

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

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

Comme exigence partielle
de la maîtrise en biophysique

par

Hélène Bombardier

Stabilisation de l'actine-F par l'ATP

Mai 1995

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

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

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

RÉSUMÉ

L'actine est une protéine présente dans toutes les cellules. Elle existe sous deux formes: la forme monomérique appelée actine-G et la forme filamenteuse, l'actine-F. L'actine est considérée, par la grande majorité des auteurs, comme une protéine du cytosquelette qui possède de multiples fonctions: motilité cellulaire, organisation de la membrane plasmique, structure de la cellule.

L'actine a deux sites de liaison pour les nucléotides:

- Le premier site est un site de haute affinité. Il ne lie que l'ATP ou l'ADP. La présence du nucléotide sur ce site joue deux rôles. Il maintient le monomère à l'état natif et empêche les monomères situés aux extrémités du filament de se détacher .

- Le deuxième site est un site de basse affinité pour les nucléotides. Il est peu spécifique et peut aussi bien fixer l'ATP, l'ADP que d'autres nucléotides. La présence d'un nucléotide sur ce site entraîne un changement de conformation de la protéine, mais le rôle de ce site n'est pas encore connu.

Dans leurs recherches, Ikeuchi et Dancker (25, 46, 47, 48) ont rapporté que la présence d'ATP stabilise l'actine contre l'effet d'agents dénaturants tels que la chaleur ou les agents chaotiques comme le SDS et le KI. Cependant, les travaux de ces auteurs sont très préliminaires et on connaît peu de chose quant à la protection de l'actine par les nucléotides, phénomène qui pourrait

jouer un rôle *in vivo*, car l'action de protection des nucléotides se fait à des concentrations compatibles avec celles qui existent dans les cellules.

Le but de notre travail est de mieux caractériser le rôle de l'ATP dans la stabilisation de l'actine. Nous avons, en particulier, étudié la spécificité des nucléotides par calorimétrie différentielle à balayage (DCS). En utilisant différents nucléotides nous avons déterminé quelles fonctions chimiques de la molécule sont impliquées dans la stabilisation de l'actine. Nous avons aussi vérifié par FTIR, si cette stabilisation par les nucléotides produit un changement de conformation de la protéine.

Nos résultats montrent que l'ATP stabilise l'actine-F contre la dénaturation thermique ainsi que contre la dénaturation due aux hautes pressions. En changeant la base du nucléotide nous avons établi que l'adénine est nécessaire à l'activité de ce nucléotide. En modifiant le nombre de phosphate du nucléotide et en utilisant les fluorures de béryllium et d'aluminium, qui sont des analogues structuraux du phosphate inorganique, nous avons établi que le troisième phosphate du nucléotide est nécessaire à son activité. En utilisant des analogues non-hydrolysables de l'ATP, nous avons montré que le clivage du phosphate ne joue pas de rôle dans la stabilisation de l'actine. En présence d'un excès d'ATP, cette stabilisation n'est pas accompagnée d'un changement de conformation de la protéine.

Ces résultats suggèrent que le site de liaison du nucléotide impliqué dans la stabilisation de l'actine est le site de haute affinité.

Pour expliquer la stabilisation de l'actine-F par l'ATP, nous proposons l'hypothèse suivante. Il existe un équilibre entre l'actine-G et l'actine-F.

L'actine-G se dénature à plus basse température que l'actine-F. Par conséquent, lorsqu'on augmente la température, on dénature d'abord les monomères d'actine, ce qui déplace l'équilibre vers la formation d'actine-G. Comme l'ATP empêche les monomères de se détacher du filament, l'ATP retarde la dépolymérisation et par conséquent, on stabilise l'actine contre la dénaturation thermique.

REMERCIEMENTS

Je tiens premièrement à remercier mon directeur de thèse, docteur Gicquaud pour sa disponibilité, sa patience et ses bons conseils.

Un gros merci à toutes les personnes que j'ai côtoyées et qui m'ont aidé à arriver au bout de mon projet. Je ne peux pas les remercier personnellement mais elles se reconnaîtront sûrement.

Un merci particulier à mes collègues de travail: Marc, Mira, Marylène, Jean-François, Robert et tous les autres pour les bons moments que j'ai passés à leur côté.

Merci à Dominique pour ses encouragements, sa générosité et sa présence. Enfin un merci très spécial à mes parents qui ont toujours été à mes côtés tout le long de mes études. Merci beaucoup.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	ii
REMERCIEMENTS.....	v
TABLE DES MATIÈRES	vi
LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xi
 1. INTRODUCTION.....	 1
1.1 Généralités sur l'actine.....	1
1.1.1 Structure du monomère	2
1.1.2 Structure du filament	4
1.1.3 Polymérisation de l'actine	4
a) la nucléation.....	6
b) l'élongation.....	7
c) l'état stationnaire ou treadmilling	7
1.2 L'actine et l'ATP	9
1.2.1 L'hydrolyse de l'ATP par l'actine.....	9
1.2.2 Possibilité de l'existence d'un deuxième site de liaison pour l'ATP	13
1.2.3 Stabilisation de l'actine par l'ATP	15
1.3 Problématique et objectif du travail.....	17
 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES	 19
2.1 Liste des produits chimiques	19
2.2 Préparation de l'actine	20
2.3 Préparation des nucléotides	21

2.4 Préparation du fluorure d'aluminium et du fluorure de béryllium	21
2.5 Techniques de mesure de la stabilité thermique de l'actine-F	22
2.5.1 Mesure de la dénaturation de l'actine-F par turbidimétrie	22
a) Introduction	22
b) Protocole expérimental	22
2.5.2 Mesure de la dénaturation de l'actine-F par fluorimétrie	23
a) Introduction	23
b) Protocole expérimental	24
2.5.3 Mesure de la dénaturation de l'actine par calorimétrie différentielle à balayage (DSC)	26
a) Description de l'appareil	26
b) Principe de l'appareil	27
c) Préparation des échantillons pour le DSC	30
2.5.4 Mesure de la dénaturation de l'actine-F par FTIR	31
a) Introduction	31
b) Préparation des échantillons pour l'étude, par FTIR, de la dénaturation de l'actine-F par les hautes pressions	32
c) Préparation des échantillons pour l'étude, par FTIR, de la dénaturation thermique de l'actine-F	33
2.6 Analyse statistique	34
3. RÉSULTATS	36
3.1 Effet de l'ATP sur la stabilisation thermique de l'actine-F	36
3.1.1 Expériences préliminaires: effet de l'ATP sur la cinétique de dénaturation de l'actine-F	36
a) Résultats obtenus par turbidimétrie	36
b) Résultats obtenus par fluorimétrie	38
3.1.2 Effet de l'ATP sur la transition de phase de l'actine-F obtenu par DSC	42

3.1.3 Étude, par FTIR, de l'effet des hautes pressions sur la dénaturation de l'actine-F.	46
a) Effet de l'ATP sur la conformation de l'actine-F à pression ambiante.	46
b) Effet des hautes pressions sur l'actine-F en absence et en présence d'ATP.	48
3.1.4 Étude, par FTIR, de l'effet de la température sur la dénaturation de l'actine-F.	53
3.2 Spécificité du nucléotide sur la stabilisation de l'actine-F.	54
3.2.1 Effet de la substitution de la base du nucléotide.	54
3.2.2 Effet du nombre de phosphates du nucléotide.	60
3.2.3 Effet du phosphate inorganique et de ses analogues.	65
3.3 Effet de l'hydrolyse de l'ATP sur la stabilisation thermique de l'actine-F.	73
3.4 Résumé des résultats.	78
4. DISCUSSION.	80
4.1 Introduction.	80
4.2 Critique de certaines techniques.	80
4.2.1 Le FTIR.	80
4.2.2 Le DSC.	82
4.2.3 Analyse des résultats.	84
4.3 Quel site du nucléotide est impliqué dans la stabilisation de l'actine-F?	86
4.4 Hypothèses sur le mécanisme de stabilisation de l'actine.	89
4.4.1 Déplacement de l'équilibre actine-F \longleftrightarrow G.	89
4.4.2 Changement de conformation du filament d'actine.	90
4.5 La stabilisation de l'actine-F par l'ATP joue-t-elle un rôle in vivo?	91
5. CONCLUSIONS.	94
6. RÉFÉRENCES.	96

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figures

1	Structure de l'actine-G	3
2	Structure de l'actine-F	5
3	Schéma de la polymérisation de l'actine	8
4	Schéma de l'hydrolyse de l'ATP par l'actine-F	11
5	Proportion des différents intermédiaires de l'hydrolyse de l'ATP au cours de la polymérisation de l'actine	12
6	Spectres de fluorescence de l'actine à l'état natif et à l'état dénaturé	25
7	Représentation schématique du DSC	27
8	Thermogramme idéal d'une réaction endothermique réversible	29
9	Effet de l'ATP sur la cinétique de dénaturation de l'actine-F, par turbidimétrie	37
10	Effet de l'ATP sur la cinétique de dénaturation de l'actine-F, par fluorimétrie	39
11	Effet de la concentration d'ATP sur le temps de demi-vie de l'actine	40
12	Exemple de calcul du temps de demi-vie	41
13	Thermogrammes d'actine-F en présence de différentes concentrations d'ATP	43
14	Effet d'une concentration croissante d'ATP sur la température de transition de l'actine-F	44
15	Effet d'une concentration croissante d'ATP sur l'enthalpie calorimétrique de l'actine-F	45
16	Spectres FTIR de la bande amide I de l'actine-F avant et après déconvolution	47
17	Spectres FTIR de la bande amide I de l'actine-F à pression ambiante	49
18	Spectres FTIR de la bande amide I de l'actine-F pour des pressions croissantes	51
19	Maximum de fréquence de la bande amide I de l'actine-F en présence et en absence d'ATP	52
20	Pourcentage de différentes structures secondaires de la bande amide I en fonction de la température obtenus par FTIR	56
21	Thermogrammes d'actine-F seule et d'actine-F en présence d'ATP, de CTP, d'UTP	

et de GTP	58
22. Effet de différentes concentrations d'ATP, de CTP, d'UTP et de GTP sur la température de transition de l'actine-F	59
23. Effet de différentes concentrations d'ATP, de CTP, d'UTP et de GTP sur l'enthalpie calorimétrique de l'actine-F	61
24. Thermogrammes d'actine-F seule et d'actine-F en présence d'ATP, d'ADP, d'AMP, d'AMPc et d'adénosine.....	63
25. Effet de différentes concentrations d'ATP,d'ADP, d'AMP, d'AMPc et d'adénosine sur la température de transition de l'actine-F.....	64
26. Effet de différentes concentrations d'ATP,d'ADP, d'AMP, d'AMPc et d'adénosine sur l'enthalpie calorimétrique de l'actine-F	66
27. Analogues du phosphate et hydrolyse de l'ATP	68
28. Thermogrammes d'actine-F seule et d'actine-F en présence d'ATP, de phosphate inorganique, de fluorure de béryllium et de fluorure d'aluminium.....	69
29. Effet de différentes concentrations d'ATP, de phosphate inorganique, de fluorure de béryllium et de fluorure d'aluminium sur la température de transition de l'actine-F ...	70
30. Effet de différentes concentrations d'ATP, de phosphate inorganique, de fluorure de béryllium et de fluorure d'aluminium sur l'enthalpie calorimétrique de l'actine-F	72
31. Thermogrammes d'actine-F seule et d'actine-F en présence d'ATP, d'AMP-PNP et d' ϵ -ATP	74
32. Effet de différentes concentrations d'ATP, d'AMP-PNPet d' ϵ -ATP sur la température de transition de l'actine-F	75
33. Effet de différentes concentrations d'ATP, d'AMP-PNPet d' ϵ -ATP sur l'enthalpie calorimétrique de l'actine-F	77

Tableau

1. Pourcentage des différentes structures de la bande amide I de l'actine-F en absence et en présence d'ATP.....	55
--	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABP: actin binding protein
ADP: adénosine 5'-diphosphate
AMP: adénosine 5'-monophosphate
AMPc: adénosine 3'-5' cyclic monophosphate
AMP-PNP: 5'-adénylylimidodiphosphate
ATP: adénosine 5'-triphosphate
 ϵ -ATP: N6-éthénoadénosine 5'-diphosphate
CTP: cystidine 5'-triphosphate
DSC: differential scanning calorimeter
FTIR: Fourier Transformed Infra-Red
GDP: guanosine 5'-diphosphate
GTP: guanosine 5'-triphosphate
HMM: heavy mero myosin
Kbar: Kilobar
Pi: phosphate inorganique
rpm: rotation par minute
UTP: uridine 5'-triphosphate

1. INTRODUCTION

1.1 Généralités sur l'actine

L'actine est une protéine présente dans toutes les cellules eucaryotes (56). Elle a été identifiée pour la première fois dans le muscle strié par Straub en 1942 (88).

Que ce soit l'actine des cellules musculaires, des amibes (28, 50), des lymphocytes (3) ou des hépatocytes (31, 67, 101), ces actines possèdent une composition en acides aminés et un poids moléculaire très voisins (71, 103), ce qui a permis de dire que tous les gènes qui codent pour l'actine dérivent d'un même gène ancestral.

L'actine est considérée, par la grande majorité des auteurs, comme une protéine du cytosquelette qui possède de multiples fonctions:

- Elle est impliquée dans la motilité cellulaire. Dans le muscle strié, le muscle cardiaque ou le muscle lisse, l'actine produit, avec la myosine, la contraction musculaire (1, 63, 92). De même, le mouvement amiboïde (23, 95), le déplacement d'organites (11, 68), la cytokinèse (39, 83), la réaction de l'acrosome du spermatozoïde (97, 98, 99), impliquent aussi la présence d'actine.

- L'actine a aussi des fonctions plus statiques: elle forme l'armature rigide qui sert de squelette à la cellule (10, 41). Associée à d'autres protéines, l'actine

peut donner la forme aux cellules. Par exemple, l'actine avec la spectrine, l'ankirine et la bande 4.1 contribue à la forme biconcave au globule rouge (74, 85). L'actine associée à la myosine-I, l' α -actinine et la 110 kD-calmoduline forme la structure de base des microvillosités des cellules intestinales (69).

L'actine peut se retrouver sous deux formes: la forme monomérique appelée actine-G et la forme filamenteuse appelée actine-F.

