble pas y avoir d'interaction entre les monomères d'actine et les liposomes, et on peut noter des régions plus sombres qui représentent des agrégats d'actine-G libres dans le milieu.

Cependant, dès l'ajout de cations bivalents on peut noter une interaction actine-liposomes. Aux figures 3.13 et 3.14, où les concentrations en $MgCl_2$ sont de 2 et 5 mM respectivement, on note que l'actine est polymérisée et se lie aux liposomes. Il est remarquable, à la figure 3.13, de voir que les filaments d'actine ne semblent pas être déposés par hasard à la surface du liposome, puisque les filaments épousent bien la forme concave des liposomes. A la figure 3.14, il semble y avoir plus d'actine à la surface des liposomes et ceux-ci ressemblent à des "pelotes de laine".



Figure 3.12: (Page suivante) Coloration négative d'une solution d'actine-G purifiée (1 mg/ml) et de liposomes SUV composés de DPPC (2 mg/ml). 250 000X

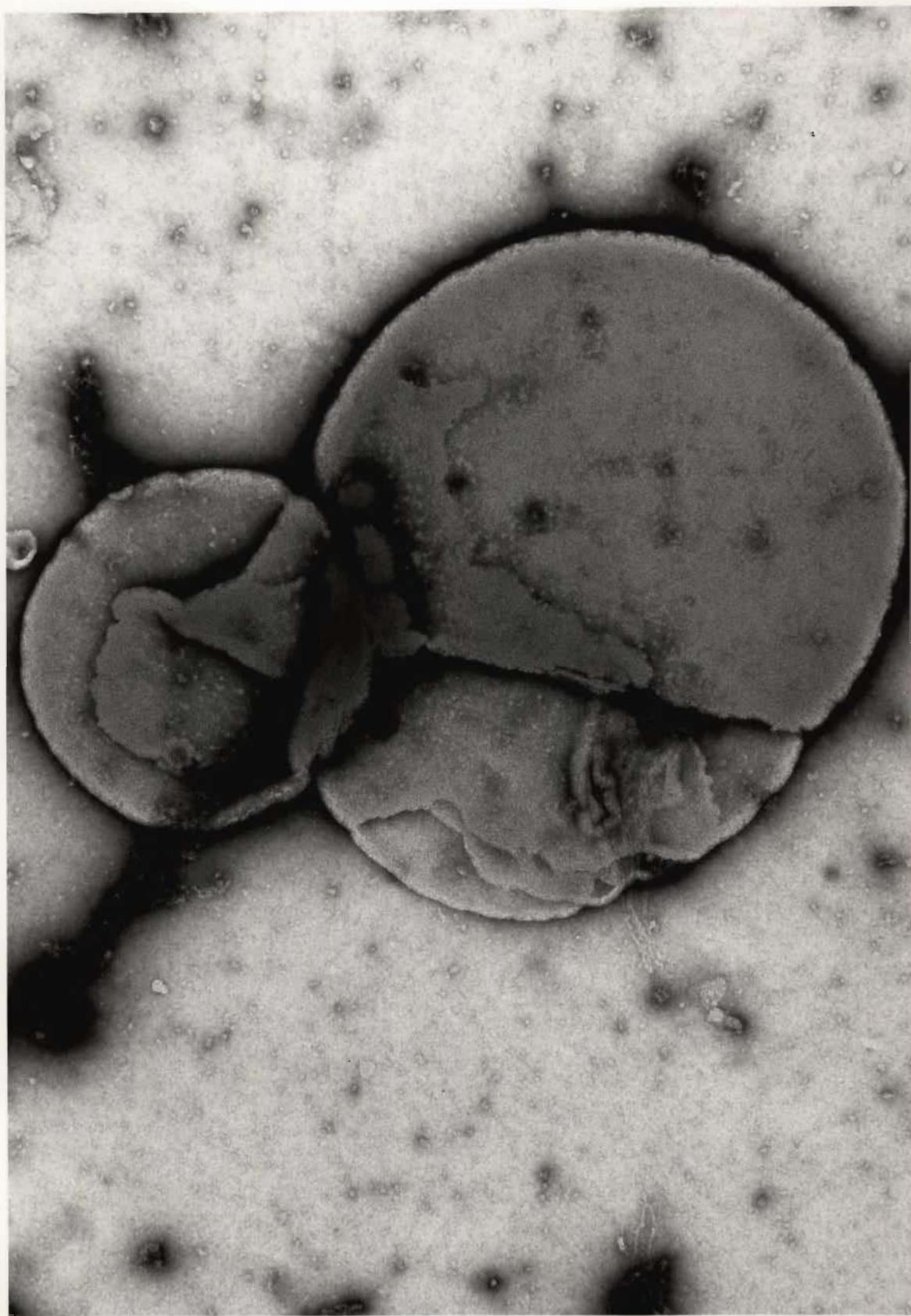


Figure 3.13: (Page suivante) Coloration négative d'une solution d'actine-G purifiée (1 mg/ml), de $MgCl_2$ (2 mM) et de liposomes SUV composés de DPPC (2 mg/ml). 185 000X

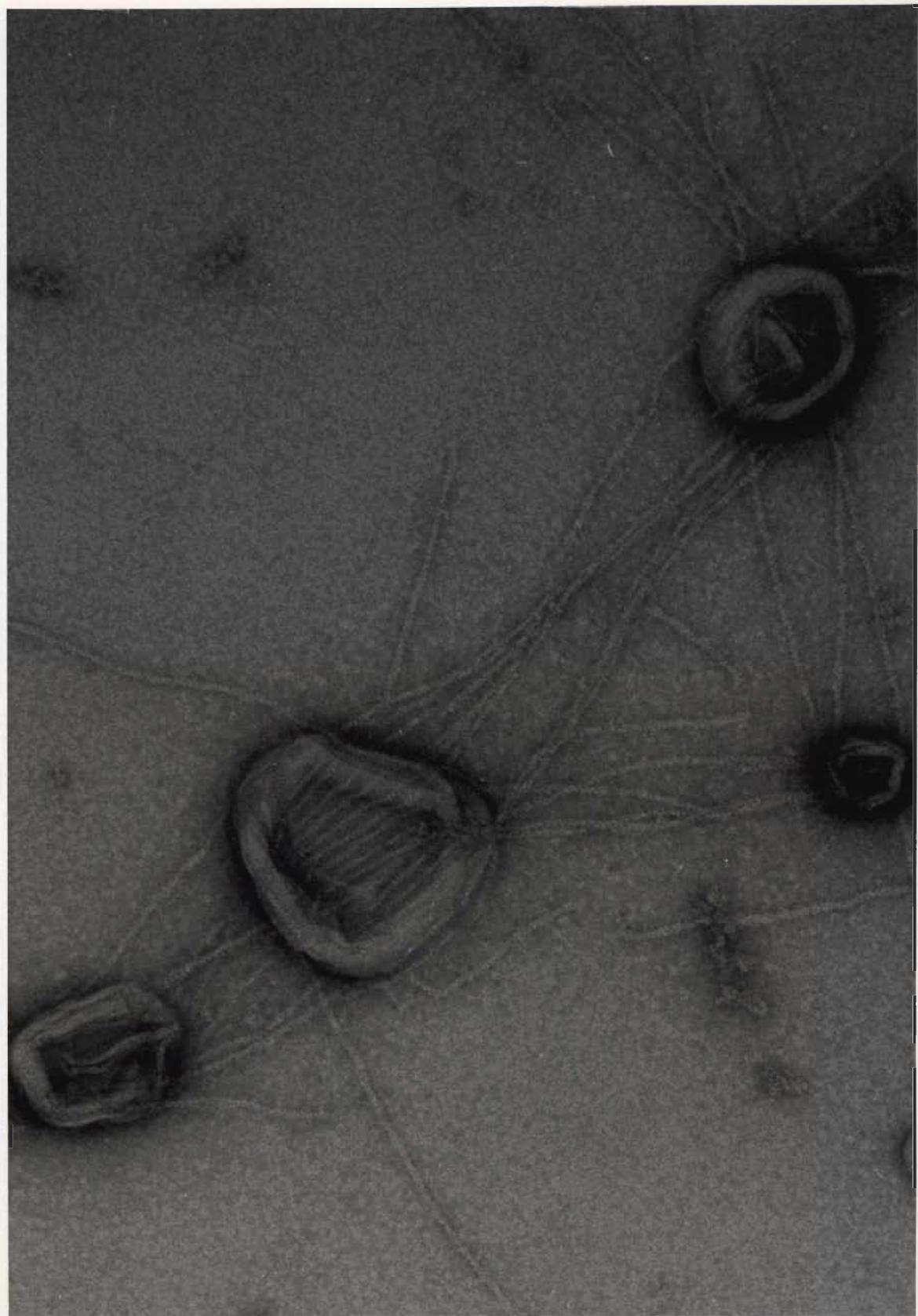


Figure 3.14: (Page suivante) Coloration négative d'une solution d'actine-G purifiée (1 mg/ml), de $MgCl_2$ (5 mM) et de liposomes SUV composés de DPPC (2 mg/ml). 240 000X

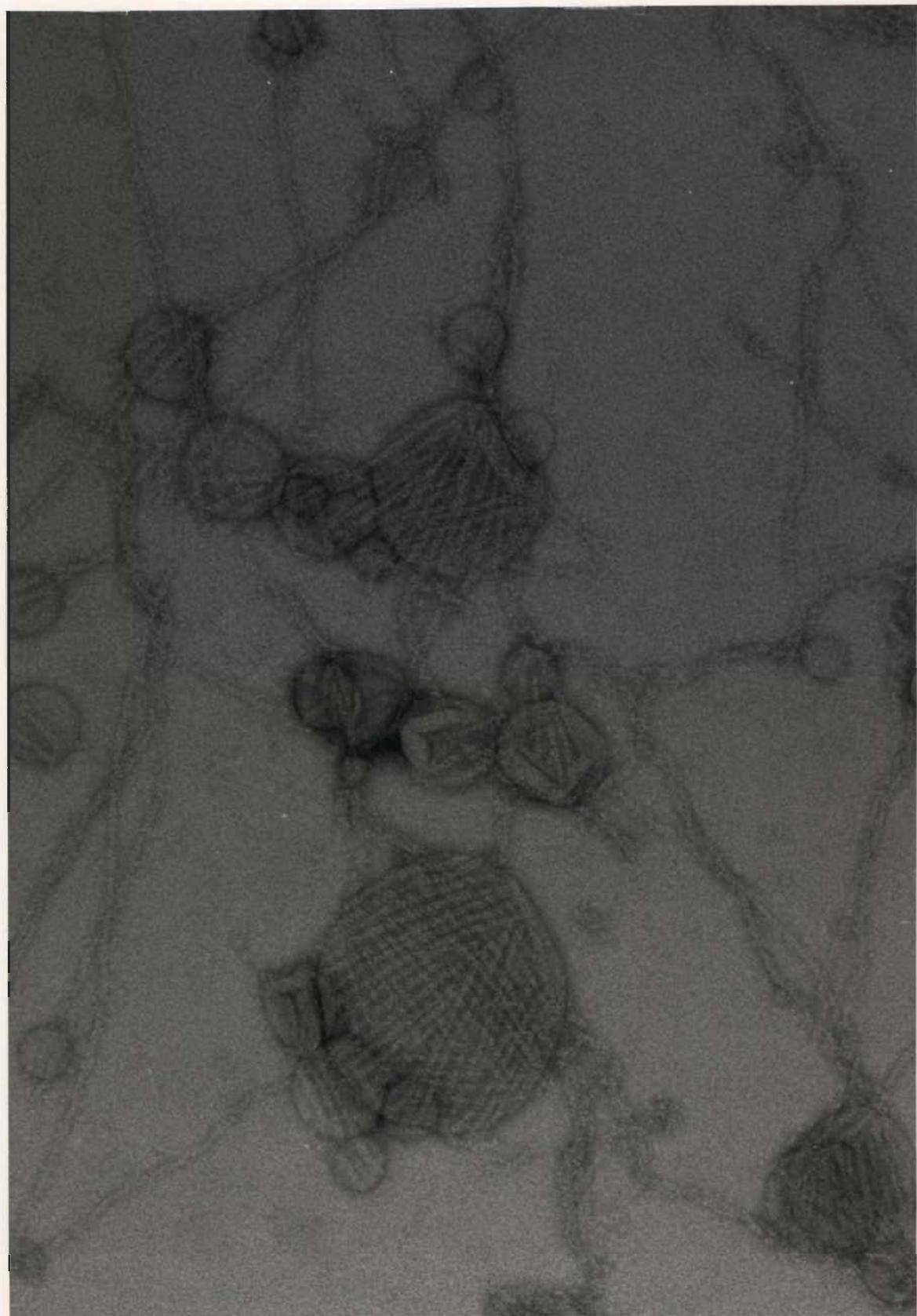


Figure 3.15: (Page suivante) Coloration négative d'une solution d'actine-G purifiée (1 mg/ml), de $MgCl_2$ (2 mM) et de liposomes OLV composés de DPPC (2 mg/ml). 60 000X

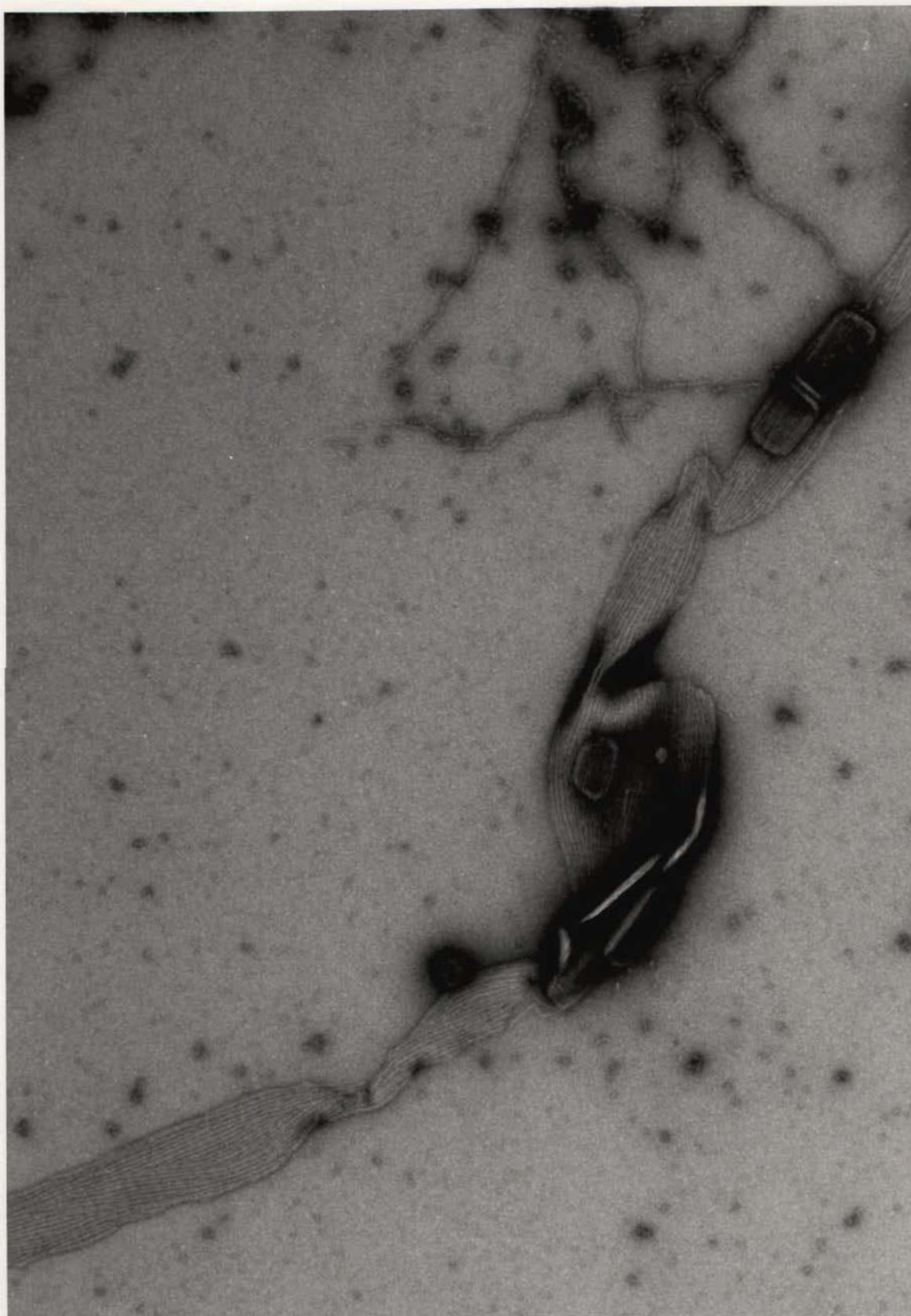


Figure 3.16: (Page suivante) Coloration négative d'une solution d'actine-G purifiée (1 mg/ml), de $MgCl_2$ (5 mM) et de liposomes OLV composés de DPPC (2 mg/ml). 145 000X



Toutefois, ces liposomes offrent peu de surface de contact aux longs filaments d'actine. Par comparaison, les figures 3.15 et 3.16 présentent des systèmes identiques aux figures 3.13 et 3.14 respectivement, sauf qu'il s'agit ici de plus gros liposomes: des OLV. On peut voir sur ces photographies qu'il y a nettement plus de filaments à la surface des bicouches de DPPC, que les liposomes sont déformés par la présence des filaments, et qu'il y a des régions paracristallines parallèles (figure 3.15) ou en filet (figure 3.16) sur les liposomes.

Ces observations corroborent bien certaines des conclusions obtenues en calorimétrie différentielle à balayage. En effet, la microscopie électronique permet de mettre en évidence que l'actine ne semble interagir avec les liposomes seulement qu'en présence de cations bivalents.

3.2.2 Étude de l'interaction entre l'actine et différents phospholipides

Les derniers travaux qui ont été réalisés sur l'interaction actine-lipides semblent montrer l'importance de la nature des phospholipides. Les travaux de Okimasu *et al.* (1986 et 1987), réalisés avec la méthode de perméabilité à la carboxyfluorescéine de Weinstein *et al.* (1981), ont montré que l'interaction semble inhibée progressivement par une concentration croissante de cholestérol dans des vésicules de DMPC et DPPC, et que l'interaction semble se produire seulement à la température de transition. Les travaux de St-Onge et Gicquaud (1989 et 1990), réalisés avec la même méthode d'étude, semblent montrer un phénomène contraire, à savoir une interaction plus forte avec 10% de cholestérol et la présence d'une interaction actine-liposomes à l'état liquide-cristallin. La seule différence entre ces deux séries d'expériences est le type de phospholipides: DMPC et DPPC versus PC de jaune d'oeuf.

De plus, les résultats de St-Onge et Gicquaud (1990) réalisés en turbidité différentielle montrent que la réponse est légèrement différente pour cinq compositions de membranes (mélange de phospholipides et de lipides). Cependant, les auteurs ne tentent pas d'expliquer ce phénomène.

Il semble donc que la nature des phospholipides qui composent la membrane a une influence sur l'interaction actine-lipides. Par conséquent, une série d'expériences en duplicita a été réalisée avec sept extraits et phospholipides différents dans le but de voir si l'interaction est modifiée. Le tableau 3.2 ci-dessous présente les phospholipides utilisés et résume certaines de leurs caractéristiques.

Abréviation	Description	Charge globale	T _c
Azolectine	extrait brut de membranes de la fève de soja (≈ 20% de phosphatidylcholine)	négative	≈ - 15°C
PC _{boeuf}	extrait purifié de la phosphatidylcholine du cerveau de boeuf	neutre	< - 20°C
DMPC	dimyristoylphosphatidylcholine acide myristique: 14 carbones saturés	neutre	24°C
DPPC	dipalmitoylphosphatidylcholine acide palmitique: 16 carbones saturés	neutre	41°C
DSPC	distéarylphosphatidylcholine acide stéarique: 18 carbones saturés	neutre	55°C
DOPC	dioléylphosphatidylcholine acide oléique: 18 carbones, 1 insaturation en C-9	neutre	- 20°C
DPPS	dipalmitoylphosphatidylsérine tête polaire de sérine	négative	56°C

Tableau 3.2: Description sommaire, charge globale de la membrane et température de transition des sept phospholipides utilisés dans l'étude de l'interaction actine-lipides par microcopie électronique. Les deux premiers sont des extraits naturels tandis que les cinq autres sont des phospholipides synthétiques.

La figure 3.17 montre les résultats obtenus avec des OLV composés d'azolectine en présence d'actine purifiée et de cations bivalents. Pour cette figure, et les six autres qui suivent, les barres représentent 300 nm et les planches A,B,C et D correspondent à des concentrations en CaCl_2 de 1, 2, 5 et 10 mM. On peut observer sur cette figure qu'il n'y a pas d'interaction entre l'actine et les liposomes d'azolectine aux quatre concentrations en Ca^{2+} . On peut noter que les liposomes sont bien sphériques et que les filaments d'actine sont disposés aléatoirement dans le milieu. Cependant, à 1 mM (A), on peut remarquer que très peu de filaments sont polymérisés et qu'il y a des agrégats d'actine-G libre (régions sombres).

A la figure 3.18, ce sont des liposomes de PCboeuf qui ont été étudiés. A 1 et 2 mM en Ca^{2+} (A et B) aucun OLV ne présente des filaments d'actine sur sa surface. Il faut atteindre 5 mM en cations bivalents avant de voir une interaction actine-lipides qui, dans la majorité des observations effectuées, est sous forme paracristalline. On note des paracristaux parallèles en C et D.

On peut voir à la figure 3.19 qu'il y a une très forte interaction entre l'actine et les liposomes de DMPC même à 1 mM en cations bivalents (A). En fait, tous les OLV observés aux différentes concentrations en Ca^{2+} sont totalement recouverts d'actine et sont largement déformés par la présence des filaments. Il est important de remarquer qu'en A (1 mM), aucun filament n'est observable en solution mais seulement à la surface des liposomes, on peut même voir les agrégats d'actine-G libre dans le milieu.

Les figures 3.20 et 3.21 représentent des liposomes de DPPC et DSPC respectivement. On peut voir sur ces figures qu'il y a aussi beaucoup d'interaction, et ce, même à 1 mM en Ca^{2+} . En fait, les trois types de liposomes composés de PC saturées (DMPC, DPPC et DSPC) se comportent de façon semblable en présence d'actine et de cations bivalents. Dans tous les cas il est possible d'observer de très beaux paracristaux.

A la figure 3.22 on peut voir des OLV composés de DOPC qui présentent une interaction actine-liposome seulement à partir de 2 mM en Ca^{2+} . En effet, à 1 mM (A) on remarque des liposomes sphériques qui ne présentent aucun filament à leur surface, ce qui n'est pas le cas à des concentrations de 2 mM et plus.

Finalement, on peut observer l'influence du DPPS sur l'interaction actine-lipides à la figure 3.23. Il faut d'abord mentionner que le DPPS est un phospholipide négatif qui ne forme pas de bicouche sphérique mais plutôt des bicouches planes. Ceci s'observe très bien sur la figure où on peut voir qu'il n'y a pas de liposome sphérique mais seulement des OLV difformes. En A et B, on peut noter qu'il n'y a pas d'interaction entre l'actine et les bicouches. A 5 et 10 mM en Ca^{2+} cependant, on observe quelques filaments disposés aléatoirement à la surface des OLV mais aucun paracristal. Il était toutefois possible d'en observer certains déposés directement sur la grille à une concentration de 10 mM, comme on peut le remarquer en D.

Dans l'ensemble, cette série d'expériences en microscopie électronique suggère que l'interaction actine-lipides dépend de la nature du phospholipide et qu'il semble y avoir un seuil critique en cations bivalents pour observer des filaments d'actine à la surface de chaque type de liposomes.

Figure 3.17: (Page suivante) Colorations négatives de solutions d'actine-G purifiée (0.1 mg/ml) et de liposomes OLV composés d'azolectine (0.4 mg/ml) en présence de diverses concentrations en CaCl_2 : A = 1 mM; B = 2 mM; C = 5 mM et D = 10 mM. La barre représente 300 nm.

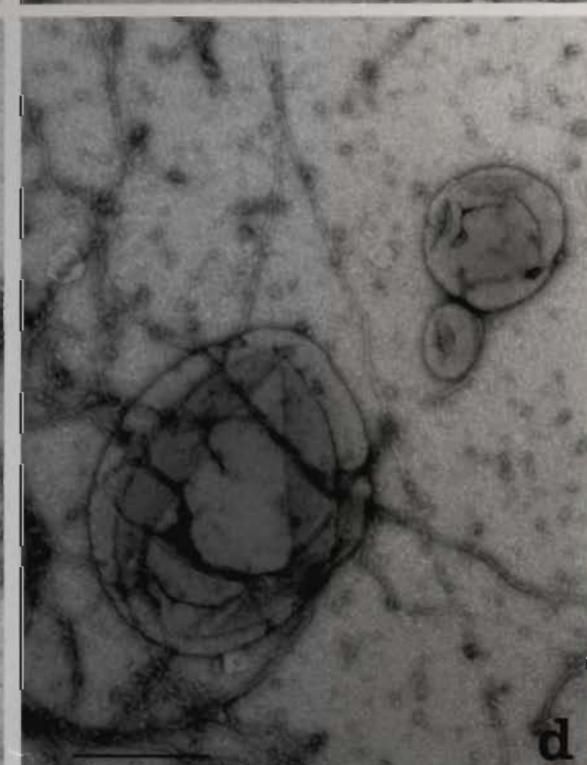
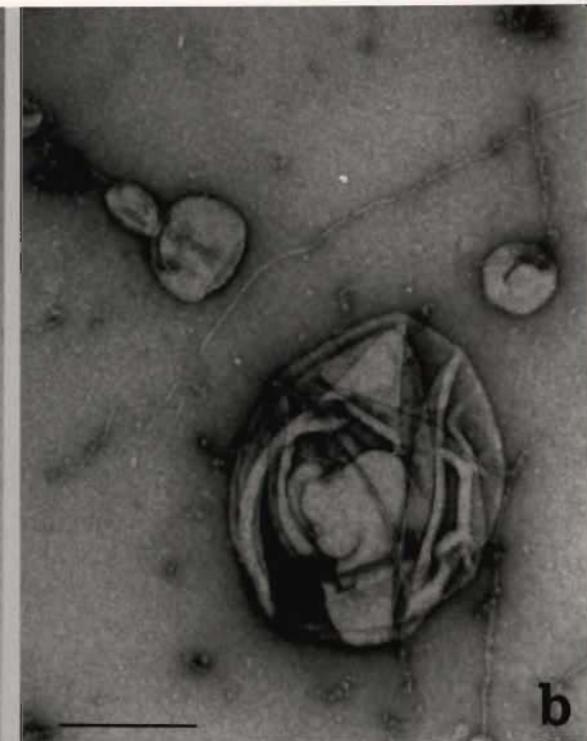
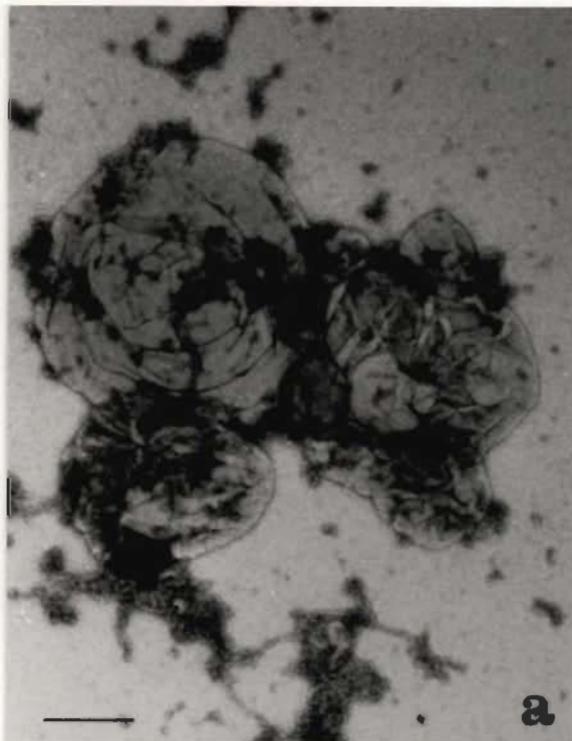


Figure 3.18: (Page suivante) Colorations négatives de solutions d'actine-G purifiée (0.1 mg/ml) et de liposomes OLV composés de PCboeuf (0.4 mg/ml) en présence de diverses concentrations en CaCl_2 : A = 1 mM; B = 2 mM; C = 5 mM et D = 10 mM. La barre représente 300 nm.