1.1.1 Structure du monomère

L'actine-G est formée d'une seule chaîne de 375 acides aminés. Elle a un poids moléculaire d'environ 42 000 Daltons (29). À l'état natif, la chaîne d'acides aminés est repliée sur elle-même pour former une structure ovoïde d'environ 3.5 par 5.5 nm (voir figure 1). La structure tridimensionnelle de l'actine-G, illustrée à la figure 1, a été déterminée par diffraction des rayons-X par Kabsch et Vandekerckhove (51). Le monomère comprend deux domaines: un grand et un petit domaine séparés par un sillon (51, 79, 86). On retrouve les extrémités amino et carboxy de la protéine dans le petit domaine. Chaque domaine est constitué de feuillets- β centraux entourés de deux ou trois hélices- α . Chaque domaine est aussi divisé en deux sous-domaines. Dans le sillon, on trouve un site pour un nucléotide qui peut être soit l'ATP, soit l'ADP (4).

On trouve aussi dans le sillon, un site de haute affinité pour un cation divalent (64, 55). Sans nucléotide et sans cation divalent, l'actine-G se dénature

rapidement (89) et perd ses propriétés, en particulier sa capacité de polymériser (60).

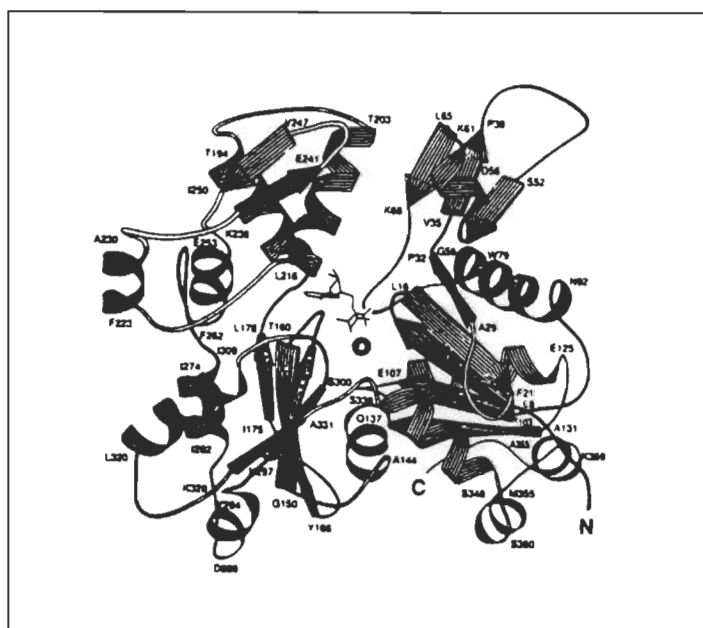


figure 1: Structure de l'actine-G. Tiré de : Kabsch et Vandekerckhove, 1992.

En plus du site de haute affinité situé dans le sillon, l'actine possède plusieurs autres sites pour les cations divalents. Il existe cinq sites de moyenne affinité (114) et des sites de basse affinité mais dont la localisation n'est pas connue. L'occupation du site de haute affinité est nécessaire pour le maintien de la protéine à l'état natif. L'occupation des sites de moyenne affinité par des cations divalents entraîne un changement de conformation du monomère qui

induit la polymérisation. Enfin, l'occupation des sites de basse affinité entraîne la formation de paracristaux (38, 89, 90, 91). Ces paracristaux d'actine sont une structure formée par des filaments disposés parallèlement et en phase.

1.1.2 Structure du filament

Le filament d'actine est formé de monomères disposés en double hélice tel qu'illustré à la figure 2. Le pas de l'hélice est de 36 nm. Chaque période contient 13 monomères distants de 5.5 nm (26). La largeur du filament est de 7 nm.

1.1.3 Polymérisation de l'actine

Lorsque quatre des cinq sites de moyenne affinité sont occupés par des cations divalents, il se produit un changement de conformation du monomère qui induit la polymérisation.

Généralement la polymérisation est produite par le Mg^{2+} ou le Ca^{2+} (32, 35, 66) mais d'autres cations peuvent aussi induire la polymérisation: le Mn^{2+} , le Sr^{2+} , le Zn^{2+} . Ces cations ne jouent cependant pas de rôle physiologique puisqu'on ne les retrouve pas à concentration suffisante dans les cellules (89, 90, 91).

Certains facteurs, tels que la concentration d'actine, la température, le type de solvant (52) peuvent modifier la polymérisation de l'actine en augmentant ou en diminuant la vitesse de polymérisation ou encore en changeant la concentration critique, qui est la concentration des monomères à l'équilibre.

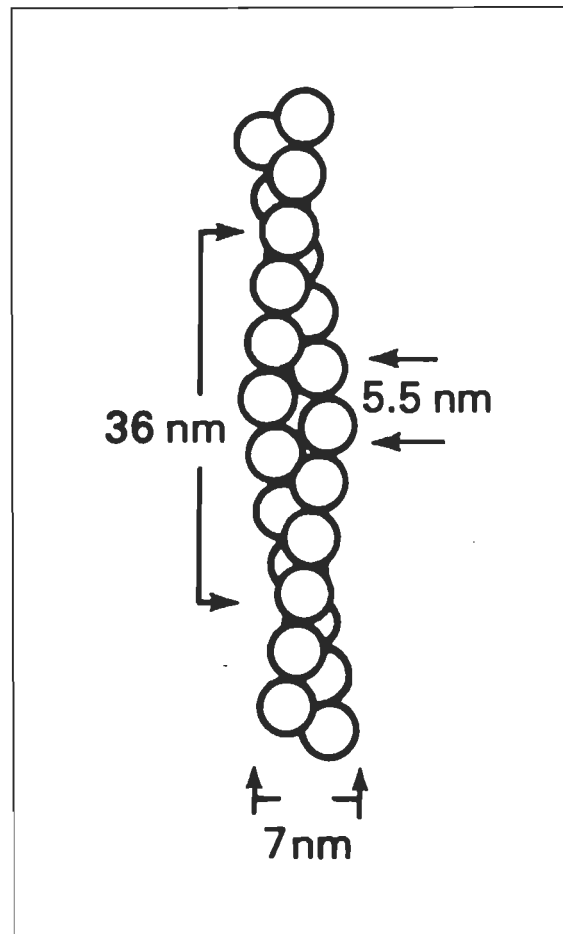


Figure 2: Structure de l'actine-F

La polymérisation de l'actine se divise en trois étapes (57, 73, 100, 104):

- a) la nucléation
- b) l'élongation
- c) l'état stationnaire ou treadmilling

Examinons plus en détail chacune de ces étapes.

a) la nucléation

La nucléation consiste en la formation d'un noyau de polymérisation. Le noyau de polymérisation est formé de trois monomères liés par des sites spécifiques. Ces sites sont rendus disponibles lors de la neutralisation de quatre des cinq sites de moyenne affinité par des cations divalents.

Selon le schéma suggéré par Wegner et Engel (107) puis par Oosawa et Kasai (73), chaque monomère possède quatre sites de liaison qui ont été nommés A, B, C et D. Les liens entre deux monomères ne peuvent s'établir qu'entre les sites A et B ou entre les sites C et D. On peut donc obtenir deux possibilités de dimères tel qu'illustré à la figure 3. Les dimères peuvent ensuite s'associer à un autre monomère pour former un trimère. C'est ce trimère qui est le noyau de polymérisation (33, 37, 96, 100). La nucléation est l'étape la plus lente. C'est donc l'étape limitante de la polymérisation.

b) l'élongation

L'élongation consiste en l'ajout de monomères à chaque extrémité d'un noyau, ce qui forme un filament. Comme le montre le schéma de la figure 3, à une extrémité du filament, ce sont les sites A et C qui sont libres, et à l'autre extrémité, les sites B et D. Comme l'affinité de ces sites est différent pour les monomères, les vitesses d'élongation seront différentes à chaque extrémité (54, 57, 80, 82, 94, 111). Le filament possède donc une extrémité à croissance lente appelée bout négatif et une extrémité à croissance rapide appelée bout positif (45).

c) l'état stationnaire ou treadmilling

Au cours de la polymérisation, la concentration des monomères diminue. Lorsque la concentration des monomères devient trop faible, l'élongation du filament s'arrête. Cette concentration de monomères se nomme la concentration critique.

À cette concentration, le bout de croissance lente (négatif) se dépolymérise tandis que le bout à croissance rapide (positif) continue à polymériser et ce, à la même vitesse (104, 106). La longueur du filament demeure donc constante. Ce phénomène s'appelle *treadmilling* (70, 105).

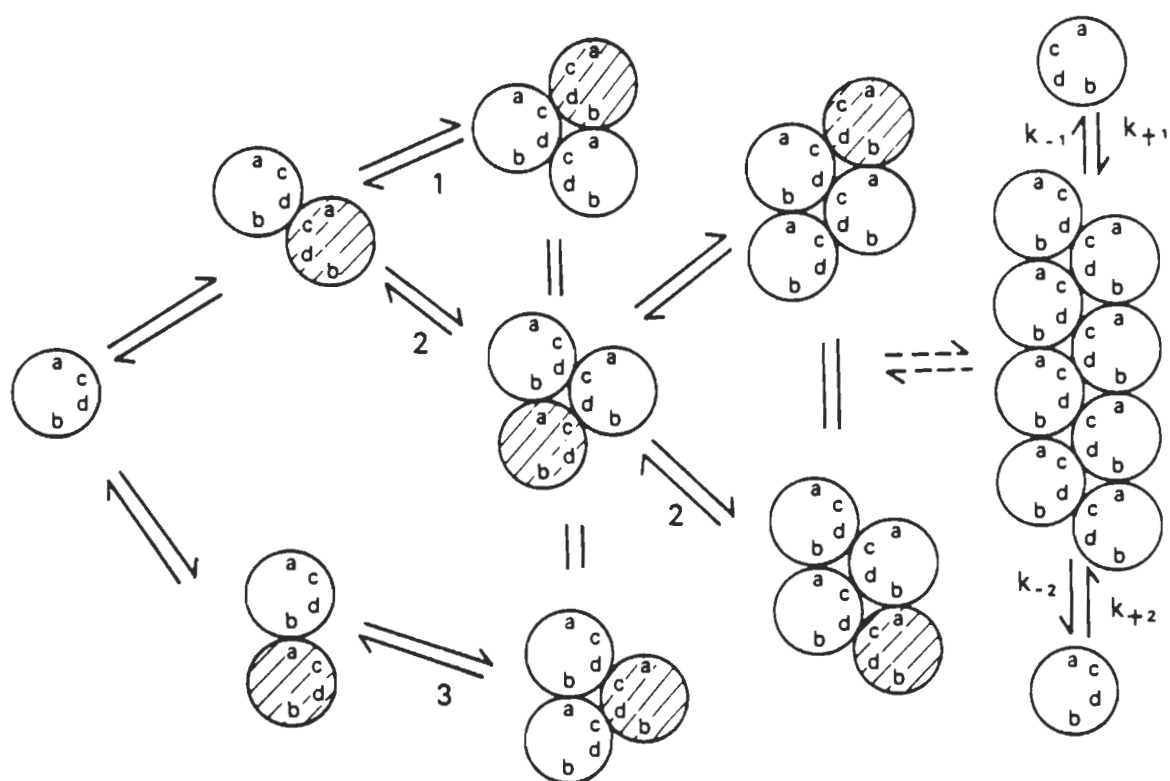


Figure 3: Schéma de la polymérisation de l'actine. Selon Wegner et Engel, 1975 et Oosawa et Kasai, 1971.

Dans les cellules, les conditions nécessaires à la polymérisation de l'actine sont réunies: concentration de monomères élevée (150 à 900 μM) (8, 78), présence de cations divalents tel que le Mg^{2+} dont la concentration se situe entre 1 et 7 mM ainsi que le K^+ entre 90 et 150 mM. Cependant, dans une cellule, plus de 50% de l'actine est sous forme monomérique, et ce, malgré le fait que les conditions cellulaires favorisent sa polymérisation (7, 9). Des facteurs limitent donc la polymérisation de l'actine *in vivo*. Ces facteurs sont des protéines qui se lient soit à l'actine-G soit à l'actine-F et qui contrôlent la polymérisation. Citons par exemple la profiline, la β -thymosine qui se lient au monomère et l'empêchent de polymériser (57, 59, 81). La gelsoline, la fimbrine, la vinculine et la villine réagissent avec l'actine-F et limitent la longueur du filament (87, 112). On nomme ces protéines les ABP (*actin-binding-protein*). Cette liste n'est pas limitative. Il en existe beaucoup d'autres (57).

1.2 L'actine et l'ATP

1.2.1 L'hydrolyse de l'ATP par l'actine.

Comme nous l'avons vu, le monomère d'actine contient une molécule d'ATP. Après la polymérisation, cet ATP est hydrolysé. Lors du *treadmilling*, il y a addition de monomères d'actine-ATP au bout positif du filament et élimination des monomères d'actine-ADP au bout négatif du filament. L'actine est donc une ATPase.

L'hydrolyse de l'ATP n'est cependant pas nécessaire à la polymérisation de l'actine puisque l'on peut faire polymériser des monomères d'actine qui ont un ADP à la place d'un ATP (24, 36, 60). Même sans nucléotide, dans des conditions particulières comme de fortes concentrations de sucrose, l'actine peut aussi polymériser (52). Par contre, la polymérisation est plus rapide si l'ATP est présent dans le milieu (36). Quel est le rôle de l'hydrolyse de l'ATP au cours de la polymérisation?

M.-F. Carlier *et al* (12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 21) ont mis en évidence que l'hydrolyse de l'ATP contenu dans le monomère ne se fait pas lors de l'addition du monomère à l'extrémité du filament mais un certain temps après. De plus, cette hydrolyse se fait en deux étapes (voir figure 4):

1) Il y a tout d'abord clivage de l'ATP situé dans le monomère.

On obtient donc un monomère d'actine ADP*Pi. Cette étape est irréversible.

2) Puis libération du phosphate inorganique dans le

milieu. Cette étape est plus lente et elle est réversible.

C'est la libération du phosphate inorganique qui libère l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP (15, 18, 19).

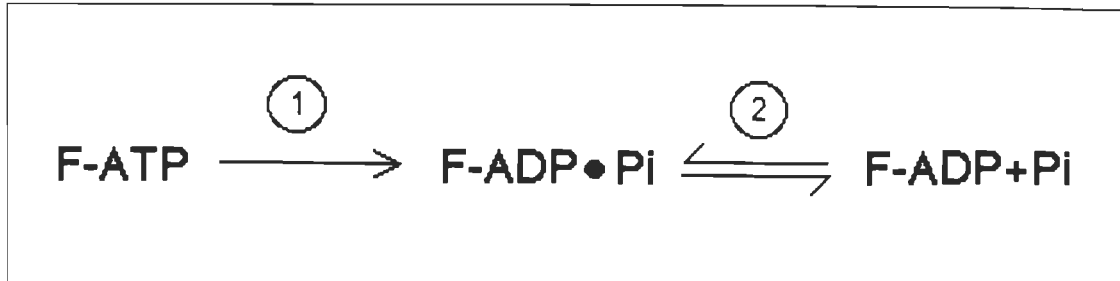


Figure 4: Schéma de l'hydrolyse de l'ATP par l'actine-F selon Carlier, 1992.