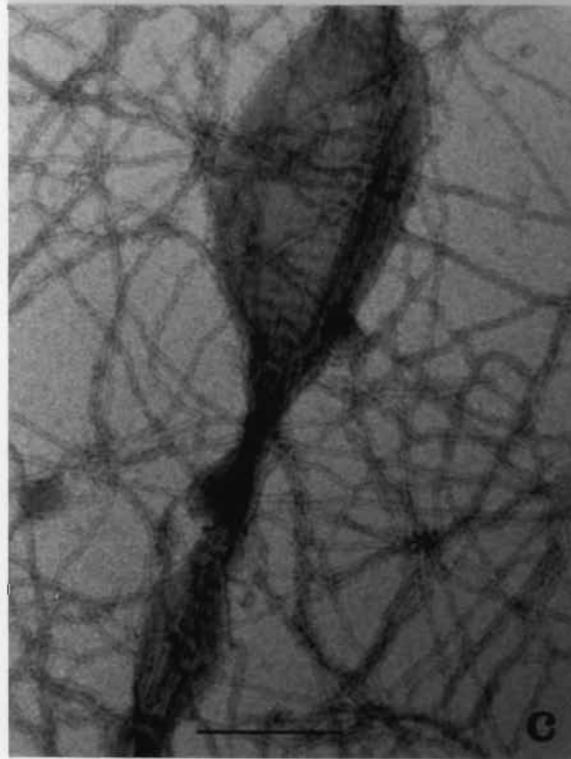
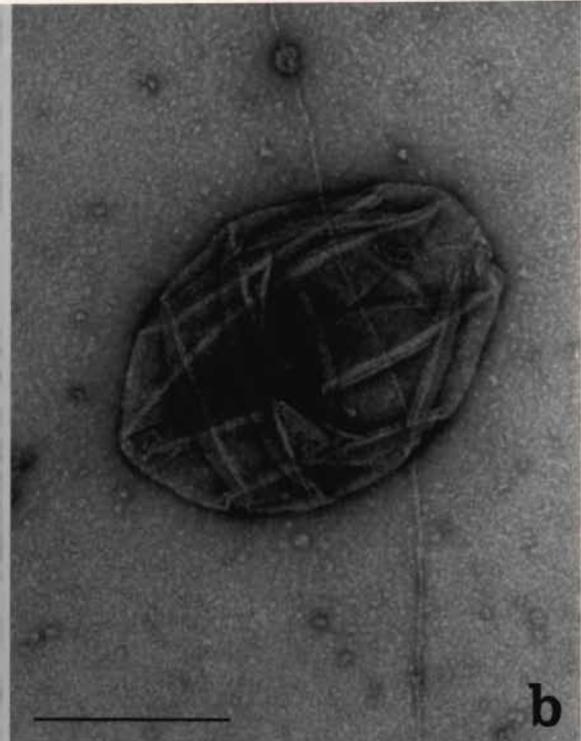
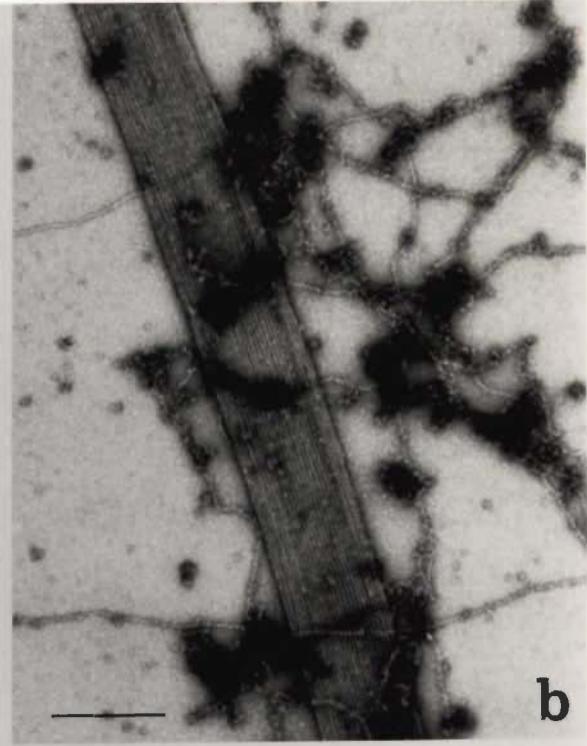
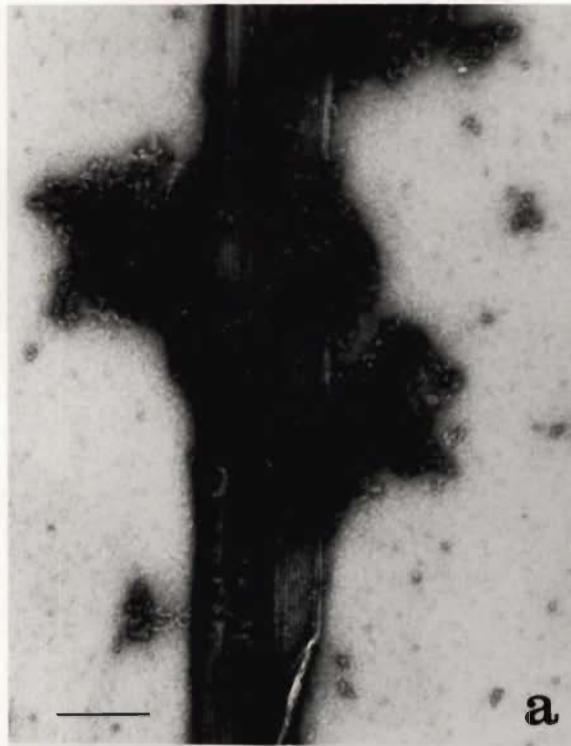
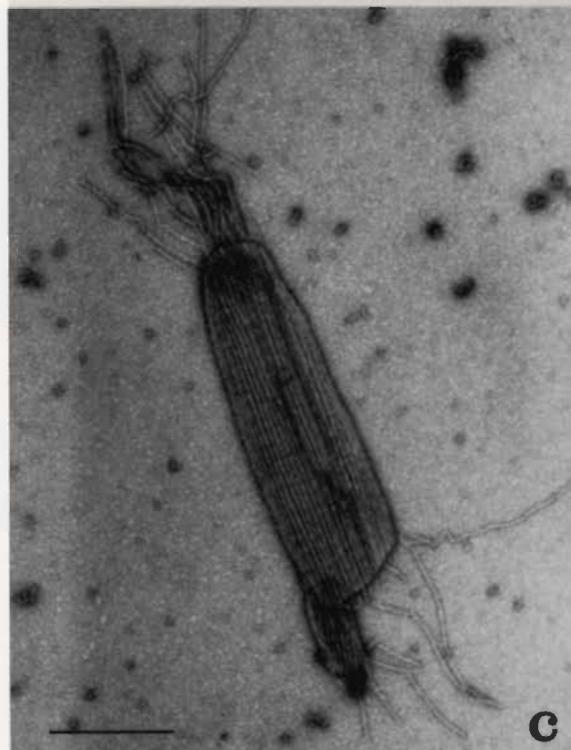


Figure 3.19: (Page suivante) Colorations négatives de solutions d'actine-G purifiée (0.1 mg/ml) et de liposomes OLV composés de DMPC (0.4 mg/ml) en présence de diverses concentrations en CaCl_2 : A = 1 mM; B = 2 mM; C = 5 mM et D = 10 mM. La barre représente 300 nm.



a

b



c



d

Figure 3.20: (Page suivante) Colorations négatives de solutions d'actine-G purifiée (0.1 mg/ml) et de liposomes OLV composés de DPPC (0.4 mg/ml) en présence de diverses concentrations en CaCl_2 : A = 1 mM; B = 2 mM; C = 5 mM et D = 10 mM. La barre représente 300 nm.

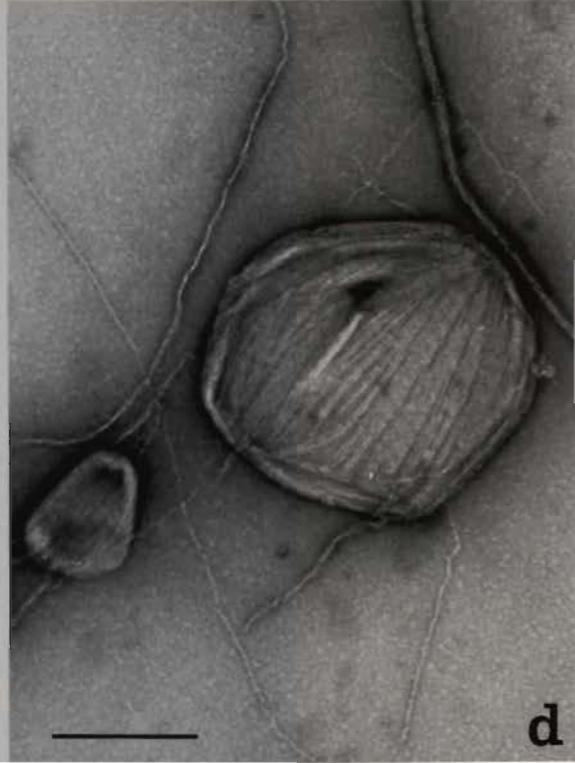
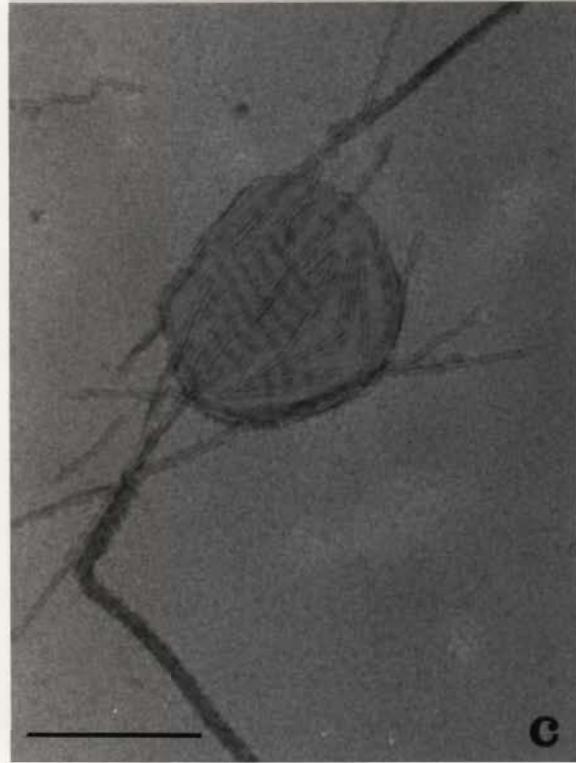
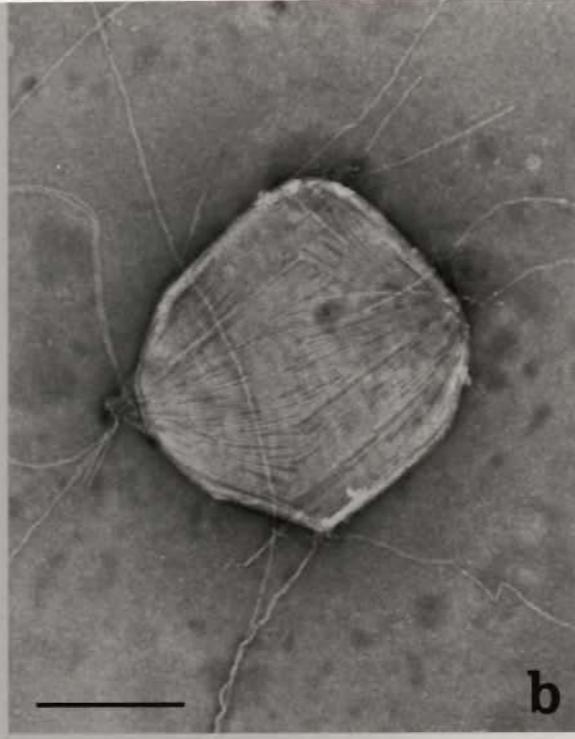


Figure 3.21: (Page suivante) Colorations négatives de solutions d'actine-G purifiée (0.1 mg/ml) et de liposomes OLV composés de DSPC (0.4 mg/ml) en présence de diverses concentrations en CaCl_2 : A = 1 mM; B = 2 mM; C = 5 mM et D = 10 mM. La barre représente 300 nm.

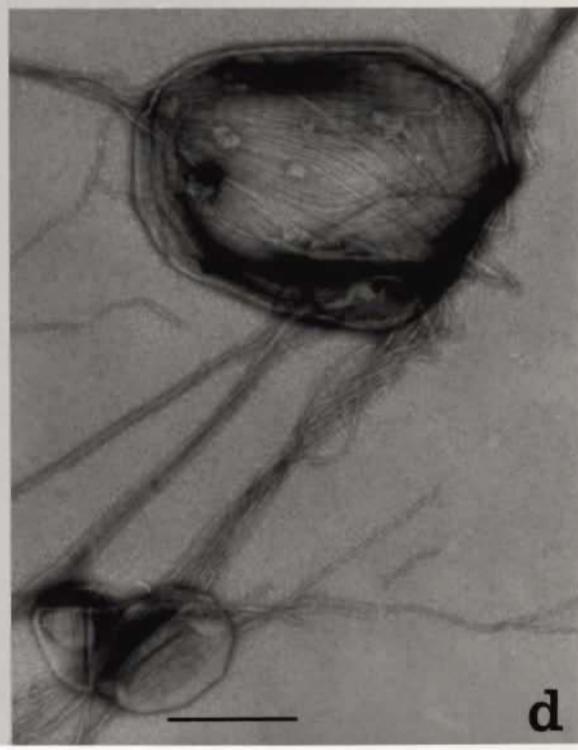
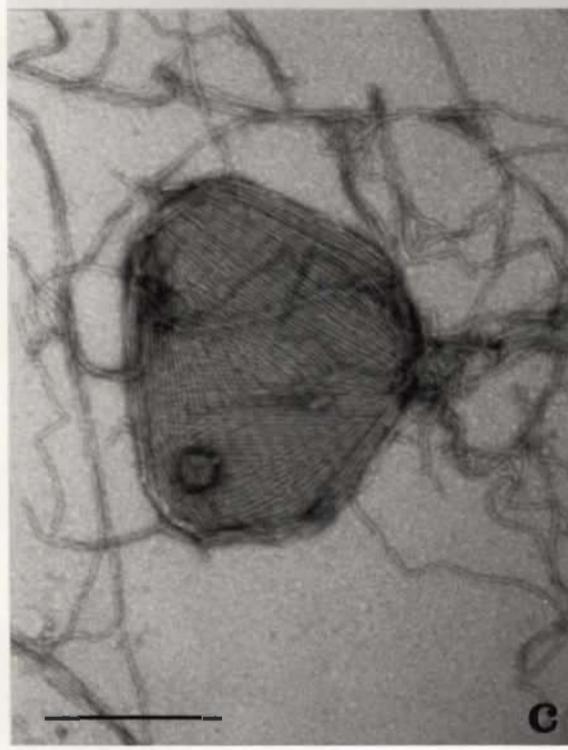
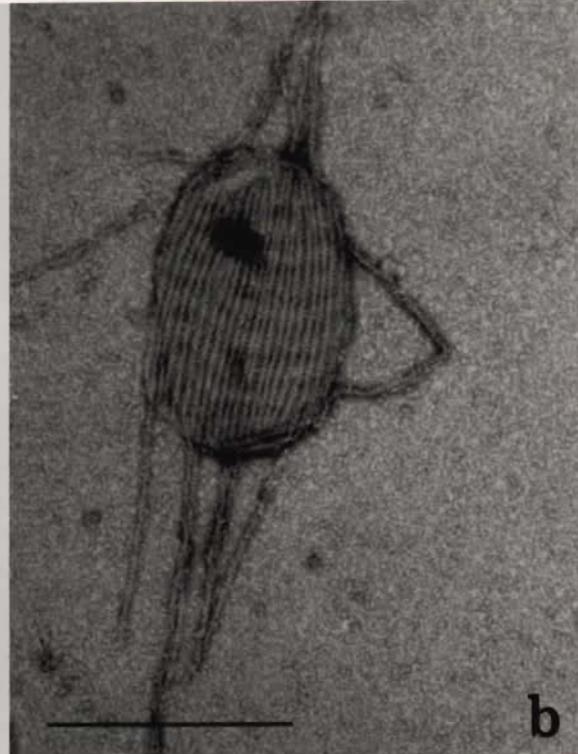


Figure 3.22: (Page suivante) Colorations négatives de solutions d'actine-G purifiée (0.1 mg/ml) et de liposomes OLV composés de DOPC (0.4 mg/ml) en présence de diverses concentrations en CaCl_2 : A = 1 mM; B = 2 mM; C = 5 mM et D = 10 mM. La barre représente 300 nm.