Au cours de la polymérisation, le filament voit donc sa composition en nucléotide se modifier. Ainsi, pendant l'élongation, chaque extrémité du filament est composé de monomères qui contiennent un ATP et la partie centrale se compose de monomères ADP*Pi et de monomères ADP (12, 17, 18, 101). On dit que l'actine est *ATP-capped* (19, 20, 21, 58). Au cours du *treadmilling*, il y a, au bout positif, des monomères-ATP, suivis de monomères-ADP*Pi et le reste du filament est composé de monomères-ADP (75) (voir figure 5).

Selon M.-F. Carlier *et al* (13, 14, 17), la principale conséquence de l'hydrolyse de l'ATP est de diminuer l'interaction entre les monomères d'actine. Le fait qu'il y ait des monomères-ATP à chaque extrémité du filament au cours de l'élongation et à l'extrémité positive lors du *treadmilling* est donc un mécanisme de stabilisation des extrémités du filament qui, par conséquent favorise le phénomène de polymérisation.

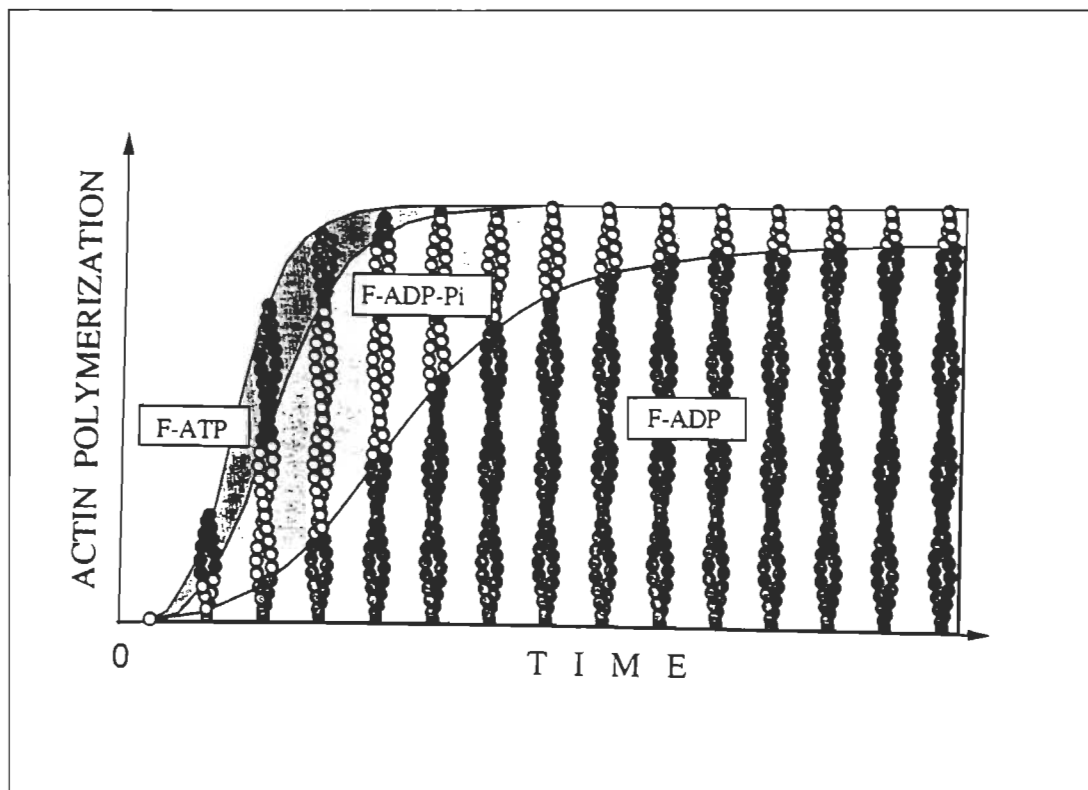


Figure 5: Proportion des différents intermédiaires de l'hydrolyse de l'ATP au cours de la polymérisation de l'actine. Tiré de: Carlier, 1991

1.2.2 Possibilité de l'existence d'un deuxième site de liaison pour l'ATP

Certains chercheurs, Hozumi (42, 43, 44) ainsi que Kiessling *et al* (53), ont envisagé la possibilité de l'existence d'un deuxième site de liaison des nucléotides sur le monomère d'actine. Ce second site aurait une faible affinité et une faible spécificité pour les nucléotides. Son affinité pour l'ADP serait plus grande que pour l'ATP (42, 43, 44, 53).

Hozumi (42, 43, 44) a publié trois articles concernant l'existence possible de ce deuxième site de liaison pour un nucléotide. Un premier article paru en 1988 (43) suggère l'existence d'un tel site car le monomère d'actine est plus réfractaire à la protéolyse en absence d'ATP libre. Il conclut donc à l'existence d'un deuxième site de liaison sur le monomère d'actine. Cependant, cette conclusion n'est valable que si le nucléotide lié au site de haute affinité ne quitte pas la protéine lorsqu'on enlève l'ATP libre du milieu par dialyse. Le changement de sensibilité de l'actine à la protéolyse, de même que les changements de conformation de la molécule d'actine observés indiquent que le nucléotide interagirait avec un autre site sur la molécule d'actine et que l'interaction entre le monomère d'actine et le nucléotide semble être de nature électrostatique.

Dans un deuxième article (42), Hozumi a comparé l'effet de différents nucléotides sur la protéolyse de l'actine-F. Ses résultats montrent que l'ADP ajouté à l'actine-F rend l'actine plus vulnérable à la protéolyse. L'effet des autres nucléotides varie comme suit: ADP>ATP>>IDP>GDP=UDP. L'AMP et le Pi n'ont

pas d'effet. Les résultats suggèrent donc que l'ADP interagit avec un nouveau site de liaison et que ce site n'est pas spécifique à l'ADP.

Un troisième article parut en 1990 (44) étudie les modifications des sites hydrophobes de l'actine-G et de l'actine-F en présence de nucléotides (ATP et ADP). Cette étude se base essentiellement sur les changements des spectres de fluorescence de l'actine marquée par l'ANS (sonde hydrophobe). Les résultats montrent que l'actine-G marquée, en présence d'ATP et d'ADP, voit son intensité de fluorescence diminuer et son émission maximale se déplacer vers les plus hautes longueurs d'ondes. L'actine-F donne les mêmes résultats. Ces résultats montrent que les sites hydrophobes de l'actine-G et F sont modifiés par la présence des nucléotides. Ces modifications dépendent de la concentration du nucléotide dans le milieu. Les résultats suggèrent que les nucléotides se lient à un second site sur l'actine-G et F et que cette liaison induit un changement de conformation de la molécule d'actine.

Kiessling *et al* (53) ont étudié la spécificité et l'affinité de ce second site pour les nucléotides sur l'actine-G et F. Cette étude a été faite par chromatographie d'affinité sur agarose-ADP. Les résultats montrent que la capacité des nucléotides à briser le lien actine-agarose dépend de leur degré de phosphorylation. L'ATP, le NADH et le pyrophosphate de sodium sont plus efficaces que l'ADP. Ils ont aussi rapporté que le CTP et l'ITP sont plus efficaces que l'ATP. Les auteurs concluent que la liaison de l'actine à l'agarose-ADP se

fait par un site différent du site de haute affinité et que ce site n'est pas spécifique à l'ADP et se lierait à de nombreux polyanions.

1.2.3 Stabilisation de l'actine par l'ATP

Certains auteurs (25, 46, 47, 48) ont déjà mentionné que l'ATP pouvait stabiliser le monomère et le filament d'actine contre des agents dénaturants.

Ikeuchi et ses collaborateurs ont publié trois articles concernant l'effet de l'ATP sur la stabilité de l'actine. Le premier article parut en 1981 (46) a pour but d'étudier l'effet de la température et de la concentration d'ATP sur les propriétés de l'actine-F. Les techniques utilisées pour mesurer la stabilité de l'actine sont la turbidimétrie et la viscosimétrie, de même que la capacité de l'actine-F d'activer l'activité ATPasique de l'HMM (Heavy Mero Myosin). Les résultats montrent que l'ATP prévient la dénaturation thermique de l'actine-F. Les auteurs concluent donc que l'ATP augmente la température de dénaturation thermique de l'actine-F.

En 1990 parut un deuxième article (48) qui concerne plus spécifiquement la dénaturation thermique de l'actine-G en présence d'ATP. Les auteurs ont estimé la dénaturation de l'actine-G en mesurant la polymérisation, l'hydrolyse de l'ATP et la capacité de l'actine d'activer l'activité ATPasique de l'HMM. Ils ont constaté que la viscosité de l'actine-G augmente avec la température et ce, en présence d'ATP. De plus, l'hydrolyse de l'ATP par l'actine-G augmente en fonction de la température jusqu'à environ 55°C puis diminue graduellement. Les résultats

suggèrent que la conversion de l'actine-G en actine-F, induite par la chaleur, est due à un changement énergétique de l'actine-G et que cette conversion est incomplète si on la compare à la polymérisation habituelle induite par l'addition de sels neutres.

Un troisième article parut en 1992 (47) concerne l'effet du pH et de la concentration de KCl sur la stabilité de l'actine-F en absence d'ATP et à 0°C. La dénaturation de l'actine-F a été évaluée en mesurant l'activité ATPasique de l'HMM. Les résultats montrent que la dénaturation de l'actine-F augmente lorsque le pH diminue. L'actine-F traitée par 0.5 M de KCl à pH 5.2 se dénature encore plus rapidement car il y a une combinaison des effets des bas pH et des hautes concentrations de sels. Les auteurs concluent que les hautes concentrations de sels pourraient stimuler à la fois la dépolymérisation de l'actine-F, la relâche du nucléotide et du cation divalent. La présence d'ATP retarderait la réaction de dénaturation.

Dancker (25) a étudié l'effet d'agents dénaturants sur la stabilité de l'actine-F en présence d'ATP ou de phosphate inorganique (Pi). Cette étude se base sur l'observation des changements de viscosité et de fluorescence de l'actine-F marquée par le pyrène. Les résultats montrent que la vitesse de dénaturation de l'actine-F est plus lente en présence d'ATP ou de Pi. De même, lorsque l'actine-F est soumise à des agents dénaturants tels que le SDS ou le KI, la baisse de viscosité de la solution d'actine-F est moins rapide en présence d'ATP ou de Pi. Dancker conclut donc que l'ATP et le Pi stabilisent l'actine-F contre les effets dénaturants du KI et du SDS.

1.3 Problématique et objectif du travail

Les travaux précédents (25, 46, 47, 48) ont montré que l'ATP peut stabiliser l'actine-G et l'actine-F contre la dénaturation thermique et contre la dénaturation par des agents chaotiques (SDS et KI). Cependant Dancker (25) ainsi que Ikeuchi (46, 47, 48) n'ont jamais étudié le phénomène en détail. Ikeuchi *et al* (46, 47, 48) n'ont étudié la dénaturation de l'actine-G et F qu'en présence d'ATP sans chercher à savoir si d'autres nucléotides ont le même effet. De même, Dancker (25), quoi qu'il ait utilisé du Pi en plus de l'ATP, n'a pas étudié la spécificité du nucléotide. Le mécanisme d'action de l'ATP et du Pi dans le phénomène de la stabilisation de l'actine-F et G reste donc encore mal compris.

Le but de notre travail est de mieux caractériser l'effet de l'ATP sur la stabilité de la molécule d'actine. Cette stabilité sera évaluée en mesurant la résistance de l'actine à la dénaturation thermique et aux hautes pressions.

Dans une première partie, nous allons évaluer l'effet de l'ATP sur les caractéristiques thermodynamiques de la dénaturation thermique de l'actine (température de dénaturation, enthalpie calorimétrique et pression de dénaturation).

Dans une deuxième partie, nous allons vérifier si le phénomène est spécifique à l'ATP, s'il se produit avec d'autres nucléotides et quelles sont les parties de la molécule d'ATP qui sont impliquées dans l'interaction avec l'actine.

Enfin, dans une troisième partie, nous allons vérifier si cette stabilisation produit un changement de conformation de la protéine.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Liste des produits chimiques

Les produits suivants proviennent de chez Sigma Chemical co. Missouri.

adénosine 5'-triphosphate (ATP),
adénosine 5'-diphosphate (ADP),
adénosine 5'-monophosphate (AMP),
adénosine 3':5'-cyclic monophosphate (AMPC),
5'-adénylylimidodiphosphate (AMPPNP),
N 6-éthénoadénosine 5'-triphosphate (ϵ -ATP),
uridine 5'-triphosphate (UTP),
cystidine 5'-triphosphate (CTP),
guanosine 5'-triphosphate (GTP)
adénosine,
phosphate de sodium (NaH_2PO_4)

Les produits suivants proviennent de chez Oméga Inc. Québec.

fluorure de sodium (NaF)
nitrate d'aluminium ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3$)
sulfate de béryllium tétrahydrate ($\text{BeSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)

2.2 Préparation de l'actine

L'actine du muscle strié de lapin a été préparée à partir de la poudre acétonique selon la méthode de Pardee et Spudich (76) de la façon suivante:

- Deux à trois grammes de poudre acétonique sont mis dans un bécher contenant 175 ml de tampon-G (Tris-HCl 2 mM pH 8.0, ATP 0,2 mM, CaCl_2 0,3 mM, β -mercaptoéthanol 0,5 mM, Azide de sodium 0,02%). Le tout est agité à 0°C pendant 45 minutes. Cette étape solubilise l'actine-G.
- La solution est filtrée et le filtrat est centrifugé pendant une heure à 40 000 rpm (Beckman L8-70M rotor 70 Ti) à 4°C. Cette étape permet d'éliminer les protéines dénaturées et les résidus de poudre acétonique.
- L'actine-G est polymérisée par ajout de 2 mM de MgCl_2 et 100 mM de KCl (concentration finale) pendant une nuit à 4°C.
- La solution d'actine-F est ensuite centrifugée pendant deux heures à 40 000 rpm (Beckman L8-70M, rotor 70 Ti) à 4°C. Cette étape permet de séparer l'actine-F, qui se retrouve dans le culot, des autres protéines solubles.
- Le culot d'actine-F est récupéré et homogénéisé dans du tampon-G, puis mis en dialyse contre le tampon-G durant deux jours. Cette étape permet de dépolymériser l'actine.

- Après dialyse, la solution est centrifugée pendant deux heures à 40 000 rpm (Beckman L8-70M, rotor 70 Ti) à 4°C. Cette étape permet d'éliminer les protéines dénaturées et l'actine non dépolymérisée, l'actine-G se retrouve dans le surnageant.

- L'actine est conservée sous forme globulaire dans le tampon-G à 0°C pendant un maximum de une semaine.

- L'actine est dosée par mesure de l'absorbance à 290 nm. Le coefficient d'extinction molaire pour l'actine monomérique est $A_{1cm}^{(1\%)} = 6,3$.

2.3 Préparation des nucléotides

Tous les nucléotides ont été dissous dans l'eau et le pH a été ajusté à 7,0. La concentration des solutions stock d'ATP et d'ADP est de 50 mM tandis que la concentration des solutions stock des autres nucléotides est de 10 mM. Ces solutions sont conservées au congélateur, jusqu'à leur utilisation.

2.4 Préparation du fluorure d'aluminium et du fluorure de béryllium.

Du nitrate d'aluminium, à une concentration finale de 2 mM, est dissous dans l'eau puis on ajoute du fluorure de sodium dont la concentration finale est de

100 mM. Le fluorure de béryllium se prépare de la même manière que le fluorure d'aluminium. L'aluminium et le béryllium forment, en présence d'ions fluor, une série de complexes $Al_n^{(n-3)-}$ et $Be_n^{(n-2)-}$. Aux concentrations utilisées, ce sont les complexes Al_4^- et Be_3^- qui prédominent (6).

2.5 Techniques de mesure de la stabilité thermique de l'actine-F

2.5.1 Mesure de la dénaturation de l'actine-F par turbidimétrie

a) Introduction

L'actine-F, lorsqu'elle se dénature, forme des agrégats. La solution d'actine-F devient alors turbide. Pour dénaturer l'actine-F, on la soumet à une température dénaturante, c'est-à-dire entre 65 et 70°C, selon l'expérience. Plus la solution d'actine est chauffée longtemps plus cette solution devient turbide. Cette turbidité peut être quantifiée par mesure de l'absorbance à $\lambda = 400$ nm. En ajoutant des nucléotides à la solution d'actine-F, nous pouvons étudier leur effet sur la vitesse de dénaturation de la protéine.

b) Protocole expérimental

- 25 ml d'actine-G sont polymérisés par ajout de 2 mM de $MgCl_2$ et de 100 mM de KCl (concentration finale). La polymérisation dure 45 minutes à température ambiante.

- L'ATP est ajouté après 25 minutes de polymérisation tout en tenant compte que le volume final de la solution d'actine-F doit être de 25 ml et sa concentration de 0,25 mg/ml. Il faut noter que l'ATP ajouté est de l'ATP supplémentaire. Le tampon-G contient déjà 0.2 mM d'ATP.

- Après polymérisation, la solution d'actine-F est distribuée dans deux séries de douze tubes que l'on scelle pour prévenir l'évaporation.

- On immerge les tubes dans un bain thermostaté à 70°C. Ils sont ensuite retirés deux par deux à des temps prédéterminés. Les tubes, une fois retirés du bain, sont immédiatement mis sur la glace pour arrêter la réaction de dénaturation. Nous pouvons suivre ainsi la dénaturation de l'actine en fonction du temps.

- Pour la mesure de la DO, les solutions d'actine sont ramenées à température ambiante et doivent être agitées afin de resuspendre les gros agrégats d'actine et obtenir une solution homogène. La lecture se fait à 400 nm.

2.5.2 Mesure de la dénaturation de l'actine-F par fluorimétrie

a) Introduction

Lorsqu'on met l'actine-F à température dénaturante elle forme des agrégats. L'actine dénaturée peut être éliminée par centrifugation. Cependant, pour ne pas éliminer, au cours de cette centrifugation, l'actine-F non-dénaturée,

on doit d'abord la dépolymériser. Pour ce faire, on dilue l'actine avec du tampon-G de façon à obtenir des concentrations ioniques qui dépolymérisent l'actine. Dans le tampon-G, l'actine est stable et reste à l'état de monomère. On se retrouve donc avec un mélange d'actine-G non-dénaturée et d'actine dénaturée. L'actine dénaturée est éliminée par centrifugation.

La quantité d'actine non-dénaturée qui se trouve dans le surnageant est dosée par fluorimétrie. L'actine non-dénaturée possède un spectre de fluorescence caractéristique dont le maximum d'émission est à 325 nm (voir figure 6). On peut remarquer sur cette figure qu'à la longueur d'onde utilisée l'actine-G dénaturée fluoresce de manière non négligeable. C'est pourquoi il faut absolument éliminer l'actine dénaturée de notre solution.

b) Protocole expérimental

Cette partie du travail a été faite selon le protocole établi par Le Bihan (61).

- De l'actine-G est polymérisée par ajout de 2 mM de $MgCl_2$ et de 100 mM de KCl (concentration finale). La polymérisation se fait pendant 45 minutes.

- Au besoin, de l'ATP à concentration désirée est ajouté après 25 minutes de polymérisation. Le volume final de la solution d'actine doit être de 40 ml et sa concentration de 0,29 mg/ml. Il faut souligner que l'ATP ajouté est de l'ATP supplémentaire. Le tampon-G contient déjà 0.2 mM d'ATP.

- Après polymérisation, on distribue l'actine-F dans trois séries de douze tubes que l'on scelle pour prévenir l'évaporation.

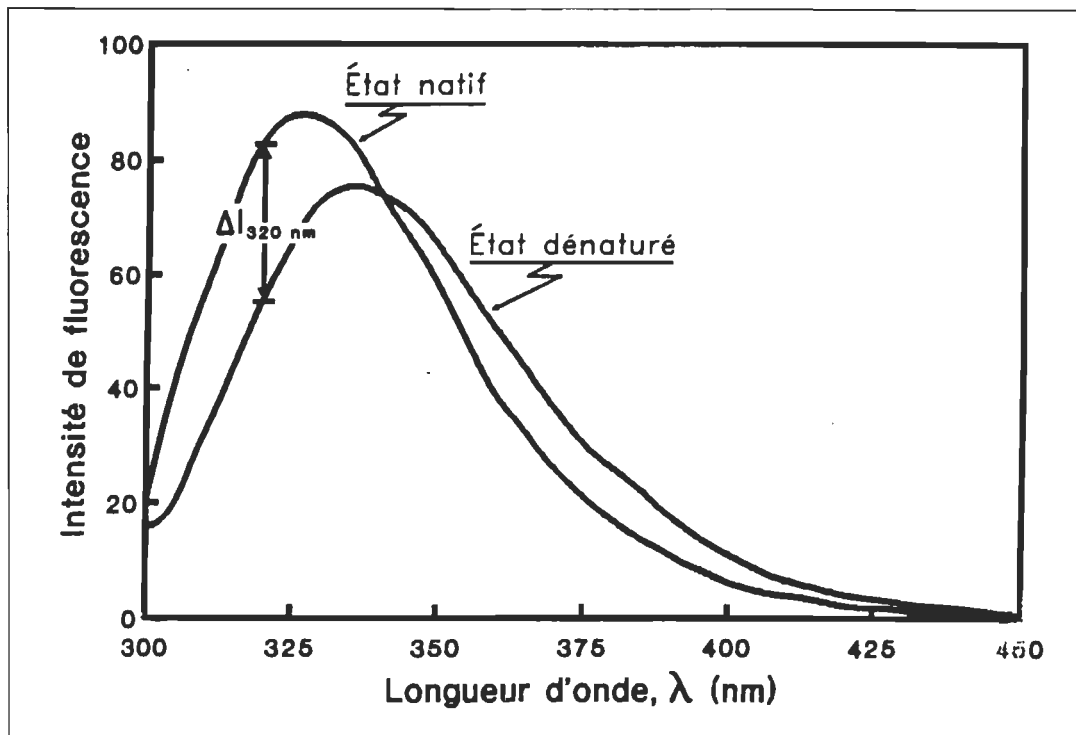


Figure 6: Spectres de fluorescence de l'actine-G à l'état natif et à l'état dénaturé. $\Delta I_{320 \text{ nm}}$ est la différence d'intensité entre les deux états de l'actine-G pour une longueur d'onde de 320 nm.

- Les tubes sont ensuite immergés dans un bain thermostaté à la température de dénaturation de 65°C. On retire les tubes trois par trois à des temps prédéterminés.

- La réaction de dénaturation est arrêtée en plongeant les tubes d'actine-F dans de la glace.

- L'actine est dépolymérisée une nuit à 0°C. La dépolymérisation est obtenue en prélevant 0.15 ml de solution d'actine de chaque tube, que l'on dilue dans 2.55 ml de tampon-G.

- La solution d'actine est centrifugée pendant une heure à 40 000 rpm (Beckman L8-70M rotor 70.1 Ti) pour séparer les agrégats d'actine dénaturée de l'actine-G non-dénaturée.

- L'intensité de fluorescence de l'actine non-dénaturée est mesurée à 325 nm pour une excitation à 294 nm (voir figure 6). La présence d'une forte concentration d'ATP n'interfère pas dans le spectre de fluorescence de l'actine-G.

2.5.3 Mesure de la dénaturation de l'actine par calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

a) Description de l'appareil

L'appareil que nous avons utilisé est un DSC à conduction de chaleur (Hart Scientific). Cet appareil comprend trois cellules échantillons et une cellule de référence. Les cellules échantillons et de référence sont insérées à l'intérieur d'un bloc de métal qui sert de puits thermique (voir figure 7). Des senseurs situés entre le puits thermique et les cellules captent les flux de chaleurs entre le bloc et l'échantillon et entre le bloc et la référence.

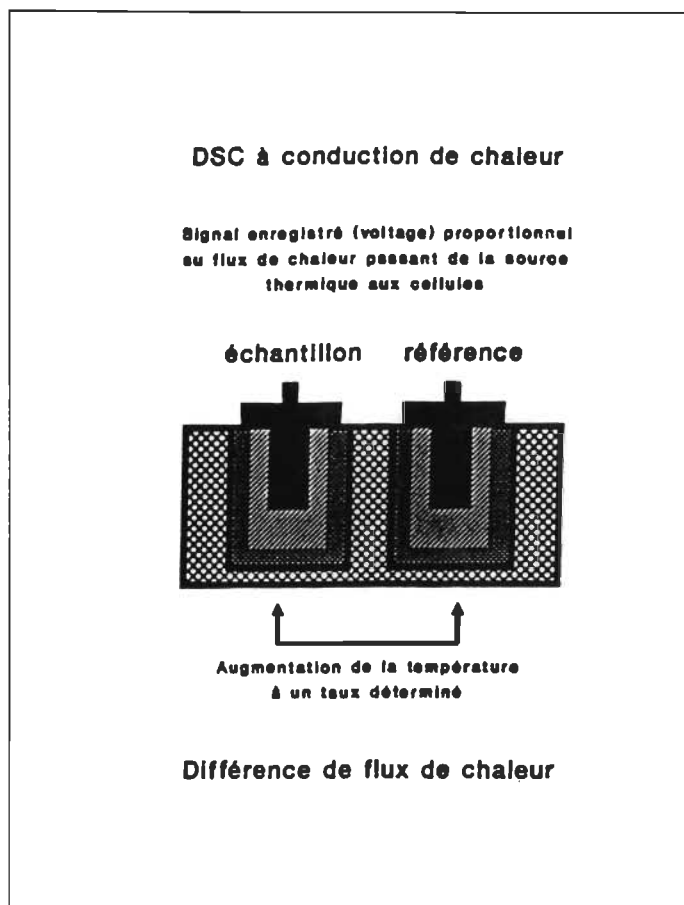


Figure 7: Représentation schématique du DSC.

b) Principe de l'appareil

Le calorimètre chauffe l'échantillon et la référence à une vitesse constante tout en maintenant la température de l'échantillon égale à la température de la référence. Si à une température donnée, il se produit une réaction dans la cellule échantillon, il peut y avoir absorption ou émission de chaleur. L'appareil peut

détecter cette quantité de chaleur en comparant les flux de chaleur entre le bloc de métal et l'échantillon et entre le bloc de métal et la référence. Les résultats nous sont donnés sous forme de thermogramme (voir figure 8).

On peut déduire du thermogramme (voir figure 8): la température de transition thermique de la réaction, son enthalpie calorimétrique et la coopérativité de la réaction. La température de transition d'une réaction est la température au maximum de la courbe. Elle correspond à la température à laquelle la moitié des molécules ont réagi ou plus particulièrement à notre étude, où la moitié des protéines sont dénaturées. Cette donnée nous sera utile tout le long de cette étude car elle nous permettra de connaître la température de dénaturation de l'actine-F. L'enthalpie calorimétrique se calcule en mesurant l'aire totale sous la courbe et représente l'énergie nécessaire à la réaction. Le programme fourni par la compagnie Hart Scientific permet de calculer l'enthalpie calorimétrique d'une réaction. Pour ce faire, il suffit de fournir à l'appareil les températures initiale (T_i) et finale (T_f) de la réaction (voir figure 8) de même que la quantité de protéine dans l'échantillon. L'ordinateur trace une ligne droite entre la température initiale et finale et calcule l'aire sous la courbe. Il divise cette donnée par la quantité de protéine, ce qui donne l'enthalpie calorimétrique par mole de la réaction. Le thermogramme permet aussi de déterminer la coopérativité de la réaction. La coopérativité correspond à la quantité de molécules qui réagissent en même temps. Sur le thermogramme, plus la coopérativité est grande, plus la quantité de molécules qui ont réagi en même temps est grande, plus le pic de la réaction est étroit. Inversement, plus la coopérativité est faible, plus le pic de la réaction est large. Mais ce phénomène n'est valide que pour les réactions réversibles et ne

s'applique pas nécessairement à notre système. Il en sera discuté plus longuement dans la dernière partie de ce travail.

En ajoutant différents nucléotides à la solution d'actine-F, nous pouvons étudier l'effet des nucléotides sur la transition thermique de l'actine.