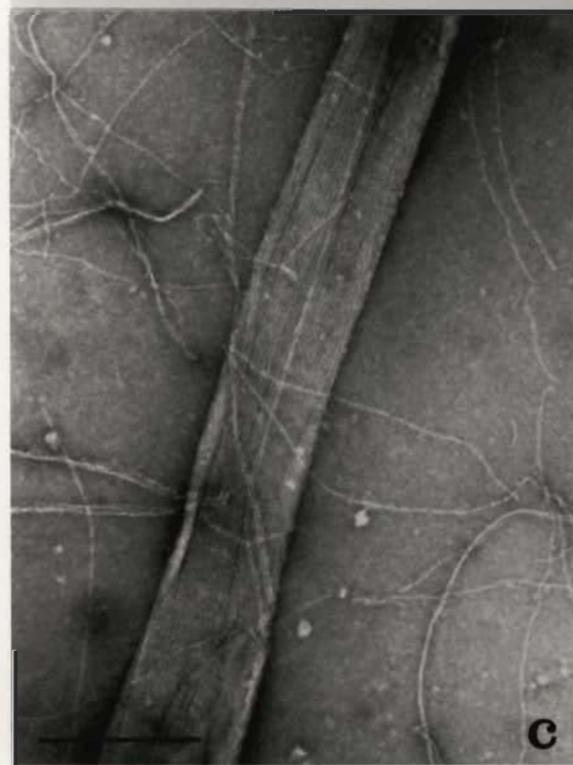
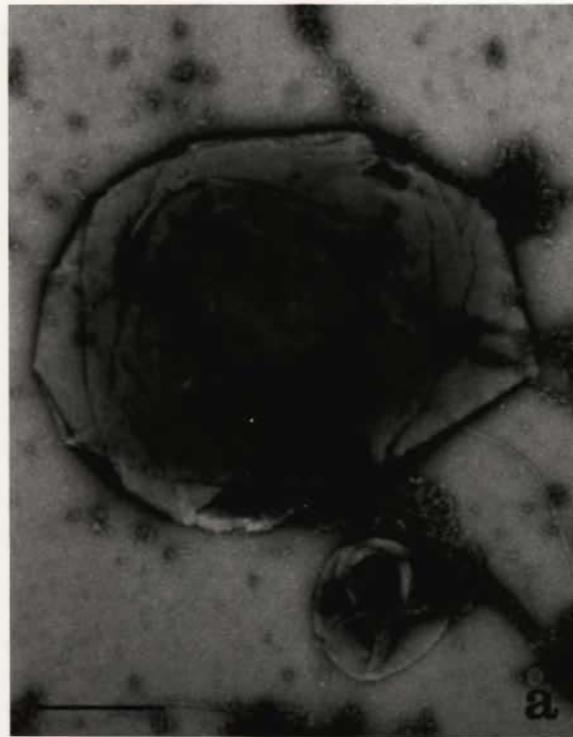
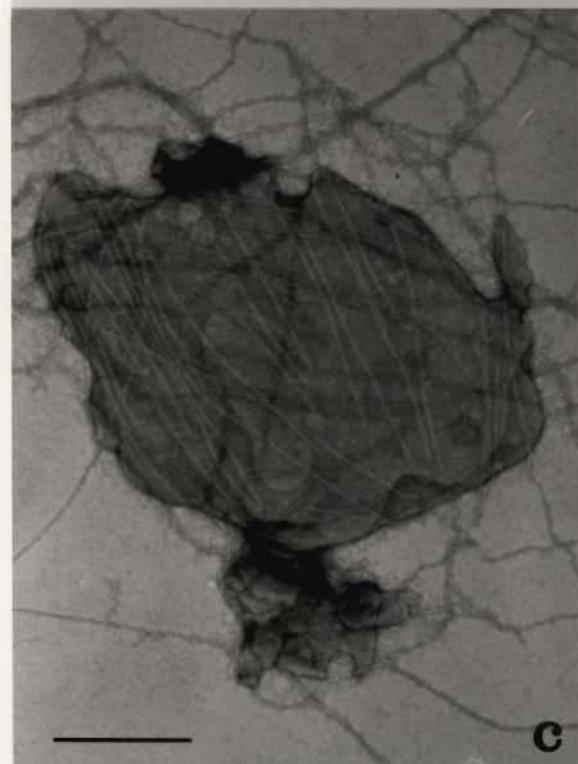
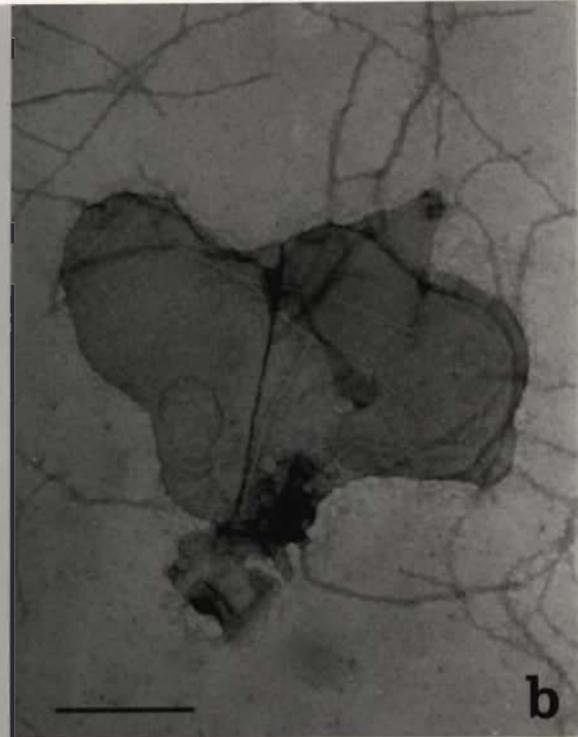
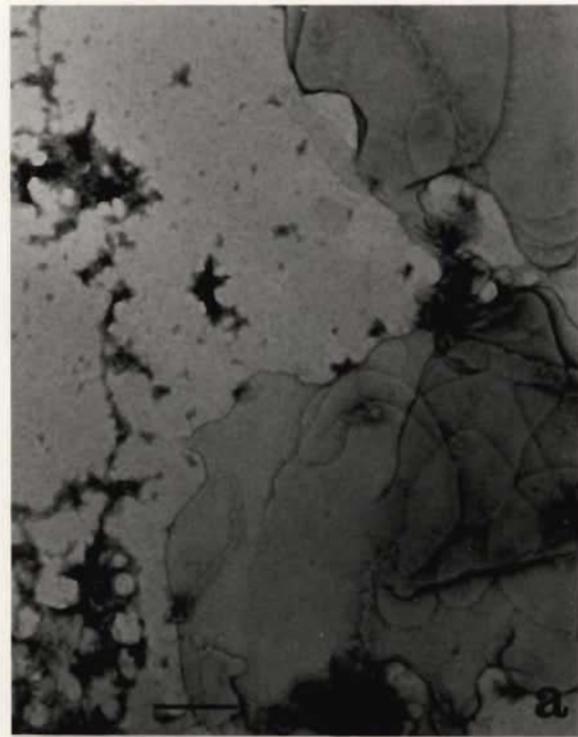


Figure 3.23: (Page suivante) Colorations négatives de solutions d'actine-G purifiée (0.1 mg/ml) et de liposomes OLV composés de DPPS (0.4 mg/ml) en présence de diverses concentrations en CaCl_2 : A = 1 mM; B = 2 mM; C = 5 mM et D = 10 mM. La barre représente 300 nm.



On peut dès lors se poser la question à savoir ce qui module l'interaction en fonction du type de phospholipides et de la concentration en cations bivalents. A ce sujet, les résultats obtenus avec les diverses PC sont éloquents: les PC saturées (DMPC, DPPC et DSPC) montrent une forte interaction dès l'ajout de 1 mM en cations bivalents, par contre, avec les PC insaturées (DOPC et PC_{boeuf}) il faut atteindre une concentration plus élevée (2 et 5 mM respectivement) en cations avant d'observer une interaction. Ce qui distingue le plus les PC saturées des PC insaturées est leurs températures de transition (voir tableau 3.2). Des cinq PC utilisées, les trois qui montrent une interaction à 1 mM en cations bivalents sont celles dont la température de transition est supérieure à la température ambiante, température à laquelle les manipulations ont été effectuées. Entre l'état gel et liquide-cristallin du DPPC par exemple, il y a près de 20% de différence au niveau de la densité moléculaire par unité de surface de bicouche (voir figure 1.7).

De plus, outre la densité moléculaire, ce phénomène semble amplifié avec les bicouches négatives (i.e. azolectine et DPPS). C'est-à-dire qu'il faut plus de cations bivalents pour observer une interaction, laquelle se présente sous une forme non paracristalline dans le cas du DPPS ($T_c = 56^\circ\text{C}$), et où aucune interaction n'est observable avec l'azolectine ($T_c \approx -15^\circ\text{C}$).

Il semble donc que la nature de la charge globale des liposomes soit aussi un paramètre important. D'ailleurs, certains travaux ont déjà mis en évidence l'importance du nombre de charges positives disponibles à la surface des liposomes dans l'interaction actine-lipides. Les travaux de Rioux et Gicquaud (1985) ont montré qu'il faut incorporer un minimum de 2% de stéarylamine (ratio molaire PC:SA \approx 20:1) à la phosphatidylcholine de jaune d'oeuf pour observer une interaction entre de l'actine-F et les liposomes. De plus, les travaux de Laliberté et Gicquaud (1988) ont montré que la quantité d'actine qui polymérise spontanément à la surface de liposomes (PC_{oeuf}) chargés positivement varie de

façon linéaire, avant de plafonner, avec le pourcentage de stéarylamine incorporée aux liposomes: l'écart va de 1 à 10%, ce qui représente des ratios PC:SA de l'ordre de 40:1 à 5:1.

Compte tenu de ce qui précède, il semble que la densité moléculaire et le nombre de charges positives à la surface des liposomes modulent l'interaction actine-lipides. Par conséquent, nous retenons pour hypothèse de travail que c'est la densité de charges positives en excès, à la surface de la bicouche phospholipidique, qui module l'interaction actine-lipides.

Nous avons voulu vérifier, de façon qualitative, cette hypothèse. Pour ce faire, nous avons utilisé des OLV de DSPC et DOPC dopés avec différentes fractions molaires en stéarylamine dans le but de voir si il y aurait une différence notable dans l'interaction actine-lipides entre l'état gel et liquide-cristallin et en fonction de la quantité de stéarylamine.

3.2.3 Étude de l'interaction actine-lipides en fonction de la densité de charges

Les températures de transition du DOPC et DSPC sont -20°C et 55°C respectivement, ce qui implique qu'à température ambiante le DOPC est à l'état liquide-cristallin et le DSPC à l'état gel. Entre ces deux états, il y a une variation significative de la densité moléculaire. En introduisant aux liposomes de la stéarylamine à des concentrations fixes, il sera possible d'évaluer l'importance de la variation de densité de charges positives causée par l'arrangement moléculaire différent de l'état liquide-cristallin d'un mélange DOPC:SA et de l'état gel d'un mélange DSPC:SA.

La stéarylamine est un lipide de charge positive composée d'une chaîne hydrocarbonée de type stéarique (18 carbones saturés), et d'une tête polaire comportant une fonction amine ($R-CH_2NH_3^+$). En introduisant ce genre de

lipide aux liposomes de PC, on change la charge globale neutre de la membrane en une charge globale positive. Ces membranes positives sont capables de faire polymériser l'actine à leur surface sans ajout de cations monovalents ou bivalents (Laliberté et Gicquaud, 1988).

Cependant, l'introduction de lipides, telle que la stéarylamine, dans les bicouches de PC modifie la transition de phase. En général, les longues chaînes hydrocarbonées saturées font augmenter la température de transition (Bach, 1984). Ortiz et Gomez-Fernandez (1987) ont montré que la température de transition augmentait de façon significative en ajoutant des quantités importantes d'acide stéarique (AS) à des liposomes composés de DMPC et DSPC. Toutefois, leurs résultats montrent qu'à de plus faibles quantités en AS (ratios molaires PC:AS allant de 50:1 à 8:1), la température de transition n'est pas augmentée de plus de 5°C pour les deux PC étudiées. En supposant que la stéarylamine se comporte de façon semblable à l'acide stéarique, les résultats de Ortiz et Gomez-Fernandez (1987) suggèrent qu'à de grands ratios DOPC:SA et DSPC:SA les températures de transition ne seront pas suffisamment augmentées pour modifier la phase à température ambiante.

Des OLV de DOPC et DSPC dopés à la stéarylamine avec des ratios molaires PC:SA de 30:1, 20:1 et 10:1 ont été fabriqués et mis en présence d'actine-G pour étudier l'interaction actine-lipides.

La figure 3.24 montre les résultats obtenus avec les OLV DOPC:SA où les planches A,B et C correspondent aux ratios 30:1, 20:1 et 10:1 respectivement. A 30:1, aucun filament n'a pu être observé à la surface des liposomes: on remarque sur cette planche des liposomes sphériques et des agrégats d'actine-G libre. A 20:1, une polymérisation partielle de l'actine à la surface des liposomes a pu être visualisée. Généralement, on a pu observer des filaments courts et peu de liposomes présentant des filaments d'actine à leur surface comme en

témoigne la planche B. Finalement, en C, à une plus forte concentration en SA (10:1), l'interaction est plus nette et la majorité des liposomes en solution présentaient de l'actine polymérisée à leur surface.

La figure 3.25 présente les observations obtenues avec les OLV de DSPC:SA. En A, où le ratio est de 30:1, on observe de courts filaments d'actine qui couvrent partiellement les liposomes, ce qui implique qu'il y a déjà une interaction partielle entre l'actine et les liposomes, contrairement à ce qu'il a été observé à la figure précédente. A 20:1 (B), la majorité des liposomes ont beaucoup d'actine polymérisée à leur surface et la quasi totalité des liposomes en solution sont couverts de filaments. Enfin, en C, aucun filament n'a polymérisé à la surface des liposomes et aucune interaction n'a pu être observée. Ce dernier résultat obtenu à un ratio molaire DSPC:SA de 10:1 est surprenant et difficilement expliquable. Ce sujet sera traité dans la discussion à la section 4.3.

Ces résultats suggèrent donc que l'interaction actine-lipides semble être modulée par la densité de charges causée, d'une part par la quantité de stéarylamine ajoutée aux liposomes, et d'autre part par l'arrangement moléculaire plus ou moins dense des états gel et liquide-cristallin.

Figure 3.24: (Page suivante) Colorations négatives de solutions d'actine-G purifiée (0.1 mg/ml) et de liposomes OLV (0.4 mg/ml) composés d'un mélange de DOPC:SA à différents ratios molaires: A = 30:1; B = 20:1 et C = 10:1. La barre représente 300 nm.