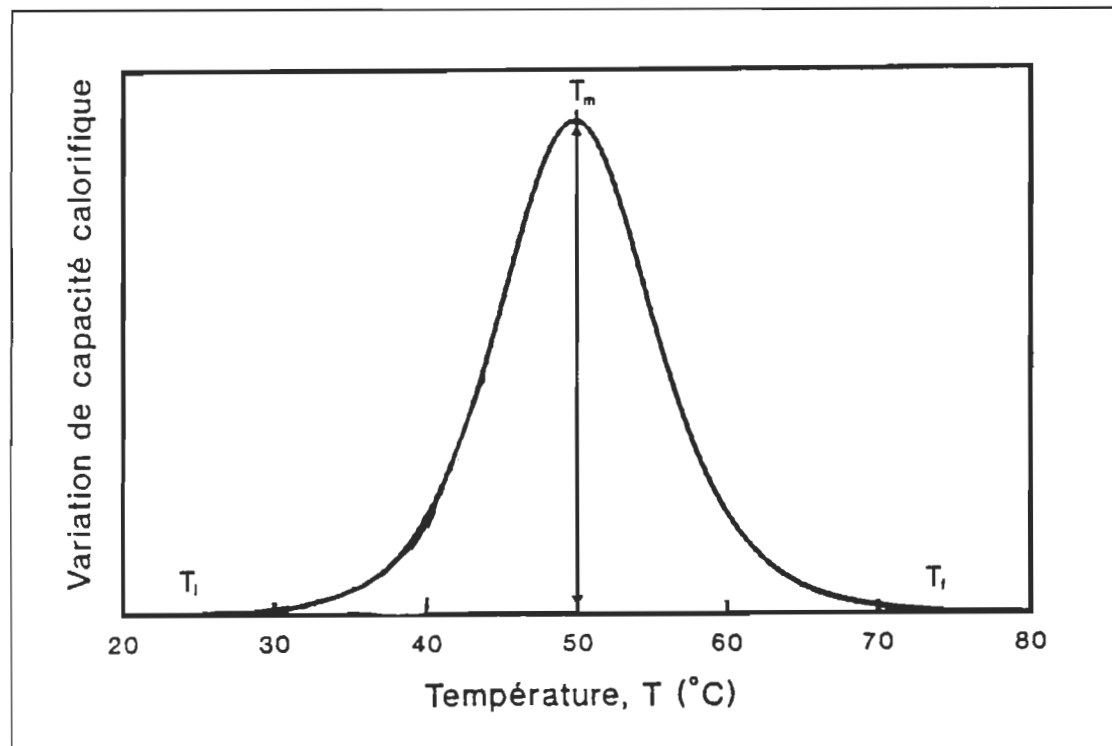


Figure 8: Thermogramme idéal d'une réaction endothermique réversible.

c) Préparation des échantillons pour le DSC

- Un millilitre d'actine à 3 mg/ml est polymérisée par ajout de 2 mM de MgCl_2 et de 100 mM de KCl (concentration finale). On laisse polymériser l'actine pendant 45 minutes à température ambiante.

- Les nucléotides, à concentrations désirées, sont ajoutés à l'actine après 25 minutes de polymérisation, et on laisse reposer à température ambiante pour terminer la polymérisation. La concentration des nucléotides varie entre 0 et 15 mM selon l'expérience. Il est à souligner que les nucléotides sont ajoutés au tampon-G qui contient déjà 0.2 mM d'ATP.

- Une fois la polymérisation de l'actine terminée, 0.900 ± 0.001 grammes de solution d'actine sont mis dans une cellule du calorimètre.

- Dans tous les cas, la vitesse de chauffe de l'appareil est de 40°C à l'heure.

- Pour chaque échantillon, la ligne de base est obtenue avec le tampon correspondant et soustrait à l'aide d'un programme fourni par Hart Scientific.

- Tous les thermogrammes obtenus ont été corrigés en température pour compenser le temps de réponse de l'appareil avec le programme fourni par Hart Scientific.

2.5.4 Mesure de la dénaturation de l'actine-F par FTIR

a) Introduction

Toutes les protéines sont des polymères d'acides aminés. Selon l'ordre et la nature des acides aminés, la protéine va se replier pour former différentes structures que l'on nomme structures secondaires. Il existe trois types de structures secondaires: les feuillets- β , les hélices- α et les structures désordonnées appelées aussi pelotes statistiques. Chacune de ces structures secondaires ont des vibrations dont la fréquence est caractéristique pour chaque type de structure secondaire. Le FTIR permet d'analyser ces fréquences. Cette technique donne la contribution relative des hélices- α , des feuillets- β et des structures désordonnées dans les protéines (77, 93, 109). On peut mettre en évidence les changements de la structure secondaire d'une protéine lorsqu'elle interagit avec un ligand ou lorsqu'elle est soumise à des conditions dénaturantes.

Le FTIR à haute pression permet de suivre les changements de conformation de l'actine lorsqu'on la dénature en augmentant la pression. Le FTIR à température variable permet de suivre les changements de conformation de l'actine lorsqu'on la dénature par augmentation de température.

b) Préparation des échantillons pour l'étude, par FTIR, de la dénaturation de l'actine-F par les hautes pressions.

- 10 ml d'actine-G à concentration de 3 mg/ml sont polymérisés par ajout de 2 mM de MgCl_2 et de 100 mM de KCl (concentration finale). La polymérisation se fait pendant 45 minutes.

- On centrifuge la solution d'actine-F à 50 000 rpm (Beckman Rotor 70.1 Ti) pendant une heure.

- Le culot d'actine-F est lavé deux fois avec du tampon-F préparé avec du D_2O afin d'éliminer la bande d'absorption de l'eau qui interfère avec la bande amide I.

- Le tampon-F D_2O contient:

Tris-HCl, 2 mM pH 8

ATP, 0.2 mM

CaCl_2 , 0.2 mM

MgCl_2 , 2 mM

KCl, 100 mM

Azide de sodium, 0.01 %

β - mercaptoéthanol, 0.5 mM

- Les préparations d'actine qui contiennent de l'ATP sont préparées de la même manière. Après 25 minutes de polymérisation, de l'ATP est ajouté pour

obtenir une concentration finale de 3 mM. Les solutions de lavage contiennent aussi une concentration de 3 mM d'ATP. **Il est à souligner que l'ATP ajouté est de l'ATP supplémentaire. Le tampon-G contient déjà 0.2 mM d'ATP.**

- Le culot d'actine-F est placé dans une cellule en acier inoxydable de 0.23 mm de diamètre, puis comprimé dans une enclume en diamant. La pression interne de la cellule est mesurée en suivant le déplacement de fréquence de la bande du quartz- α à 695 cm^{-1} (110).

Les spectres infrarouges sont collectés avec un spectrophotomètre à transformée de Fourier Modèle Michelson 110 équipé d'un détecteur au mercure-cadmium-tellure refroidi à l'azote liquide.

La déconvolution des spectres est faite à l'aide de programmes développés par P. Wong à Ottawa (62).

c) Préparation des échantillons pour l'étude, par FTIR, de la dénaturation thermique de l'actine-F

- 10 ml d'actine-G à une concentration de 3 mg/ml sont polymérisés par ajout de 2 mM de MgCl_2 et de 100 mM de KCl (concentration finale). La polymérisation se fait pendant 45 minutes à température ambiante.

- L'actine-F est centrifugée pendant une heure à 45 000 rpm (Beckman Rotor 70.1 Ti).

- Les préparations qui contiennent de l'ATP sont faites de la même façon, mais de l'ATP est rajouté après 25 minutes de polymérisation. Noter bien que l'ATP ajouté est de l'ATP supplémentaire. Le tampon-G contient déjà 0.2 mM d'ATP.

- Les spectres infrarouges ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier Bomen DA3-02. L'analyse des spectres a été faite selon la méthode Dousseau et Pézolet (27).

2.6 Analyse statistique

Les thermogrammes présentés au cours de ce travail correspondent aux résultats d'une seule expérience. Les résultats présentés dans le texte représentent la moyenne des résultats de plusieurs expériences. C'est pourquoi il peut y avoir des différences entre les températures de dénaturation présentées sur le thermogramme et celles indiquées dans le texte.

Sur la majorité des graphiques et des histogrammes présentés, nous retrouvons des barres d'erreurs. Ces barres d'erreurs représentent l'écart-type calculé à l'aide du logiciel Criquet Graph de MacIntoch. Ces calculs se basent sur les résultats d'expériences variant entre trois et trente selon les expériences. À la fin de la section **RÉSULTATS** nous retrouvons un tableau complet des résultats

obtenus par DSC. Ce tableau comprend les concentrations, les écart-types, les températures de transition et les enthalpies calorimétriques obtenus pour chacun des nucléotides.

3. RÉSULTATS

3.1 Effet de l'ATP sur la stabilisation thermique de l'actine-F

3.1.1 Expériences préliminaires: effet de l'ATP sur la cinétique de dénaturation de l'actine-F.

a) Résultats obtenus par turbidimétrie

À l'aide d'une technique simple, la turbidimétrie, nous avons tout d'abord étudié l'effet de l'ATP sur la stabilisation de l'actine-F lorsqu'elle est soumise à des températures élevées.

La figure 9 permet de comparer la cinétique de dénaturation de l'actine-F pour une température de dénaturation de 70°C. Trois concentrations d'ATP ont été testées: 0 mM d'ATP, 3 et 5 mM d'ATP. Comme on peut le constater sur la figure 9, plus la concentration d'ATP est élevée plus la dénaturation de l'actine-F est lente. En absence d'ATP, on observe que l'actine se dénature très rapidement. La dénaturation est complète en 2.5 minutes. Avec 3 mM d'ATP, la dénaturation est déjà moins rapide et prend environ 7 minutes. En présence de 5 mM d'ATP, il n'y a pas de dénaturation de l'actine-F et ce, après 30 minutes à 70°C. Par conséquent, l'ATP stabilise l'actine-F contre la dénaturation thermique.

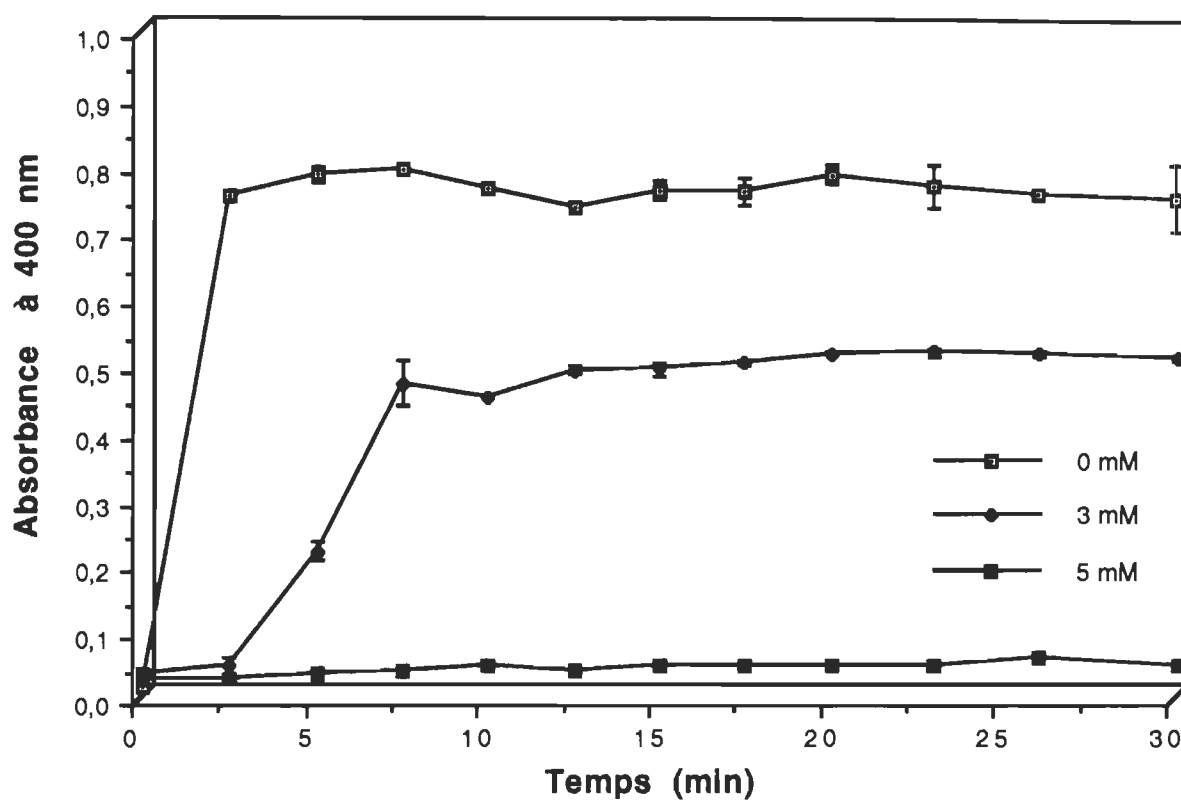


Figure 9: Courbes représentant la turbidité d'une solution d'actine en fonction du temps en présence de différentes concentrations d'ATP. La température de dénaturation est de 70°C, la concentration d'actine de 0.25 mg/ml. Les concentrations d'ATP supplémentaires utilisées sont: 0 mM (□), 3 mM (◆) et 5 mM (■).

b) Résultats obtenus par fluorimétrie

Nous avons aussi suivi la cinétique de la dénaturation de l'actine-F en présence et en absence d'ATP en mesurant la quantité d'actine non-dénaturée par fluorimétrie.

La figure 10 montre les cinétiques de dénaturation thermique de l'actine soumise à une température dénaturante de 65°C, en absence et en présence de plusieurs concentrations d'ATP. Comme on peut le constater, plus la concentration d'ATP est élevée, plus la dénaturation de l'actine est lente.

Le phénomène résumé à la figure 11, représente le temps de demi-vie de l'actine en présence des différentes concentrations d'ATP. Le calcul du temps de demi-vie est fait comme indiqué à la figure 12. On peut remarquer que le temps de demi-vie augmente linéairement avec la concentration d'ATP. En absence d'ATP, le temps de demi-vie est de 3.9 minutes. En présence de 1 mM d'ATP, le temps de demi-vie est deux fois plus grand soit 7.1 minutes, en présence de 3 mM d'ATP, il est de 45.7 minutes et pour 5 mM d'ATP, le temps de demi-vie est de 80.6 minutes.

Conclusion: La présence d'ATP stabilise l'actine-F contre la dénaturation thermique et cet effet augmente avec la concentration d'ATP.

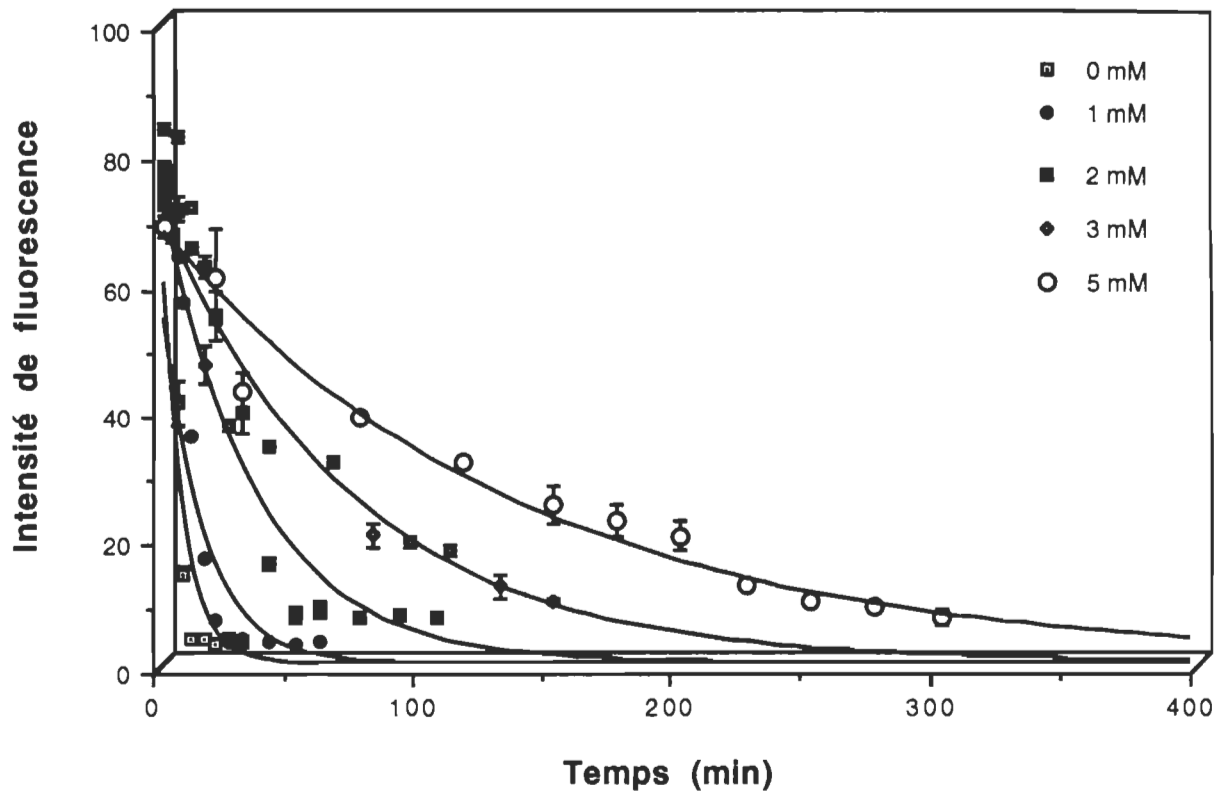


Figure 10: Effet de l'ATP sur la cinétique de dénaturation thermique de l'actine-F. La quantité d'actine non-dénaturée est mesurée par fluorescence. La température de dénaturation est de 65°C, La concentration de l'actine de 0.29 mg/ml. Les concentrations d'ATP supplémentaires utilisées sont: 0 mM (□), 1 mM (•), 2 mM (■), 3 mM (◊) et 5 mM (○).

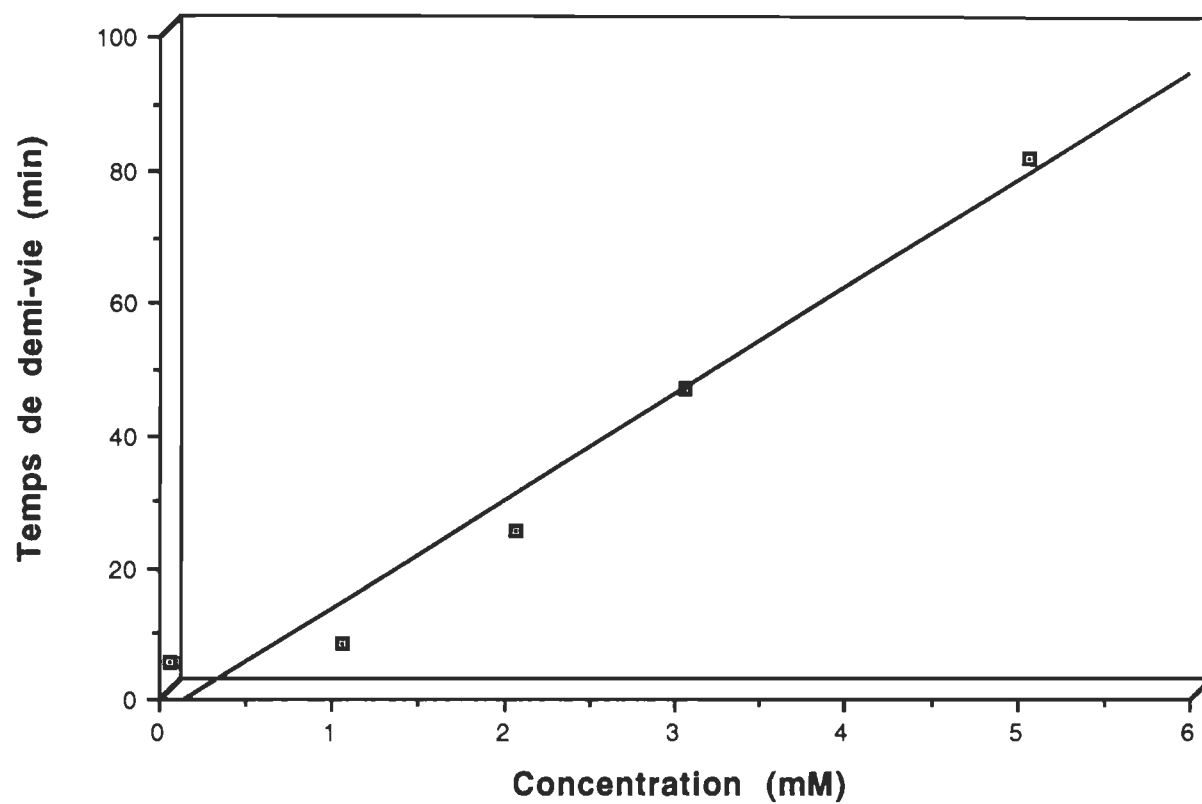


Figure 11: Effet de la concentration d'ATP sur le temps de demi-vie de l'actine.

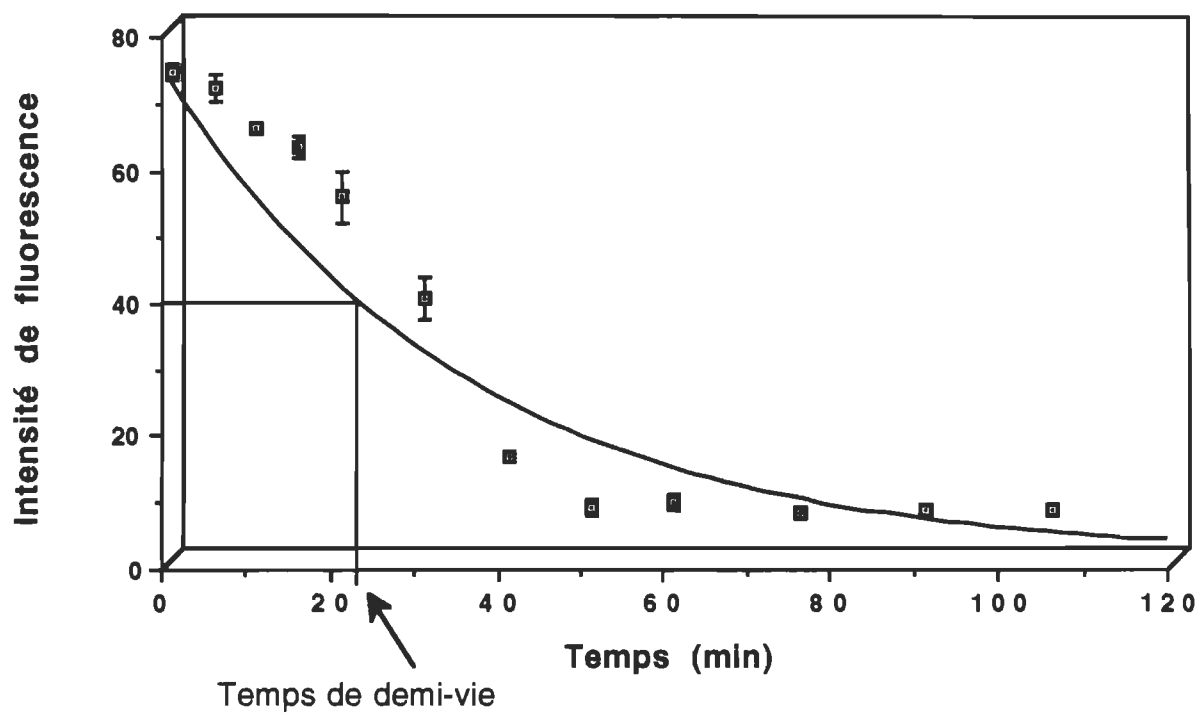


Figure 12: Exemple de calcul du temps de demi-vie.

3.1.2 Effet de l'ATP sur la transition de phase de l'actine-F obtenue par DSC

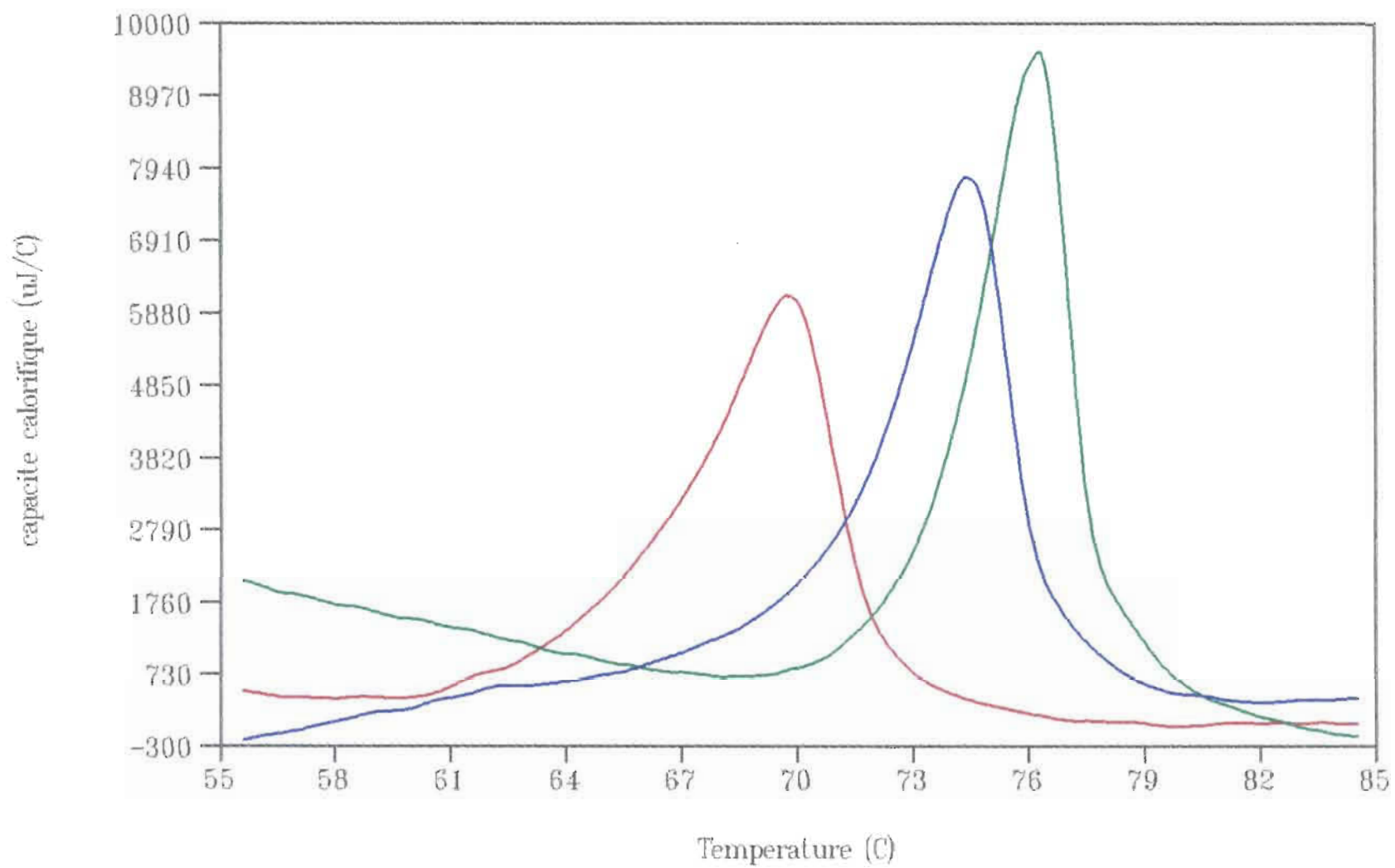
La figure 13 montre les thermogrammes de l'actine-F obtenus en présence de trois concentrations d'ATP: 0 mM, 2 mM et 5 mM. La température de transition passe de 69.6°C pour l'actine seule à 75.8°C pour l'actine en présence de 5 mM d'ATP.

On peut aussi remarquer que l'allure du pic est modifié en présence d'ATP et que cette modification est fonction de la concentration d'ATP. Le pic est plus étroit lorsque la concentration d'ATP augmente. On peut aussi remarquer que la hauteur du pic augmente avec la concentration d'ATP. L'actine-F se dénature donc différemment en présence d'ATP.

La figure 14 représente la température de transition de l'actine-F en fonction d'une concentration croissante d'ATP. On peut remarquer sur cette figure que la température de transition augmente avec la concentration d'ATP jusqu'à environ 3 mM, et que pour de plus fortes concentrations d'ATP, il y a un plateau.

La figure 15 représente l'enthalpie calorimétrique de l'actine-F en fonction d'une concentration croissante d'ATP. On peut remarquer que l'enthalpie calorimétrique de l'actine-F est plus grande en présence d'ATP. Elle passe de 163 kcal/mol pour l'actine seule à 237 kcal/mol pour l'actine-F en présence de 5 mM d'ATP.

Figure 13: (page suivante) Thermogrammes d'actine-F en présence de différentes concentrations d'ATP. La concentration d'actine est de 3 mg/ml. Les concentrations d'ATP utilisées sont: 0 mM (en rouge), 2 mM (en bleu) et 5 mM (en vert). Le taux de chauffe du DSC est de 40°C/h.