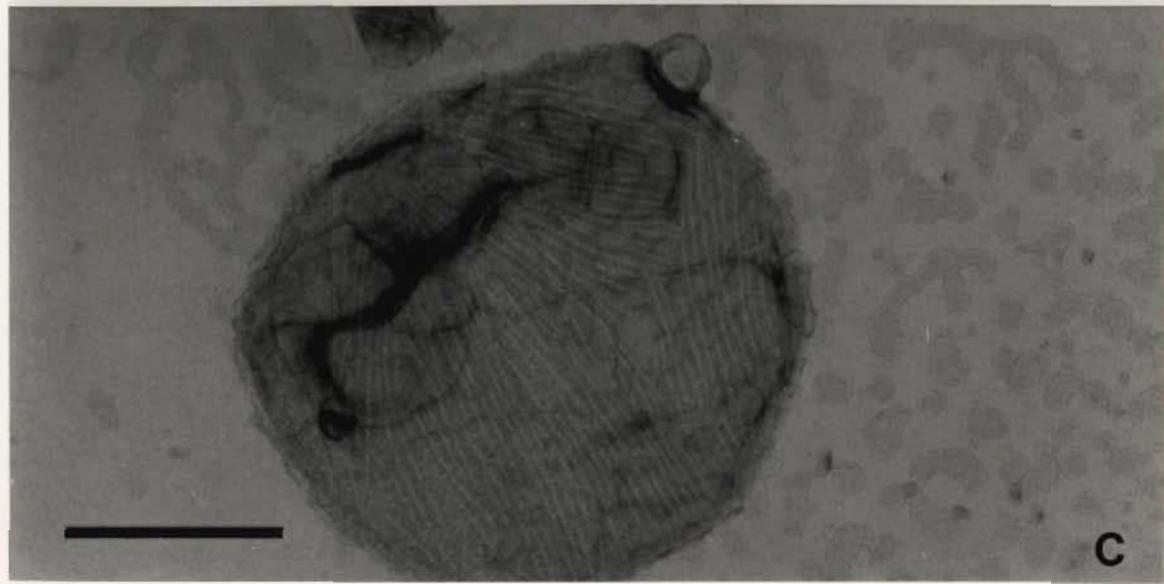
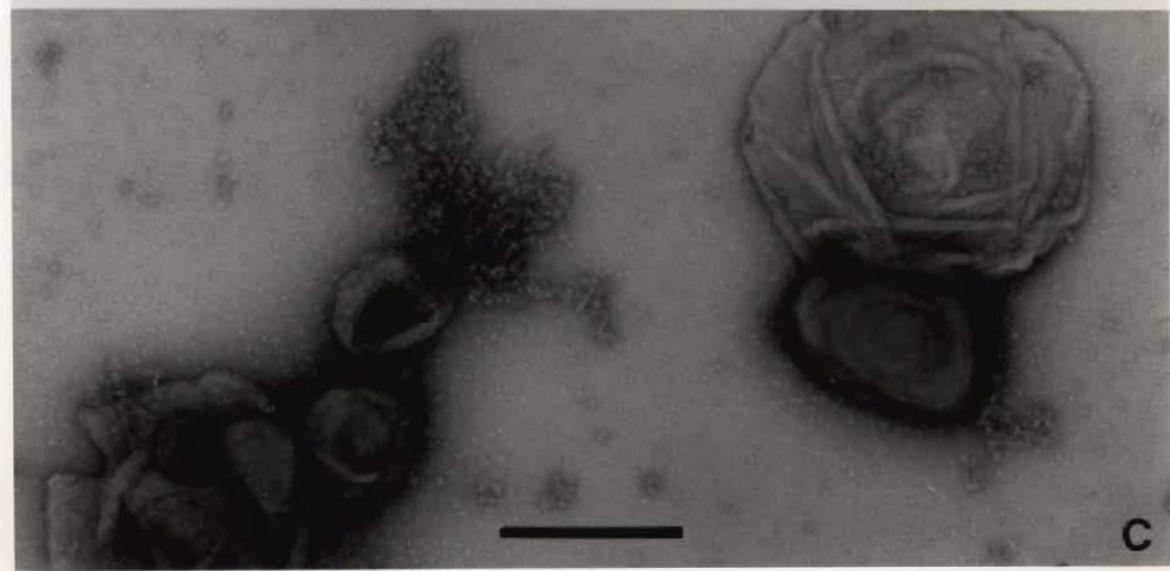
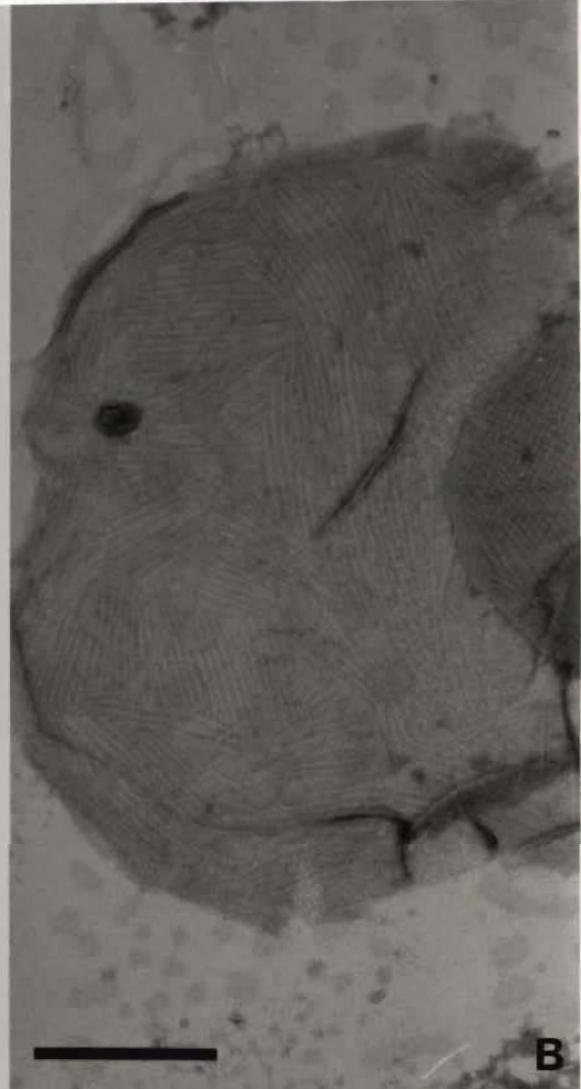
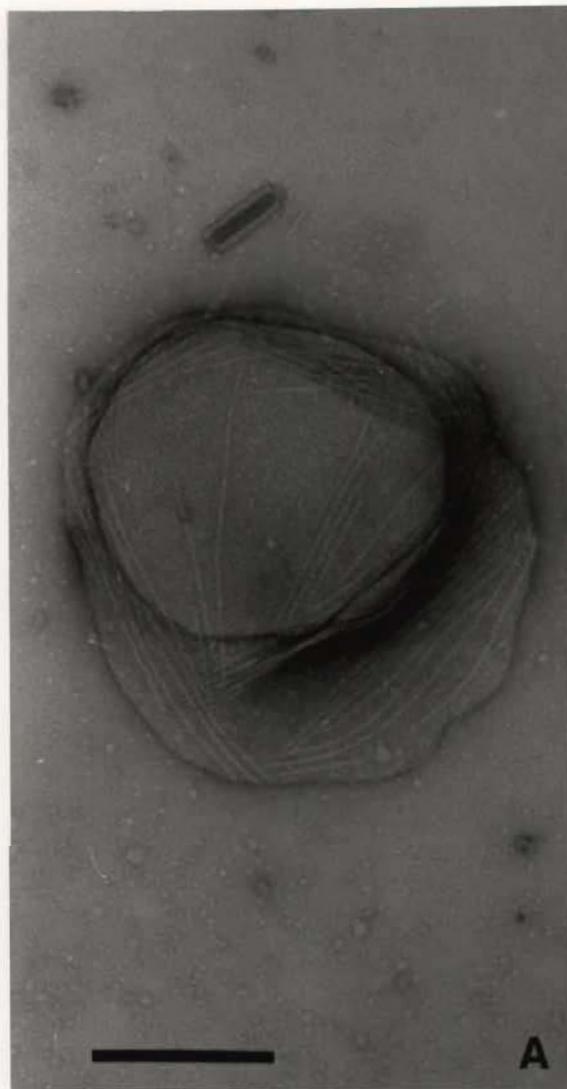


Figure 3.25: (Page suivante) Colorations négatives de solutions d'actine-G purifiée (0.1 mg/ml) et de liposomes OLV (0.4 mg/ml) composés d'un mélange de DSPC:SA à différents ratios molaires: A = 30:1; B = 20:1 et C = 10:1. La barre représente 300 nm.



3.2.4 Interprétation des résultats obtenus en microscopie électronique

Les trois études réalisées en microscopie électronique à transmission permettent de mettre en évidence les points suivants:

- 1) L'actine-G ne semble pas interagir avec les liposomes, contrairement à l'actine-F, d'où l'importance de la présence des cations bivalents en solutions qui favorise la polymérisation de l'actine et son attachement à la membrane.
- 2) Les liposomes de grande taille favorisent un plus haut taux de contact entre les filaments d'actine et la bicouche ce qui favorise par le fait même l'interaction actine-lipides.
- 3) De faibles concentrations en cations bivalents favorisent moins l'arrangement paracristallin en filet contrairement à ce qui a été observé par St-Onge et Gicquaud (1989 et 1990) à des concentrations en CaCl_2 de l'ordre de 20 mM.
- 4) L'interaction actine-lipides semble être modulée par plusieurs facteurs:
 - A- La nature des phospholipides joue un rôle important dans l'interaction: l'azolectine, un extrait brut de la membrane de la fève de soja (22% de PC avec des chaînes acyls composées d'environ 50% d'acide linoléique, 30% acide oléique et 10% d'acides saturés) ne montre aucune interaction entre 0 et 10 mM en cations bivalents; les PC montrent, en général, une forte interaction à de faibles concentrations en cations bivalents; et le DPPS, un lipide négatif, montre peu d'interaction même à 10 mM en cations bivalents.

B- Le taux d'insaturation des chaînes acyls est un facteur qui influence l'interaction: avec les PC comportant des insaturations (PC_{boeuf} et DOPC), il faut une plus grande concentration en cations bivalents avant d'observer une interaction comparativement aux PC saturées (DMPC, DPPC et DSPC).

C- La concentration en cations bivalents est aussi un facteur qui influence l'interaction: comme il a été mentionné au points A et B ci-dessus, la quantité de cations bivalents semble moduler l'interaction.

D- Le nombre de charges positives attribuées à la membrane par l'ajout de stéarylamine aux liposomes potentialise l'interaction: nos résultats confirment ceux de Rioux et Gicquaud (1985) et Laliberté et Gicquaud (1988).

E- La phase gel ou liquide-cristalline des bicouches a un impact sur l'interaction: entre les liposomes de DOPC:SA et DSPC:SA il faut moins de stéarylamine à ces derniers pour observer une interaction.

En conclusion, il est possible de déduire que tous ces facteurs, qui modulent l'interaction actine-lipides, pourraient être reliés à un seul paramètre: la densité des charges positives à la surface de la bicouche. Nos résultats, et ceux de plusieurs autres études tel qu'il a déjà été discuté plus haut, semblent mettre en évidence la prépondérance de la densité de charges dans l'interaction actine-lipides.

4.0 DISCUSSION

Nous tenterons dans ce chapitre d'analyser d'un œil critique les résultats obtenus et de faire un lien entre nos résultats et les travaux précédents qui ont porté sur l'interaction actine-lipides. De plus, nous ferons un survol des manipulations qui pourraient être entreprises pour mieux caractériser cette interaction directe et enfin, nous verrons quelles pourraient être les implications d'une telle interaction *in vivo*.

4.1 Analyse des résultats

Nos résultats obtenus en calorimétrie différentielle à balayage suggèrent que l'interaction directe actine-lipides serait un phénomène de surface, probablement purement électrostatique. Cependant, Okimasu *et al.* (1986) ainsi que St-Onge et Gicquaud (1990) ont montré que la perméabilité des liposomes à la carboxyfluorescéine était augmentée en présence d'actine, ce qui suggère qu'il y aurait une désorganisation partielle des chaînes acyles probablement causée par l'insertion d'un groupement hydrophobe de l'actine dans la bicouche.

Il semble donc qu'il y ait contradiction dans ces résultats. Toutefois, il faut remarquer que nos résultats sont originaux en ce sens que la DSC a été utilisée pour la première fois dans l'étude actine-lipides. Des travaux plus complets en DSC montreront peut-être un comportement de la transition de phase, en présence d'actine, différent de celui que nous avons observé, et ce, pour plusieurs raisons:

Premièrement, seul le DPPC a été utilisé dans la présente étude car l'appareil utilisé nous y contraignait. En effet, cette première génération de DSC n'était pas dotée d'un réfrigérateur et d'une enceinte adiabatique performante. En

conséquence, l'étude à basse température par le biais d'un réfrigérateur provoquait des problèmes de condensation, et à haute température l'appareil devenait instable à cause des pertes thermiques. Ces difficultés d'ordre technique provoquaient des oscillations trop importantes de la ligne de base du thermogramme pour utiliser adéquatement d'autres phospholipides qui auraient pu se comporter différemment en présence d'actine.

Deuxièmement, l'usage de fractions molaires plus élevées d'actine serait souhaitable pour mieux caractériser l'interaction. Comme nous l'avons vu, l'enthalpie de la transition principale diminue en présence de $MgCl_2$ aux plus grandes fractions molaires d'actine utilisées. Il faudrait poursuivre cette recherche pour des fractions molaires plus grandes, de façon à évaluer le comportement de la transition et vérifier s'il y a une affinité hydrophobe entre l'actine et les bicouches à de plus grands ratios actine/lipide. Pour ce faire il faudra nécessairement diminuer la concentration des lipides à cause de la concentration limite d'actine de 6 mg/mL, comme nous en avons déjà discuté à la section 3.1.3. Par contre, un DSC plus sensible et plus stable sera alors requis.

Troisièmement, comme nous l'avons vu en microscopie électronique, les liposomes SUV utilisés en DSC offrent peu de surface de contact aux filaments d'actine. Il faut aussi souligner que l'actine est une très grosse molécule par rapport à celle de DPPC. Si l'interaction d'un monomère d'actine qui compose le filament se faisait à des sites particuliers avec le lipide, il y aurait alors très peu de molécules de DPPC qui seraient perturbées par rapport à la superficie totale de la bicouche. La réponse microcalorimétrique en serait d'autant plus faible. Par conséquent, ceci pourrait expliquer d'une part, le fait que nos résultats montrent de très faibles perturbations au thermogramme du DPPC, et d'autre part, le fait que, si il y a une interaction hydrophobe partielle, nous n'avons pas pu la mettre en évidence.

Pour toutes ces raisons, nos résultats ne rejettent pas du revers de la main la possibilité d'une affinité hydrophobe entre l'actine et les lipides, tel qu'il a été suggéré dans les travaux de St-Onge et Gicquaud (1990), soit par une petite région hydrophobe de l'actine, soit par l'insertion d'un acide gras provenant de l'acylation de l'actine. Cependant, la DSC est une technique très sensible, et toute incorporation hydrophobe perturbe de façon significative la transition de phase des lipides. Si tel était le cas, une telle interaction aurait dû être détectée, surtout en présence d'actine-G. Or, nous n'avons pas observé de changements dans l'allure des thermogrammes.

De plus, et sans vouloir faire une analyse critique de la méthode de perméabilité membranaire à la carboxyfluorescéine, certains résultats obtenus par St-Onge (1990) et Okimasu *et al.* (1986) ne concordent pas. St-Onge (1990) a montré que la perméabilité membranaire était augmentée par l'actine-G, l'actine-F et un mélange d'actine-G et de cations bivalents, mais diminuée par un mélange d'actine-F et de cations bivalents⁶. Ses travaux étaient réalisés avec des lipides de source naturelle ($T_p \approx -20^\circ\text{C}$), donc à l'état liquide-cristallin. Okimasu *et al.* (1986) ont montré que seule l'actine-F rendait les liposomes perméables, et non l'actine-G, et ce, seulement à la température de transition. Les conditions expérimentales en terme de quantité et de type de sels utilisés n'étaient toutefois pas mentionnées.

⁶ La nuance entre l'actine-G et l'actine-F est causée par le tampon utilisé: tampon G et tampon F. Le tampon F est semblable au tampon G, sauf qu'il contient en plus 40 mM de KCl et 1 mM de MgCl₂ ce qui fait polymériser l'actine en solution. Par conséquent, le fait de faire polymériser l'actine par le tampon F avant de l'ajouter aux liposomes par rapport à une polymérisation en présence des liposomes par l'ajout de cations bivalents seulement semble influencer la réponse expérimentale. Dans nos expériences, seul le tampon G a été utilisé.

Par conséquent, ces résultats sont contradictoires et c'est avec les résultats de cette seule technique de perméabilité des liposomes que repose l'hypothèse d'une interaction hydrophobe. On se doit alors d'envisager la possibilité que l'augmentation de la perméabilité à la carboxyfluorescéine en présence d'actine n'est peut-être pas seulement causée par une interaction hydrophobe mais aussi par des phénomènes membranaires tels que la fusion de liposomes et le flip-flop. En effet, l'ajout d'actine dans l'espace extravésiculaire provoque un stress au milieu: force ionique, potentiel transmembranaire, pression osmotique, etc. sont modifiés et peuvent influencer la perméabilité membranaire.

Finalement, une des caractéristiques expérimentales qui distingue notre étude des travaux de St-Onge et Okimasu *et al.* est le fait que nous avons travaillé avec de l'actine purifiée. L'électrophorèse de l'actine non-purifiée a montré jusqu'à 14 bandes tandis que celle de l'actine purifiée en a coloré seulement deux (voir section 2.2.3.4). Les 12 bandes éliminées lors de la purification pourrait peut-être expliquer la contradiction entre nos résultats et ceux de St-Onge et Okimasu *et al.*

En résumé, la possibilité d'une interaction hydrophobe est toujours plausible et plusieurs autres travaux devront être entrepris pour vérifier cette hypothèse. Par contre, l'existence de forces électrostatiques (jumelées ou non à des forces hydrophobes) dans le mécanisme d'interaction est plus que probable. Comme il a déjà été discuté au chapitre 3, et à plusieurs reprises, tous les travaux de l'équipe de Gicquaud *et al.* et ceux de la présente étude montrent l'importance des phénomènes de charges. Effectivement, ces travaux montrent clairement que l'interaction actine-lipides est fonction des charges disponibles à la surface de la bicouche, soit en faisant varier la nature des têtes polaires des phospholipides, soit en ajoutant des quantités précises de cations bivalents ou de lipides positifs. De plus, Llerenas (1985) a aussi montré que l'interaction était potentialisée par l'ajout de CaCl_2 à la phase aqueuse d'une monocouche de PC.

En conséquence, il semble que les forces électrostatiques soit le mécanisme principal dans l'interaction actine-lipides. Il reste maintenant à savoir si l'hypothèse de la densité des charges positives à la surface de la bicoche est valable et à déterminer le mécanisme précis de l'attachement électrostatique.

Nos résultats en microscopie électronique suggèrent que la densité des charges positives à la surface de la bicoche pourrait moduler l'interaction directe entre l'actine et les liposomes. A priori, cette hypothèse peut être critiquée puisqu'elle est basée sur seulement deux essais d'observations microscopiques qualitatives et subjectives. Cependant, les travaux de Rioux et Gicquaud (1985) ont montré qu'il faut incorporer aux liposomes de PC_{œuf} un minimum de 2% en stéarylamine pour observer une interaction sans formation de structures paracristallines, et une quantité supérieure à 5% en stéarylamine pour obtenir des structures paracristallines. Les travaux de Laliberté et Gicquaud (1988) ont montré par deux méthodes quantitatives que la quantité d'actine liée aux lipides dépend du taux de stéarylamine incorporée aux liposomes. Et une toute récente étude (Taylor et Taylor, 1992) a montré que la formation de paracristaux d'actine sur des monocouches composées de différents phospholipides était modulée par plusieurs facteurs: la quantité d'amine quaternaire; la longueur des chaînes acyls des phospholipides; et la phase gel ou fluide des lipides. Tous ces éléments influencent la densité de charge: certains influencent directement la densité des charges positives à la surface de la bicoche et certains autres influencent la densité moléculaire des lipides par unité de surface qui, par le fait même, a un impact sur la densité de charges.

Ces travaux et nos résultats suggèrent donc que la densité des charges positives en excès à la surface de la bicoche soit un élément déterminant dans l'interaction actine-lipides. De plus, ces études suggèrent aussi qu'il y a un seuil minimal de charges positives à atteindre avant que l'interaction puisse se produire.

4.2 Proposition d'un mécanisme d'interaction

Comme il vient d'être discuté, les forces électrostatiques au-delà d'un certain seuil de densité de charges positives seraient responsables de l'interaction directe actine-lipides. Cette hypothèse semble expliquer l'ensemble des résultats que nous avons obtenus en microscopie électronique et une grande partie des résultats obtenus par d'autres auteurs.

Au niveau du mécanisme d'interaction proprement dit, St-Onge et Gicquaud (1989) ont suggéré que les cations bivalents pourraient ponter l'actine à la bicouche en neutralisant les charges négatives des filaments et des phospholipides (voir figure 1.9). Ce mécanisme serait capable d'expliquer l'interaction qui existe entre l'actine et les lipides négatifs (e.g. PS), mais plus difficilement celui qui existe avec les lipides zwitterioniques (e.g. PC) parce que la charge négative se situe plus en profondeur au niveau du groupement phosphate, ou encore celui qui existe avec les bicouches positives (e.g. PC:SA) où l'ajout de cations bivalents n'est pas nécessaire.

Le mécanisme que nous proposons suggère que l'actine interagit directement avec les charges positives de la bicouche, et ce, à partir d'un seuil critique de densité de charges. Dans ces conditions, l'actine-F peut interagir directement avec les lipides et l'actine-G n'a plus nécessairement besoin d'un surplus de charges positives provenant des cations bivalents pour polymériser, mais peut polymériser directement à la surface des liposomes grâce aux charges positives de la bicouche.

Ce mécanisme d'interaction s'observe bien avec les liposomes de PC dopés avec une quantité minimale de stéarylamine sans ajout supplémentaire de

cations bivalents 7. Les monomères d'actine ont leurs sites anioniques neutralisés par les charges positives de la SA, ce qui induit la polymérisation mais seulement à la surface du liposome. Avec des filaments d'actine déjà polymérisés par l'ajout de sels en solution, une simple attraction électrostatique entre les charges négatives du filament et les charges positives de la SA provoque son attachement à la bicouche.

Avec les phospholipides zwitterioniques, l'ajout de cations bivalents est nécessaire pour neutraliser les charges négatives des groupements phosphates de façon à rendre la bicouche suffisamment positive pour qu'il y ait interaction et/ou polymérisation de l'actine à la surface du liposome. En effet, plusieurs travaux ont montré que les cations bivalents interagissaient avec la tête polaire des phospholipides au niveau du groupement phosphate (Herbette *et al.*, 1984; Lis *et al.*, 1981; McLaughlin *et al.*, 1978). Les travaux de Seelig *et al.* (Akutsu et Seelig, 1981; Altenbach et Seelig, 1984; Seelig *et al.*, 1987) ont montré qu'un cation bivalent forme un complexe avec deux phosphatidylcholines en neutralisant les charges négatives des groupements phosphates. La formation de ce complexe est accompagnée par un changement de conformation de la tête polaire où le groupement triméthylamine est repoussé vers l'extérieur de la bicouche et où la charge positive de ce groupement devient plus accessible en surface (McIntosh, 1980; Petersheim *et al.*, 1989; Seelig *et al.*, 1987). La bicouche devient alors globalement positive et l'actine est par conséquent capable d'interagir directement avec elle.

Cette interaction entre les cations bivalents et les têtes polaires est intéressante puisque l'affinité des cations pour les groupements phosphates est différente selon le type de cation ou de phospholipide utilisé (McLaughlin *et al.*, 1978; Lis *et al.*, 1981). Les travaux de McLaughlin *et al.* (1978) ont entre autre

7 Il est à noter que le tampon G contient une concentration de 0.2 mM en CaCl_2 pour empêcher la dénaturation de l'actine.

montré que l'affinité des ions Mg^{2+} et Ca^{2+} avaient la même constante de dissociation pour des bicouches de PC de jaune d'oeuf. Les travaux de Lis *et al.* (1981) ont montré que l'affinité du Ca^{2+} était légèrement plus grande que celle du Mg^{2+} pour des bicouches de DPPC. De même, les travaux de Lis *et al.* (1981) montrent aussi que l'affinité du Ca^{2+} est la même pour des bicouches de DMPC et DPPC, mais est plus faible pour le DOPC. Ces différences d'affinité entre les divers cations et phospholipides viennent appuyer notre étude puiqu'elles sont capables d'expliquer certains de nos résultats et qu'elles sont aussi un paramètre qui modifie la densité de charges positives à la surface des bicouches. En effet, car pour une même concentration de Ca^{2+} , par exemple, la densité résultante de charges positives à la surface d'une bicouche de DPPC sera plus grande de celle du DOPC.

Il est cependant important de souligner que dans le cas des phospholipides zwitterioniques, l'ajout de cations bivalents jouera sûrement deux rôles distincts: l'un sera de former des complexes avec les molécules de PC pour rendre la bicouche positive, et l'autre sera de neutraliser certaines charges négatives de l'actine pour provoquer la polymérisation. Toutefois, nos observations suggèrent que même les bicouches de PC pures peuvent induire la polymérisation spontanée de l'actine à sa surface, tout comme les liposomes dopés à la stéarylamine. La figure 3.19 A en fournit un bon exemple. On peut apercevoir sur cette micrographie d'une solution de DMPC et d'actine en présence de 1 mM en $CaCl_2$, qu'il y a des filaments d'actine seulement à la surface du liposome. A l'extérieur des liposomes, on aperçoit plutôt des amas d'actine-G non polymérisée.

Un autre facteur important est aussi à souligner. La densité critique de charges ne sera pas nécessairement obtenue seulement par l'ajout de cations bivalents, mais aussi par l'organisation des molécules de phospholipides. La figure 4.1 schématise deux bicouches, l'une de DPPC (A) et l'autre de DOPC (B), à température ambiante et en présence de cations bivalents. On peut observer

sur cette figure la différence significative d'environ 30% de la densité moléculaire entre l'état gel du DPPC et l'état liquide-cristallin du DOPC. Ceci implique que pour une concentration donnée en cations bivalents, la densité des charges positives entre la bicouche de DPPC et celle de DOPC à température ambiante en sera d'autant modifiée.

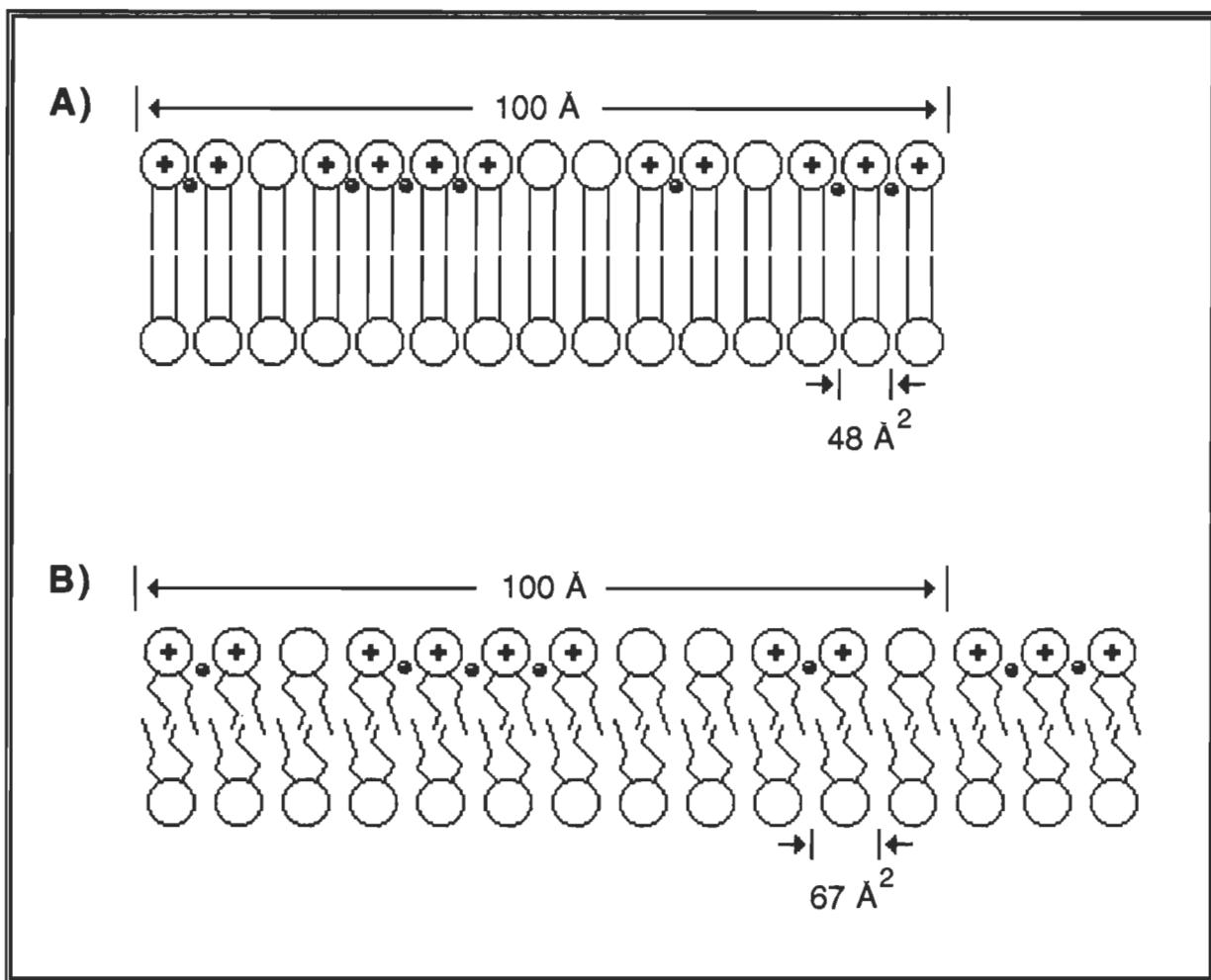


Figure 4.1: Schéma d'une bicouche de DPPC (A) et de DOPC (B) représentées à la température ambiante et en présence de cations bivalents (●). La température de transition du DPPC est de 42°C et celle du DOPC est de -20°C , ce qui implique qu'à température ambiante le DPPC est à l'état gel et le DOPC est à l'état liquide-cristallin. Entre ces deux bicouches à la température ambiante il y a une différence d'environ 30% dans la densité moléculaire des phospholipides, ce qui influence le nombre de charges positives par unité de surface causée par la présence des cations bivalents. Les aires moléculaires proviennent de Papahadjopoulos et Kimelberg, 1973.

Enfin, avec des bicouches négatives, un modèle similaire d'attachement de l'actine peut être envisagé, mais où il faudrait une plus grande concentration en cations bivalents pour neutraliser le surplus de charges négatives.

Le mécanisme proposé se résume donc en une interaction électrostatique dans laquelle les charges négatives de l'actine interagissent directement avec les charges positives de la bicouche (voir figure 4.2). Cette interaction serait modulée par tout ce qui influence la densité des charges positives de surface, à savoir la densité moléculaire de la bicouche et tout ce qui l'affecte (*e.g.* température, taux d'insaturation, etc.), l'affinité des cations bivalents pour les groupements phosphates des phospholipides, la concentration des cations bivalents, le taux de lipides positifs incorporés aux liposomes, etc. Finalement, il y aurait aussi une densité critique de charges positives à atteindre avant que l'interaction directe actine-lipides puisse se produire.

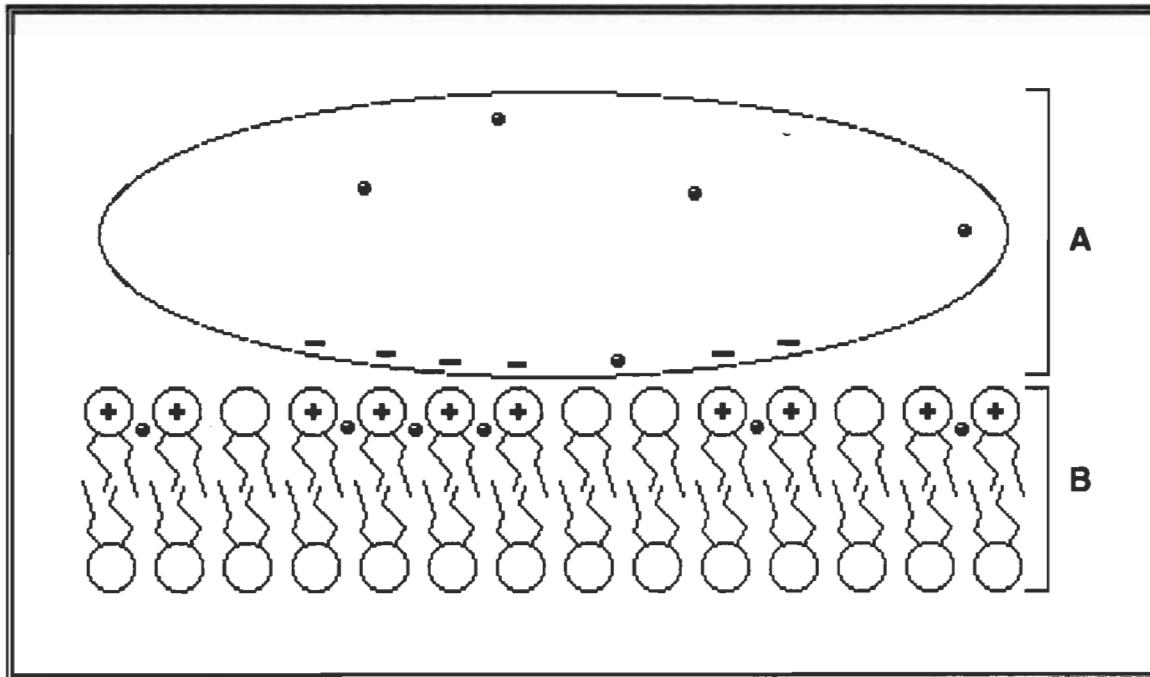


Figure 4.2: Représentation du mécanisme de l'interaction directe entre l'actine (A) et les bicouches phospholipidiques (B) tel que suggéré par la présente étude. Dans ce schéma, les cations bivalents (●) pontent deux molécules de PC pour rendre la bicouche globalement positive favorisant ainsi l'attraction électrostatique directe entre les charges négatives du filament d'actine et les charges positives des phospholipides. Cette interaction n'aurait lieu seulement qu'à partir d'une densité critique de charges positives de la bicouche.