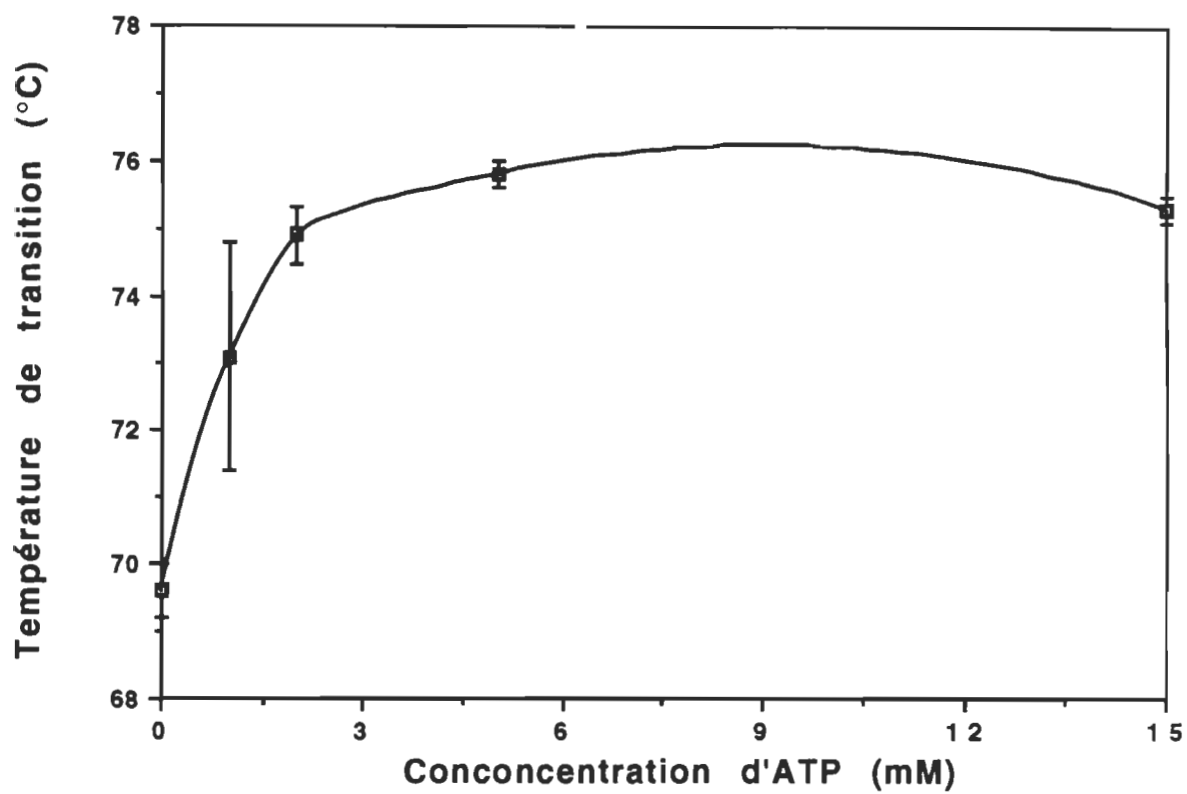


Figure 14: Effet d'une concentration croissante d'ATP sur la température de transition de l'actine-F. La concentration d'actine-F est de 3 mg/ml.

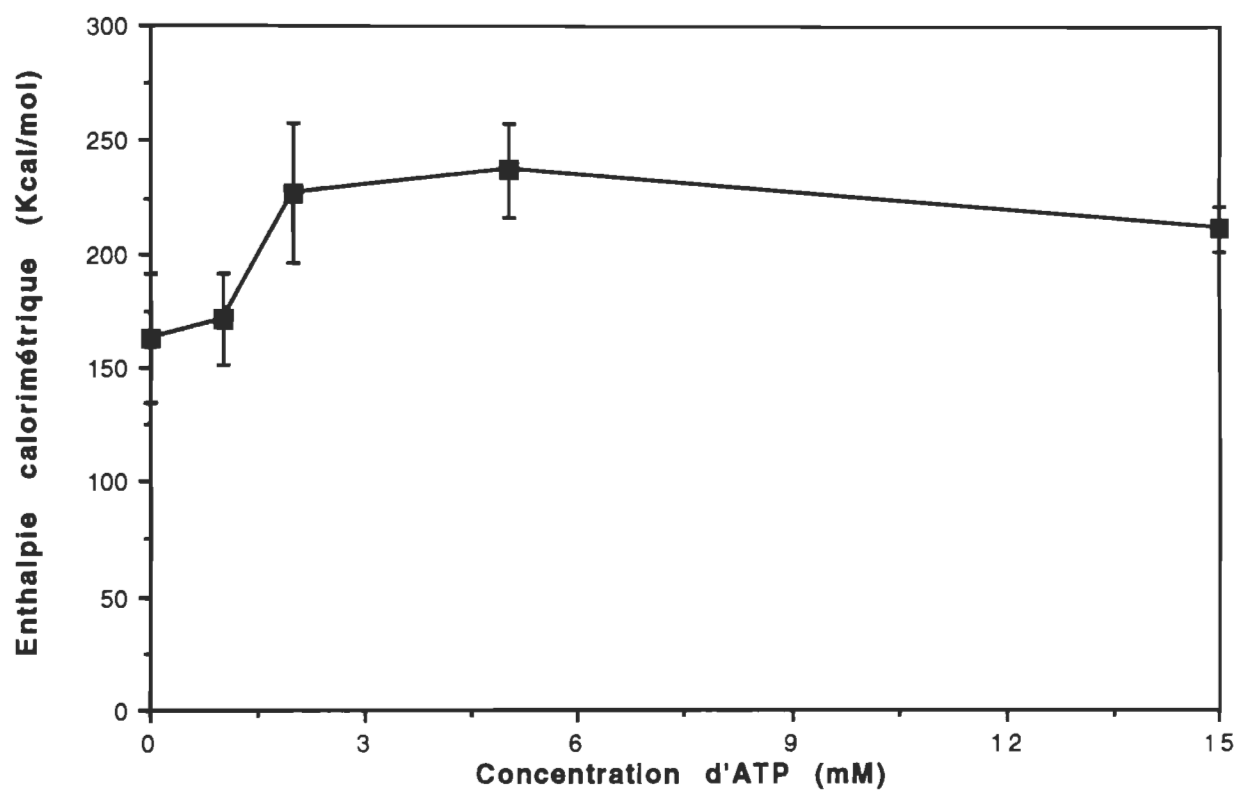


Figure 15: Effet d'une concentration croissante d'ATP sur l'enthalpie calorimétrique de l'actine-F.

La concentration d'actine est de 3 mg/ml.

Conclusion: L'ATP stabilise l'actine contre la dénaturation thermique. La température de dénaturation et l'enthalpie calorimétrique augmentent en présence d'ATP.

* * * * *

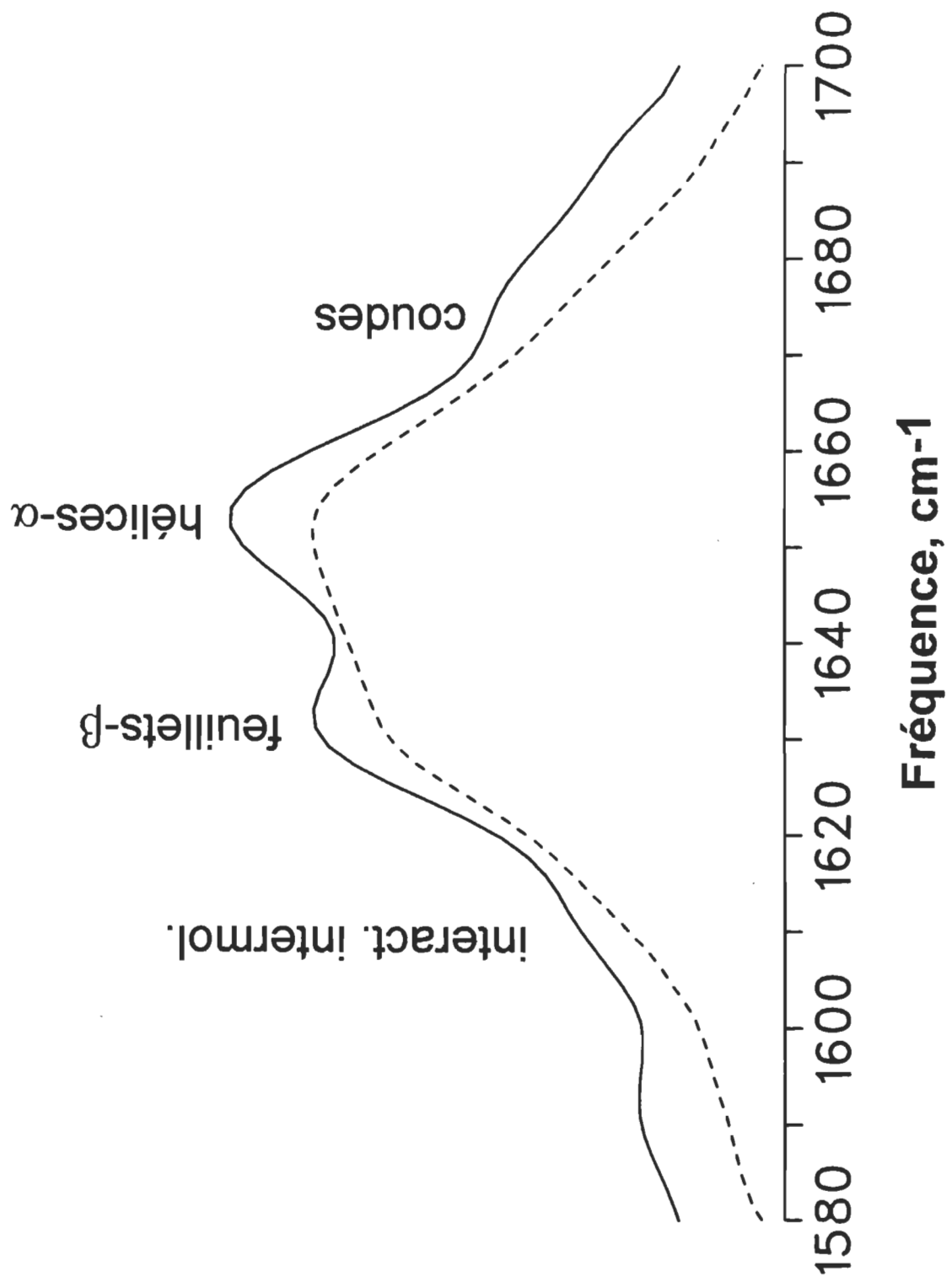
L'ATP provoque une stabilisation de l'actine. On peut se demander si l'augmentation de stabilité est accompagnée d'un changement de conformation de la protéine. Afin de déterminer si la structure secondaire de l'actine-F est modifiée en présence d'ATP, nous avons réalisé une étude par FTIR.

3.1.3 Étude, par FTIR, de l'effet des hautes pressions sur la dénaturation de l'actine-F.

a) Effet de l'ATP sur la conformation de l'actine-F à pression ambiante.

Le FTIR permet d'étudier la structure secondaire des protéines par analyse de la bande amide I. La figure 16 représente la bande amide I de l'actine-F. Cette bande est une bande assez large que l'on peut résoudre par déconvolution (trait plein). Après déconvolution, on peut distinguer deux pics et deux épaulements. Le pic à 1632 cm^{-1} représente les feuillets- β , celui à 1660 cm^{-1} ,

Figure 16: (Page suivante) Spectres FTIR de la bande amide I de l'actine-F avant (-----) et après déconvolution (———).



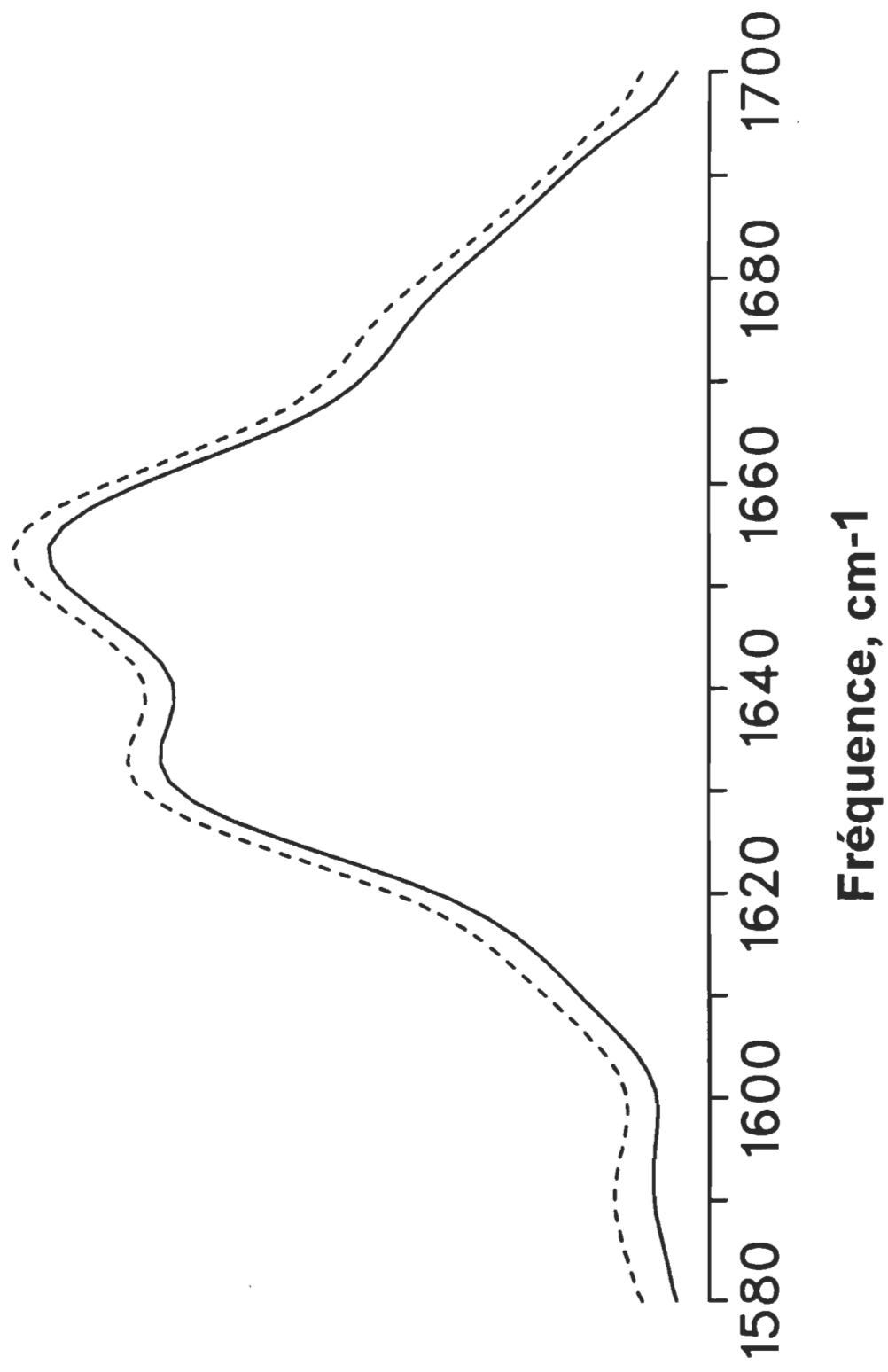
les hélices- α . L'épaulement à 1610 cm^{-1} correspond aux interactions intermoléculaires et celui à 1675 cm^{-1} , aux coudes. L'analyse de la bande amide I de l'actine correspond bien à ce qui est connu de la structure de l'actine observée par diffraction des rayons-X (51).