4.3 Poursuite des études sur l'interaction actine-lipides

Si le mécanisme d'interaction que nous avons proposé semble plausible, la preuve expérimentale n'en ait toutefois pas faite. Plusieurs études pourraient être entreprises pour vérifier cette hypothèse et, le cas échéant, déterminer le seuil critique de la densité de charges nécessaire à cette interaction. Il faudrait aussi vérifier la possibilité d'une incorporation hydrophobe partielle, comme nous en avons déjà discuté. Enfin, le mécanisme d'interaction que nous proposons n'explique pas toutes les observations expérimentales qui ont été obtenues. Par exemple, citons trois cas particuliers:

- 1) La présente étude a montré que l'interaction semble se produire seulement à partir d'un certain seuil de densité de charges positives. Les observations réalisées avec les mélanges DOPC:SA et DSPC:SA semblent, en effet, mettre en évidence ce phénomène. Par contre, avec le mélange DSPC:SA à un ratio de 10:1 (figure 3.25 C), il n'y a plus d'interaction actine-lipides, comme s'il y avait aussi un seuil maximal de charges positives à ne pas dépasser. Et ceci n'est pas tout à fait étranger aux observations de Laliberté et Gicquaud (1988) qui ont montré que la quantité d'actine qui polymérise à la surface de liposomes chargés positivement augmente, plafonne et subit par la suite une chute progressive à de plus faibles ratios PC_{oeuf}:SA. Ce faisant, y aurait-t-il une densité de charges au-delà de laquelle l'interaction est inhibée?
- 2) St-Onge (1990) a montré que la perméabilité membranaire à la carboxyfluorescéine était diminuée si on faisait polymériser l'actine avant de l'ajouter à une solution de liposomes et de cations bivalents, mais était augmentée si on la faisait polymériser en présence des liposomes et des cations bivalents. L'actine-F déjà constituée interagirait-elle différemment ou jouerait-elle un rôle stabilisateur dans ces conditions?

3) Taylor et Taylor (1992) ont montré que l'arrangement de l'actine en paracristaux était différent selon la longueur des chaînes d'acides gras saturés utilisés et selon la température à laquelle leurs manipulations étaient réalisées. La variation de densité moléculaire pourrait expliquer cette différence car il y a un écart significatif de l'aire moléculaire pour les deux phospholipides qu'ils ont utilisés⁸. Mais ces auteurs ont suggéré que la fluidité des lipides était responsable de cette différence. De plus, Okimasu *et al.* (1987) ont montré que l'interaction actine-lipides semble inhibée par l'effet rigidifiant du cholestérol, même si ici aussi la variation de la densité moléculaire causée par l'ajout de cholestérol pourrait expliquer leurs résultats. Est-il possible que la fluidité membranaire influence elle aussi l'interaction actine-lipides?

Par conséquent, l'interaction actine-lipides ne semble pas chose simple. Afin de vérifier notre hypothèse de travail et d'éclaircir certains comportements de l'actine en présence des lipides, plusieurs méthodes d'études pourraient être utilisées pour réaliser des expériences complémentaires.

Par exemple, en calorimétrie différentielle à balayage avec un appareil qui refroidit, il serait probablement possible avec le DMPC ($T_c = 24^\circ\text{C}$) de vérifier l'impact de la phase gel par rapport à l'état liquide-cristallin. En effet, on pourrait étudier le comportement de la transition de phase du DMPC en incubant un mélange de liposomes, d'actine et des cations bivalents à froid et en faisant un thermogramme en chauffant, et inversement, une incubation à chaud avec un balayage en refroidissant. De plus, la DSC pourrait aussi être utilisée pour

⁸ Taylor et Taylor (1992) ont utilisé deux phospholipides; le DLPC (acide laurique; 12 carbones saturés) et le DPPC. Selon ces auteurs, le DLPC a une aire moléculaire/molécule de 48 \AA^2 et de 64 \AA^2 pour les phases L_β' et L_α respectivement tandis que pour le DPPC ces valeurs sont de 48 \AA^2 et 58 \AA^2 . La température de transition du DLPC est de 4°C .

étudier l'influence de très faibles concentrations en cations bivalents dans le but de déterminer la concentration seuil ainsi que l'influence de la fluidité membranaire de différents phospholipides.

En microscopie électronique, plusieurs mélanges de différents phospholipides et de stéarylamine pourraient être effectués pour mieux caractériser l'interaction et pour pouvoir faire une étude quantitative statistiquement valable. De plus, avec des phospholipides possédant une seule charge négative (i.e. PG, PI ou phosphatidate), il serait possible de vérifier si l'interaction actine-liposome se fait directement avec le lipide. En effet, des liposomes composés uniquement de DPPG par exemple ne devraient pas montrer de filaments d'actine à la surface des vésicules, et ce, même à de fortes concentrations en cations bivalents puisque ce lipide ne possède pas de charge positive.

En monocouche, plusieurs manipulations pourraient être faites parce qu'il est possible de faire varier la densité moléculaire des lipides, la composition des lipides et la charge globale de la monocouche. En spectroscopie de fluorescence à balayage, avec des sondes fluorescentes insérées à différents endroits de la tête polaire et en faisant varier la nature des phospholipides, la concentration en cations bivalents, ou la température d'incubation. En RMN et en infra-rouge...

Enfin, il est important de mentionner que nous nous sommes tournés jusqu'à présent vers l'étude presque exclusive du côté "lipides" de l'interaction actine-lipides. Il faudrait aussi envisager l'étude du côté "actine" de cette interaction, car l'actine est une macromolécule fort complexe qui peut, par exemple, changer de conformation en présence des lipides. Ou encore, il est peut-être possible que l'actine polymérisé différemment à la surface d'un liposome qu'elle le fait en solution par l'ajout de sels. Toutes ces études, qu'elles soient du côté "lipides" ou "actine" auraient tout à gagner si elles étaient réalisées avec de l'actine purifiée seulement.

4.4 Implication *in vivo* de l'interaction directe actine-lipides

La littérature fait mention que l'actine interagit essentiellement par le biais de protéines membranaires qui régularisent son attachement à la membrane. Cependant, quelques auteurs ont mentionné la possibilité d'un attachement direct de l'actine aux lipides. C'est le cas Geiger (1985), dans un article de revue sur les interactions microfilament-membranes, qui met en évidence des travaux montrant de "l'actine de surface cellulaire faiblement liée".

Toutefois, la membrane plasmique est généralement composée d'un mélange de phospholipides (têtes polaires et chaînes acyls) dans lequel baignent des quantités variables de protéines membranaires (dont certaines ABP), de lipides et glycolipides (e.g. cholestérol et gangliosides). La surface de la membrane possède par conséquent une charge globale négative où il y a encombrement stérique et où la densité de charges peut être très variable. Pour ces raisons, il est peu probable que l'interaction directe entre l'actine et les lipides membranaires soit un mécanisme important *in vivo*.

Par contre, les conditions dans lesquelles nos travaux et ceux de certaines études précédentes ont été réalisées ne sont pas incompatibles avec les conditions qui prévalent *in vivo*. Il n'est donc pas impossible que, dans certaines circonstances spécifiques, l'interaction directe actine-lipides puisse se produire dans les systèmes biologiques. Par exemple, la composition membranaire de certains organites cytoplasmiques varie beaucoup de celle de la membrane plasmique. L'interaction directe actine-lipides pourrait alors être un mécanisme qui régularise le maintien de quelques organites par le cytosquelette puisque les cellules peuvent contenir jusqu'à 8 mM en ions Mg^{2+} (Fulton, 1985). De plus, certains phénomènes motiles intracellulaires pourraient aussi être associés à l'interaction directe actine-lipides. Ceci pourrait être le cas de la migration des vésicules synaptiques le long de l'axone jusqu'à la terminaison présynaptique par le biais d'un moteur acto-myosine.

5.0 CONCLUSIONS

Nos résultats ont mis en évidence que l'interaction directe entre l'actine purifiée et des liposomes composés de phospholipides purifiés est possible *in vitro* dans certaines conditions expérimentales. Ceci vient appuyer et est en accord avec les résultats précédents qui ont porté sur l'étude de l'interaction directe actine-lipides.

Les conditions expérimentales nécessaires à l'observation de filaments d'actine sur la surface des liposomes semblent directement liées au nombre de charges positives situées à la surface de la bicouche. Ces charges positives peuvent être obtenues soit en incorporant des lipides positifs aux liposomes, soit en ajoutant des cations bivalents au mélange actine/lipide qui neutralisent les charges négatives de la bicouche et la rendent globalement positive.

Nos résultats suggèrent que ce n'est pas la valeur numérique du nombre de charges positives qui détermine l'interaction actine-lipides, mais plutôt la densité des charges positives à la surface de la bicouche. Il y aurait de plus une densité seuil à dépasser pour que l'actine puisse interagir avec les liposomes.

Le mécanisme proposé selon lequel l'actine se lie aux membranes serait de nature électrostatique où les charges négatives de l'actine interagissent directement avec les charges positives de la bicouche.

Ce mécanisme électrostatique direct initié par une densité de charges positives est capable d'expliquer plusieurs phénomènes observés entre l'actine et les bicouches, en particulier, le fait que l'actine monomérique ne semble pas interagir avec les membranes, contrairement à l'actine filamentuse. En effet, la polymérisation de l'actine est induite par la neutralisation des sites anioniques,

d'où l'importance d'avoir une densité de charges positives adéquate à la surface des liposomes qui potentialise à la fois la polymérisation de l'actine et son attachement à la bicouche.

L'implication *in vivo* d'une telle interaction directe entre l'actine et les membranes biologiques peut être possible, mais ne serait pas largement répandue et occuperait un rôle secondaire dans les mécanismes de régulation actine-membranes.

RÉFÉRENCES

- Adelstein, R.S. et Eisenberg, E. *Regulation and kinetics of the actin-myosin-ATP interaction*, Ann. Rev. Biochem., 1980, 49, 921-956.
- Akutsu, H. et Seelig, J. *Interaction of metal ions with phosphatidylcholine bilayer membranes*, Biochemistry, 1981, 20, 7366-7373.
- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. et Watson, J.D. *Molecular biology of the cell*, Garland, N.Y., 1983.
- Altenbach, C. et Seelig, J. *Ca²⁺ binding to phosphatidylcholine bilayers as studied by deuterium magnetic resonance. Evidence for the formation of a Ca²⁺ complex with two phospholipid molecules*, Biochemistry, 1984, 23, 3913-3920.
- Anzai, K.; Yoshida, M. et Kirino, Y. *Change in intravesicular volume of liposomes by freeze-thaw treatment as studied by the ESR stopped-flow technique*, Biochim. Biophys. Acta, 1990, 1021, 21-26.
- Armand, J.Y. et Vergnaud, J.M. *Effect of the value of heating rate in DSC on the kinetic parameters, when there is high enthalpy of reaction*, Thermochim. Acta, 1988, 131, 15-27.
- Bach, D. *Calorimetric studies of model and natural biomembranes*, In Chapman, D. (Ed), *Biomembrane structure and function: topics in molecular and structural biology*, Vol. 4, Verlag Chemie, Weinheim, 1984, 1-41.

Bangham, A.D.; Standish, M.M. et Watkins, J.C. *Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids*, J. Mol. Biol., 1965, 13, 238-252.

Bangham, A.D.; Hill, M.W. et Miller, N.G.A. *Preparation and use of liposomes as models of biological membranes*, Methods in Membrane Biol., 1974, 1, 1-68.

Barden, J.A.; Curmi, P.M.G. et Dos Remedios, C.G. *Cristalline actin tubes. The effect of the Th⁴⁺ on actin and the role of ionic charge in tube formation*, J. Biochem., 1982, 92, 1319-1323.

Barden, J.A. et Dos Remedios, C.G. *The environment of the high-affinity cation binding site on actin and the separation between cation and ATP sites as revealed by proton NMR and fluorescence spectroscopy*, J. Biochem., 1984, 96, 913-921.

Bayerl, T.M.; Schmidt, C.F. et Sackmann, E. *Kinetics of symmetric and asymmetric phospholipid transfer between small sonicated vesicles by high-sensitivity differential scanning calorimetry, NMR, electron microscopy and dynamic light scattering*, Biochemistry, 1988, 27, 6078-6085.

Biltonen, R.L. et Freire, E. *Thermodynamic characterization of conformational states of biological macromolecules using differential scanning calorimetry*, CRC Crit. Rev. Biochem., 1978, 5, 85-124.

Blume, A. *Applications of calorimetry to lipid model membranes*, In: Hidalgo C. (Ed), *Physical properties of biological membranes and their functional implications*, Plenum, N.Y., 1988, 71-121.

Blume, A. *Biological calorimetry: membranes*, Thermochim. Acta, 1991, 193, 299-347.

Bretscher, A. *Molecular architecture of the microvillus cytoskeleton*, In Ciba Foundation Symposium 95, *Brush Border membranes*, Pitman Books, London, 1983, 164-179.

Brown, M.E. *Introduction to thermal analysis: techniques and applications*, Chapman and Hall, New-York, 1988.

Burridge, K. et Phillips, J.H. *Association of actin and myosin with secretory granule membranes*, Nature, 1975, 254, 526-529.

Burridge, K.; Kelly, T. et Connell, I. *Proteins involved in the attachment of actin to the plasma membrane*, Phil. Trans. Roy. Soc. (London) Biol. Sci., 1982, 299, 291-299.

Chapman, D. *The structure of lipids*, Methuen, London, 1965.

Chapman, D.; Williams, R.M. et Ladbrooke, B.D. *Physical studies of phospholipid VI. Thermotropic and lyotropic mesomorphism of some 1,2-diacyl-phosphatidylcholine (lecithins)*, Chem. Phys. Lipids, 1967, 1, 445-475.

Chapman, D. *Biological membranes*, Vol. 1, Academic Press, N.Y., 1968.

Cohen, C.M.; Jackson, P.L. et Branton D. *Actin-membrane interactions: association of G-actin with the red cell membrane*, J. Supramol. Struct., 1978, 9, 113-124.

Condeelis, J.S. et Taylor, D.L. *The contractile basis of amoeboid movement. The control of gelation, solation and contraction in extracts from Dictyostelium discoideum*, J. Cell Biol., 1977, 74, 901-927.

Cooke, R. *The role of the bound nucleotide in the polymerization of actin*, Biochemistry, 1975, 14, 3250-3256.

Davies, G.E. *Association of actin with the platelet membrane*, Biochim. Biophys. Acta, 1984, 772, 149-160.

De Rosier, D.J. et Tilney, L.G. *The form and function of actin: a product of its unique design*, Cell and Muscle Motility, 1984, 5, 139-169.

Dos Remedios, C.G. et Dickens, M.J. *Actin microcrystals and tubes formed in the presence of gadolinium ions*, Nature, 1978, 278, 731-733.

Elzinga, M.; Collins, J.H.; Kuehl, W.M. et Adelstein, R.S. *Complete amino-acid sequence of actin of rabbit skeletal muscle*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1973, 70, 2687-2691.

Epand, R.M. et Raymer, K.E. *The shape of the gel to liquid crystalline phase transition of dielaidoylphosphatidylethanolamine is markedly dependent on the method of sample preparation*, Chem. Phys. Lipids, 1987, 43, 129-134.

Feuer, G.; Molnar, F.; Pettko, E. et Straub, F.B. *The composition and polymerization of actin*, Hung. Acta Physiol., 1948, 1, 150-163.

Fowler, V.M. et Bennett, V. *Erythrocyte membrane tropomyosin. Purification and properties*, J. Biol. Chem., 1984, 259, 5978-5989.

Freire, E.; Mayorga, O.L. et Straume, M. *Isothermal titration calorimetry: direct thermodynamic characterization of biological molecular interactions*, Anal. Chem., 1990, 62, 950-959.

Frieden, C. *Polymerization of actin: mechanism of the Mg^{2+} -induced process at pH 8.0 and 20°C*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983, 80, 6513-6517.

Fulton, A.B. *Treadmilling, diffusional exchange and cytoplasmic structures*, J. Muscle Res. and Cell Motility, 1985, 6, 263-273.

Geiger, B. *Microfilament-membrane interaction*, TIBS, 1985, 10, 456-460.

Gershman, L.C.; Estes, J.E. et Selden, L.A. *Actin polymerization is regulated by the tightly bound divalent cation*, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1984, 435, 151-153.

Gordon, D.L.; Bayer, J.L. et Korn, E.D. *Comparative biochemistry of non-muscle actins*, J. Biol. Chem., 1977, 252, 8300-8390.

Hanson, J., Abstr. 7th Int. Cong. Biochem., Tokyo, 1976 II-327; Sym. Biol. Hung., 1976, 8, 99.

Herbette, L.; Napolitano, C.A. et McDaniel, R.V. *Direct determination of the calcium profile structure for dipalmitoyllecithin multilayers using neutron diffraction*, Biophys. J., 1984, 46, 677-685.

Hirokawa, N. et Tilney, L.G. *Interactions between actin filaments and membranes in quick-frozen and deeply etched hair cells of the chick ear*, J. Cell Biol., 1982, 95, 249-261.

Hope, M.J.; Bally, M.B.; Webb, G. et Cullis, P.R. *Production of large unilamellar vesicles by rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential*, Biochim. Biophys. Acta, 1985, 812, 55-65.

- Jacobson, B.S. *Actin binding to the cytoplasmic surface of the plasma membrane isolated from Dictyostelium discoideum*, Biochim. Biophys. Res. Comm., 1980, 97, 1493-1498.
- Kabsch, W. et Vandekerckhove, J. *Structure and function of actin*, Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 1992, 21, 49-76.
- Kasahara, M. et Hinkle, P.C. *Reconstitution and purification of the D-glucose transporter from human erythrocytes*, J. Biol. Chem., 1977, 252, 7384-7390.
- Kawamura, M. et Maruyama, K. *Polymorphism of F-actin. Three forms of paracrystal*, J. Biochem., 1970, 68, 885-899.
- Knight, C.G. (Ed) *Liposomes: from physical structure to therapeutic applications*, Elsevier/North-Holland Biochemical Press, Amsterdam, 1981.
- Ladbrooke, B.D.; Williams, R.M. et Chapman, D. *Studies on lecithin-cholesterol water interactions by differential scanning calorimetry and X-ray diffraction*, Biochim. Biophys. Acta, 1968, 150, 333.
- Ladbrooke, B.D. et Chapman, D. *Thermal analysis of lipids, proteins and biological membranes*, Chem. Phys. Lipids, 1969, 3, 304-367.
- Lal, A.A.; Brenner, S.L. et Korn, E.D. *Preparation and polymerization of skeletal muscle ADP-actin*, J. Biol. Chem., 1984, 259, 13061-13065.
- Laliberté, A. et Gicquaud, C. *Polymerization of actin by positively charged liposomes*, J. Cell Biol., 1988, 106, 1221-1227.
- Lehrer, S.S. et Derwar, G. *Intrinsic fluorescence of actin*, Biochemistry, 1972, 11, 1211-1216.

Leserman, L.D. et Barbet, J. (Eds) *Méthodologie des liposomes appliquée à la pharmacologie et à la biologie cellulaire*, Editions INSERM, Paris, 1982.

Lewis, R.N.A.H.; Mak, N. et McElhaney, R.N. *A differential scanning calorimetric study of the thermotropic phase behaviour of model membranes composed of phosphatidylcholines containing linear saturated fatty acyl chains*, Biochemistry, 1987, 26, 6118-6126.

Lichtenberg, D. et Barenholz, Y. *Liposomes: preparation, characterization, and preservation*. Methods Biochem. Anal., 1987, 33, 337-462.

Lis, L.J.; Lis, W.T.; Parsegian, V.A. et Rand, R.P. *Absorption of divalent cations to a variety of phosphatidylcholine bilayers*, Biochemistry, 1981, 20, 1771-1777.

Llerenas, E. *The molecular interaction between F-actin and lecithin in a phospholipid monolayer system*, Bol. Estud. Med. Biol. Mex., 1985, 33, 33-39.

Loewry, A.G. *An actomyosin like substance from the plasmodium of a myxomycete*, J. Cell. Comp. Physiol., 1952, 40, 127-156.

Luna, E.J. et Hitt, A.L. *Cytoskeleton-plasma membrane interactions*, Science, 1992, 258, 955-964.

Mabrey, S. et Sturtevant, J.M. *High-sensitivity differential scanning calorimetry in the study of biomembranes and related model systems*, Methods Membr. Biol., 1978, 9, 237-274.

Mabrey-Gaud, S. *Differential scanning calorimetry of liposomes*. In: Knight, C.G. (Ed) *Liposomes: from physical structure to therapeutic applications*, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1981, 105-138.

Mangeat, P. et Burridge, K. *Actin-membrane interaction in fibroblasts: what protein are involved in this association?*, J. Cell Biol., 1984, 99, 95-103.

Mannherz, H.G. et Goody, R.S. *Proteins of contractile systems*, Ann. Rev. Biochem., 1976, 45, 427-465.

Marini, A.; Berbenni, V.; Massarotti, V. et Flor, G. *On the quantitative reliability of heat flux DSC*, J. Therm. Anal., 1988, 33, 337-342.

Maruyama, K. et Tsukagoshi, K. *Effects of KCl, MgCl₂ and CaCl₂ concentrations on the monomer-polymer equilibrium of actin in the presence and absence of cytochalasin D*, J. Biochem., 1984, 96, 605-611.

Mayer, L.D.; Hope, M.J.; Cullis, P.R. et Janoff, A.S. *Solute distributions and trapping efficiencies observed in freeze-thawed multilamellar vesicles*. Biochim. Biophys. Acta, 1985, 817, 193-196.

Mayer, L.D.; Hope, M.J. et Cullis, P.R. *Vesicles of variable sizes produced by rapid extrusion procedure*. Biochim. Biophys. Acta, 1986, 858, 161-168.

McElhaney, R.N. *The use of differential scanning calorimetry and differential thermal analysis in studies of model and biological membranes*, Chem. Phys. Lipids, 1982, 30, 229-259.

McElhaney, R.N. *Differential scanning calorimetric studies of lipid-protein interactions in model membrane systems*, Biochim. Biophys. Acta, 1986, 864, 361-421.

McIntosch, T.J. *Differences in hydrocarbon chain tilt between hydrated phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine bilayers: a molecular packing model*, Biophys. J., 1980, 29, 237-246.

McLaughlin, A.; Grathwohl, C. et McLaughlin, S. *The adsorption of divalent cations to phosphatidylcholine bilayer membranes*, Biochim. Biophys. Acta, 1978, 513, 338-357.

McNaughton, J.L. et Mortimer C.T. *La calorimétrie différentielle à balayage*, IRS; Physical Chemistry Series 2, 1975, 10 (publication traduite et distribuée par The Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, CT, USA).

Melchior, D.L. *Lipid domains in fluid membranes: a quick-freeze differential scanning calorimetry study*, Science, 1986, 234, 1577-1580.

Moore, P.L.; Bank, H.L.; Brissie, N.T. et Spicer, S.S. *Association of microfilament bundles with lysosomes in polymorphonuclear leucocytes*, J. Cell Biol., 1976, 71, 659-666.

Mooseker, M.S. et Tilney, L.G. *The organization of an actin filament-membrane complex: filament polarity and membrane attachment in the microvilli of intestinal epithelial cells*, J. Cell Biol., 1975, 67, 725-743.

Mraw, S.C. *Differential scanning calorimetry*. In: Cezairliyan, A. (Ed) *Specific Heat of Solids*, 1, Hemisphere, New-York, 1988, 395-435.

Nakamura, I.; Yamaguchi, M. et Yanagisawa, T. *Comparative studies on actins from various sources*, J. Biochem., 1979, 85, 627-631.

Nayar, R.; Mayer, L.D.; Hope, M.J. et Cullis, P.R. *Phosphatidic acid as a calcium ionophore in large unilamellar vesicle systems*, Biochim. Biophys. Acta, 1984, 777, 343-346.

Nonomura, Y.; Katayama, E. et Ebashi, S. *Effect of phosphates on the structure of the actin filament*, J. Biochem. (Tokyo), 1975, 78, 1101-1104.

Ogievetskaya, M.M. *Method for the determination of protein evolution rates by amino acid composition: evolution rate of actin*, *Origins of Life*, 1977, 8, 145-154.

Okimasu, E.; Fujii, Y.; Utsumi, T.; Yamamoto, M. et Utsumi, K. *Cytoplasmic proteins, association with phospholipid vesicles and its dependency on cholesterol*, *Cell Struct. Func.*, 1986, 11, 273-283.

Okimasu, E.; Nobori, K.; Kobayashi, S.; Suzaki, E.; Terada, S. et Utsumi, K. *Inhibitory effect of cholesterol on interaction between cytoplasmic actin and liposomes, and restorative effect of high osmotic pressure*, *Cell Struct. Func.*, 1987, 12, 187-195.

Oosawa, F. et Kasai, M. *Actin*, In: Timasheff, S.N. et Fasman, G.D. (Eds) *Subunits in biological systems*, part A, N.Y. Dekker, 1971, 261-322.

Ortiz, A. et Gomez-Fernandez, J.C. *A differential scanning calorimetry study of the interaction of free fatty acids with phospholipid membranes*, *Chem. Phys. Lipids*, 1987, 45, 75-91.

Oser, Y.; Talsma, H.; Crommelin, D.J.A. et Hincal, A.A. *Influence of freezing and freeze-drying on the stability of liposomes dispersed in aqueous media*, *Acta Pharm. Technol.*, 1988, 34 (3), 129-139.

Palek, J. et Shih, C.L. *Alterations of spectrin assembly in the red cell membrane: functional consequences*, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1981, 41, 131-138.

Papahadjopoulos, D. et Kimelberg, H.K. *Phospholipid vesicles (liposomes) as models for biological membranes: their properties and interactions with cholesterol and proteins*, *Prog. Surface Sci.*, 1973, 4, 141-232.

- Papahadjopoulos, D.; Moscarello, M.; Eylar, E.H. et Isac, T. *Effects of proteins on thermotropic phase transitions of phospholipid membranes*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1975, 401, 317-335.
- Pardee, J.D. et Spudich, J.A. *Purification of muscle actin*, *Methods in Enzymology*, 1982, 85, 164-181.
- Petersheim, M.; Halladay, H.N. et Blodnieks, J. *Tb³⁺ and Ca²⁺ binding to phosphatidylcholine. A study comparing data from optical, NMR, and infrared spectroscopies*, *Biophys. J.*, 1989, 56, 551-557.
- Pigeon, B. *Les liposomes: fabrication par ultrafiltration et détermination du taux d'encapsulation*, Projet de fin d'études en biophysique (UQTR, BIP-1007), 1988, Claude Gicquaud directeur.
- Pollard, T.D. et Cooper, J.A. *Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions*, *Ann. Rev. Biochem.*, 1986, 55, 987-1035.
- Privalov, P.L. *Stability of proteins: small globular proteins*, *Adv. Prot. Chem.*, 1979, 33, 167-241.
- Rawn, J.D. *Biochemistry*, Neil Patterson Publishers, Burlington, 1989.
- Ratna, B.R. et Chandrasekhar, S. *Some comments on the determination of enthalpies of liquid crystalline transitions by differential scanning calorimetry*, *Mol. Cryst. Liq.*, 1988, 162B, 157-159.
- Rioux, L. et Gicquaud, C. *Actin paracrystalline sheets formed at the surface of positively charged liposomes*, *J. Ultrastruct. Res.*, 1985, 93, 42-49.

Schwarz, F.P. et Kirchhoff, W.H. *Biological thermodynamic data for the calibration of differential scanning calorimeters: heat capacity data on the unfolding transition of ribonuclease A in solution*, Thermochim. Acta, 1988, 128, 267-295.

Seelig, J.; MacDonald, P.M. et Scherer, P.G. *Phospholipid head groups as sensors of electric charge in membranes*, Biochemistry, 1987, 26, 7535-7541.

Sheetz, M.P.; Painter, R.G. et Singer, S.J. *The contractile proteins of erythrocyte membranes and erythrocyte shape changes*. In: Goldman, R.; Pollard, T. et Rosenbaum, J. (Eds), *Cell motility*, Cold Spring Harbor Lab., vol. B, 1976, 651-664.

Singer, S.J. et Nicolson, G.L. *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes*, Science, 1972, 175, 720-731.

Skoza, F.Jr. et Papahadjopoulos, D. *Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes)*, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 1980, 9, 467-508.

Small, J.V. et Celis, J.E. *Filaments arrangements in negatively stained cultured cells: the organization of actin*, Cytobiology, 1978, 16, 308-325.

Smith, P.R. *Towards an alignment of the actin molecule within the actin filament*, Ultramicroscopy, 1984, 13, 113-123.

Spudich, J.A. et Watt, S. *The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I: Biochemical studies of the interaction of tropomyosin-troponin complex with actin and proteolytic fragments of myosin*, J. Biol. Chem., 1971, 246, 4866-4871.

St-Onge, D. *Synthèse des méthodes de préparation des liposomes*, Chapitres choisis en biophysique (UQTR, BIP-6017), 1988, Claude Gicquaud directeur.

St-Onge, D. *Étude de l'interaction entre l'actine et les lipides membranaires*, Thèse de doctorat en biophysique, UQTR, 1990.

St-Onge, D. et Gicquaud, C. *Evidence of direct interaction between actin and membrane lipids*, Biochem. Cell Biol., 1989, 67, 297-300.

St-Onge, D. et Gicquaud, C. *Research on the mechanism of interaction between actin and membrane lipids*, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1990, 167, 40-47.

Stossel, T.P. *Actin-membrane interactions in eukaryotic mammalian cells*, Current Topics In Membranes And Transport, 1990, 36, 97-107.

Strzelecka-Golaszewska, H.; Nagy, B. et 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.

Strzelecka-Golaszewska, H.; Prochniewicz, E. et Drabikowski, W. *Interaction of actin with divalent cations. Characterization of protein-metal complexes*, Eur. J. Biochem., 1978, 88, 229-237.

Stull, J.T. *Phosphorylation of contractile proteins in relation to muscle function*, Adv. Cyclic Nucleotide Res., 1980, 113, 39-93.

Taylor, D.L.; Condeelis, J.S.; Moore, P.L. et Allen, R.D. *The contractile basis of amoeboid movement*, J. Cell Biol., 1973, 59, 378-394.

- Taylor, K.A. et Taylor, D.W. *Formation of 2-D paracrystals on phospholipid layers mixed with quaternary ammonium surfactants*, J. Struct. Biol., 1992, 108, 140-147.
- Tilney, L.G. et Mooseker, M.S. *Actin filament-membrane attachment: are membrane particules involved?*, J. Cell Biol., 1976, 71, 402-416.
- Tobacman, L. et Korn, E.D. *The kinetics of actin nucleation and polymerization*, J. Biol. Chem., 1983, 258, 3207-3214.
- Tsilibary, E.C. et Williams, M.C. *Actin and secretion of surfactant*, J. Histochem. Cytochem., 1983, 31, 1298-1304.
- Utsumi, K.; Okimasu, E.; Morimoto, Y.M.; Nishihara, Y. et Miyahara, M. *Selective interaction of cytoskeletal proteins with liposomes*, FEBS-Lett., 1982, 141, 176-180.
- Vandekerckhove, J. et Weber, K. *At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide*, J. Mol. Biol., 1978, 120, 783-802.
- Wegner, A. *Treadmilling of actin at physiological salt concentrations: an analysis of the critical concentrations of actin filaments*, J. Mol. Biol., 1982, 161, 607-615.
- Weinstein, J.N.; Klausner, R.D.; Innerarity, T.; Ralston, E. et Blumenthal, R. *Phase transition release, a new approach to the interaction of proteins with lipid vesicles: Application to lipoproteins*, Biochim. Biophys. Acta, 1981, 647, 133-137.

Weissman, G. et Claiborne, R. *Cell membranes: biochemistry, cell biology and pathology*, Weismann and Claiborne (Eds), N.Y., 1975.

Wilkinson, D.A. et Nagle, J.F. *Thermodynamics of lipid bilayers*, In: Knight, C.G. (Ed) *Liposomes: from physical structure to therapeutic applications*, Elsevier/North-Holland Biochemical Press, Amsterdam, 1981, 273-298.

Wilschut, J. *Preparation and properties of phospholipid vesicles*, In: Leserman, L.D. et Barbet, J. (Eds) *Méthodologie des liposomes appliquée à la pharmacologie et à la biologie cellulaire*, Editions INSERM, Paris, 1982, 9-24.

Yamamoto, T.; Nojima, M.; Yamamoto, N.; Ishiura, S. et Sugita, S. *Effect of phosphatidyl-L-serine and vinculin on actin polymerization*, Int. J. Biochem., 1987, 19, 121-125.