La figure 17 montre deux spectres FTIR de l'actine. Le spectre en trait plein représente la bande amide I déconvoluée de l'actine-F en absence d'ATP et la courbe pointillée, la bande amide I de l'actine-F en présence de 3 mM d'ATP et ce, à pression ambiante. On peut remarquer que les deux courbes sont identiques. La présence d'ATP dans le milieu ne provoque donc pas, à pression ambiante, de changement de conformation de l'actine qui entraîne une modification de la bande amide I.

b) Effet des hautes pressions sur l'actine-F, en absence et en présence d'ATP.

Il est possible de dénaturer les protéines en les soumettant à de hautes pressions, supérieures à 10 Kbar. Nous avons déjà mis en évidence que l'ATP protège l'actine contre la dénaturation thermique. L'actine sera-t-elle aussi protégée contre la dénaturation par de hautes pressions?

Figure 17: (Page suivante) Spectres FTIR déconvolués de la bande amide I de l'actine-F à pression ambiante. Courbe pointillée: actine-F en présence de 3 mM d'ATP. Courbe pleine: actine-F seule.



La figure 18 montre deux séries de courbes obtenues à l'aide du FTIR à haute pression. La première série de courbes (en haut) représente la bande amide I de l'actine-F, en absence d'ATP, lorsque la protéine est soumise à des pressions croissantes. La deuxième série de courbes (en bas) représente la bande amide I de l'actine-F lorsque la protéine est soumise à des pressions croissantes mais en présence de 3 mM d'ATP.

En absence d'ATP (série du haut), on peut constater que lorsque la pression augmente, il se produit une hausse du pic à 1632 cm^{-1} ce qui signifie une augmentation de la contribution des feuillets- β . Pour des pressions supérieures à 8 kBar, le pic des feuillets- β devient aussi élevé que celui des hélices- α , puis à partir d'environ 9 kBar, il y a la disparition brutale des deux pics qui fusionnent en un pic à 1640 cm^{-1} . Ce pic correspond soit à une structure désordonnée soit à une combinaison du pic à 1632 cm^{-1} et celui à 1655 cm^{-1} . Ce phénomène est mieux illustré à la figure 19, qui représente le maximum des fréquences de la bande amide I en fonction de la pression, où l'on voit que, à 9 Kbar, il se produit une brusque transition caractérisée par une baisse des fréquences de la bande à 1655 cm^{-1} et une hausse des fréquences de la bande à 1630 cm^{-1} .

En présence d'ATP (figure 18), nous remarquons une hausse très marquée du pic des feuillets- β à mesure que la pression augmente. La contribution des feuillets- β devient plus importante que celle des hélices- α . Cela

Figure 18: (Page suivante) Spectres FTIR de la bande amide I de l'actine-F pour des pressions croissantes. Série du haut: actine-F seule. Série du bas: actine-F en présence de 3 mM d'ATP. La pression est indiquée en kBar à la droite des courbes.

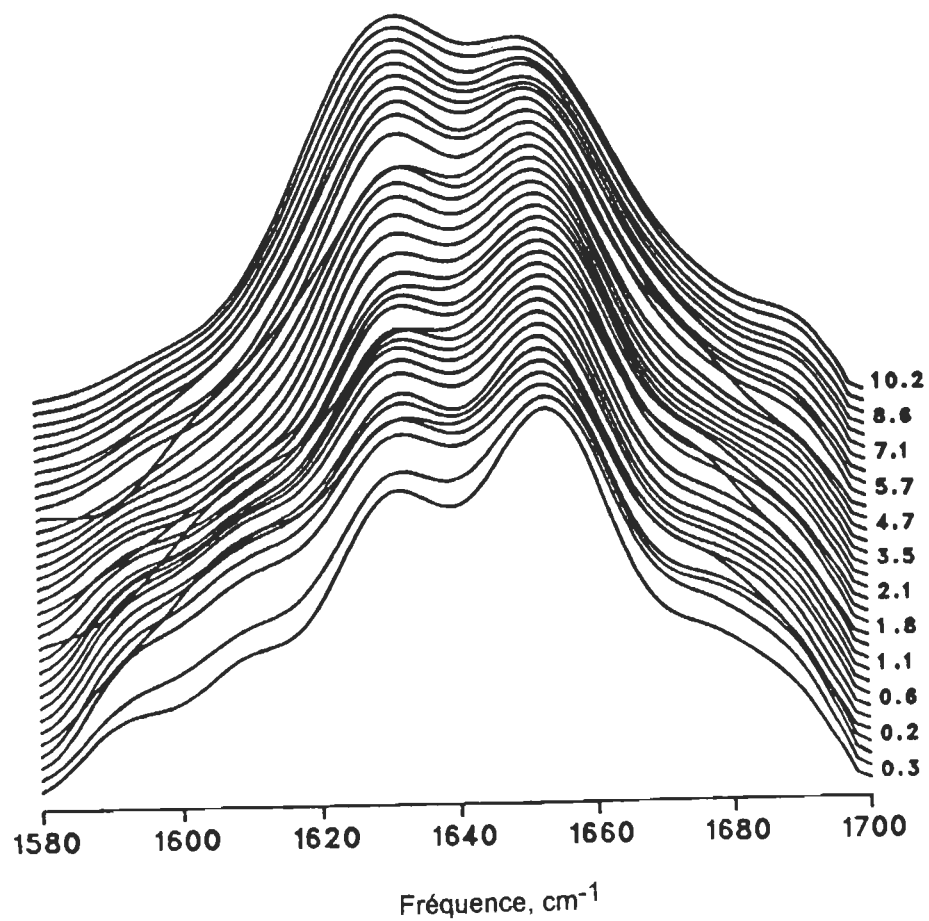
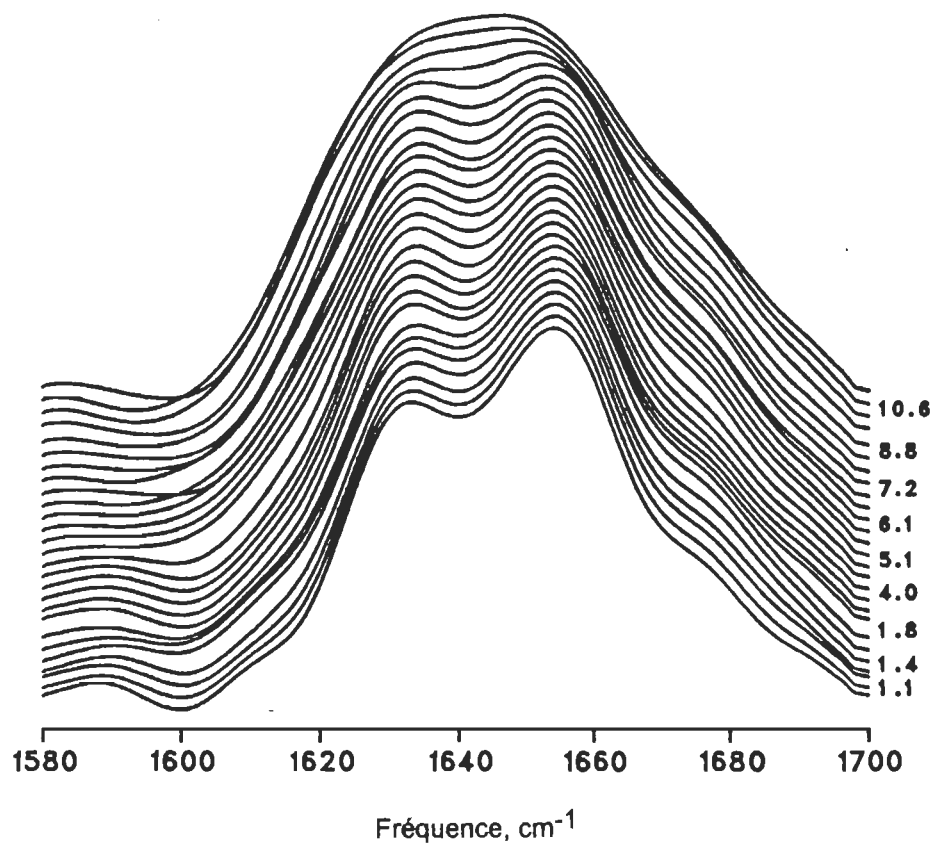
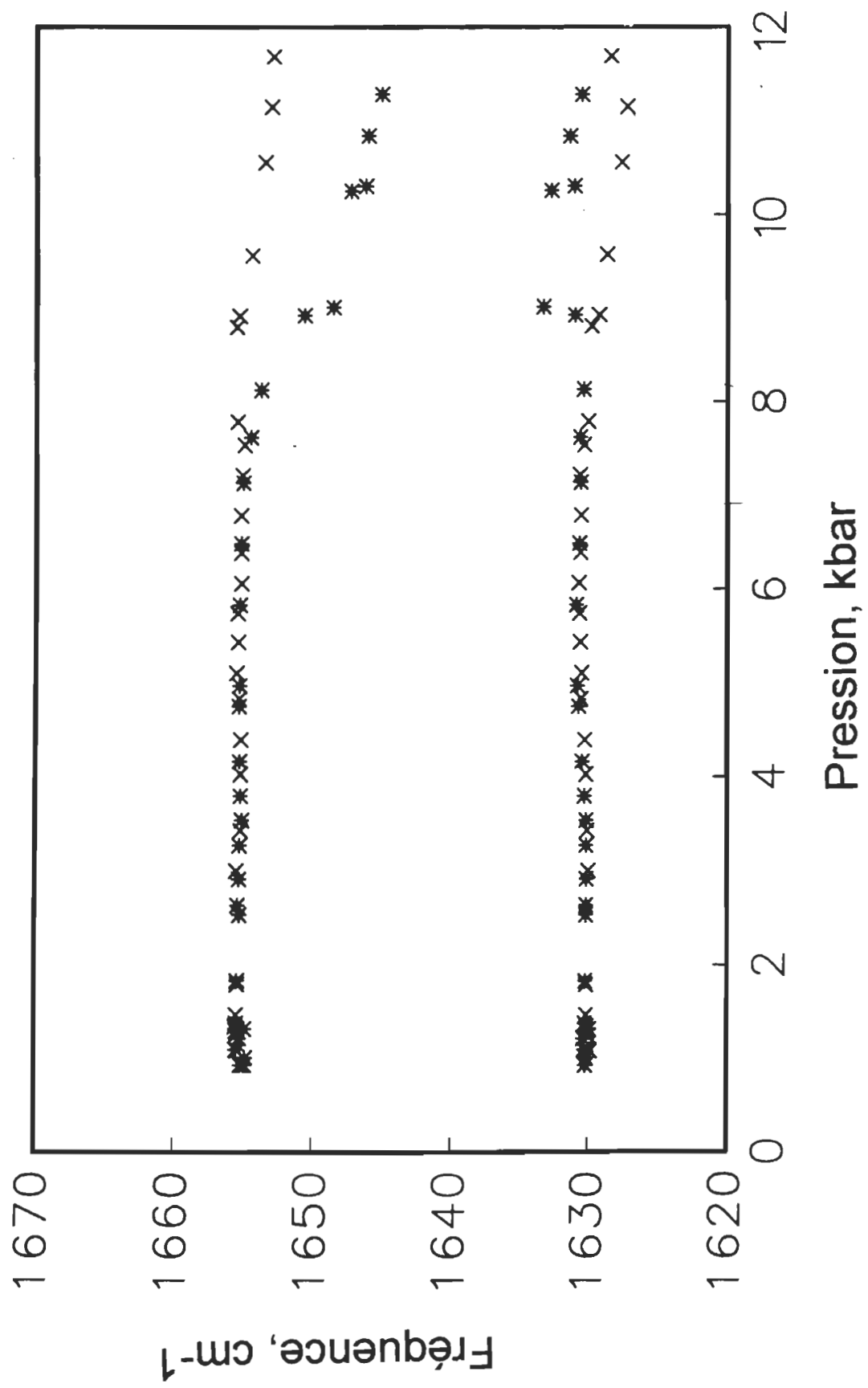


Figure 19: (Page suivante) Maximum de fréquence de la bande amide I en présence de 3 mM d'ATP (+) et en absence d'ATP (*) en fonction de la pression. Le maximum à 1655 cm^{-1} est la contribution des hélices- α et à 1630 cm^{-1} des feuillets- β .



signifie que la présence d'ATP favorise ou stabilise la structure des feuillets- β à de hautes pressions.

Cependant, en présence d'ATP il n'y a pas de fusion des deux pics même à une pression de 10.2 kBar, qui est la pression maximale que l'on peut atteindre, ce qui signifie que l'actine, en présence d'ATP, n'est pas entièrement dénaturée à cette pression ou est dénaturée de manière différente. Donc les liens qui stabilisent les structures secondaires de l'actine-F sont modifiées en présence d'ATP.

Conclusion: La présence d'ATP ne provoque pas de changement de conformation de la bande amide I de l'actine-F à pression ambiante, mais l'actine est plus stable aux hautes pressions et les mécanismes de dénaturation sont différents.

3.1.4 Étude, par FTIR, de l'effet de la température sur la dénaturation de l'actine-F

Cette partie du travail a été faite en collaboration avec la professeure Michèle Auger et M. Mario Bouchard du département de chimie, Université Laval. Le FTIR à température variable fonctionne sur le même principe que le FTIR à haute pression sauf que l'on fait augmenter la température et non la pression. On peut avec cet appareil comparer la stabilité thermique de l'actine-F, en présence, et en absence d'ATP.

Le tableau 1 et la figure 20 montrent le pourcentage des structures qui composent la bande amide I de l'actine-F en fonction de la température. On peut remarquer qu'à partir de 60°C, le pourcentage d'hélices ordonnées et d'hélices désordonnées diminue drastiquement (la somme des hélices ordonnées et des hélices désordonnées est considérée comme étant le pourcentage total des hélices- α) tandis que le pourcentage des feuillets- β et des structures désordonnées augmentent rapidement. Ce changement brutal dans la structure secondaire de la protéine correspond à la dénaturation thermique de l'actine-F. Cependant, un excès d'ATP (10 mM) ne modifie pas le phénomène.

Conclusion: Dans cette série d'expériences, le FTIR indique que, à température ambiante, l'ATP ne change pas la conformation de l'actine suffisamment pour modifier la bande amide I et ne semble pas stabiliser l'actine contre la dénaturation thermique. Ce résultat est en contradiction avec nos résultats de DSC. Dans la discussion nous essaierons d'expliquer cette contradiction.

3.2 Spécificité du nucléotide sur la stabilisation de l'actine-F

3.2.1 Effet de la substitution de la base du nucléotide

Les résultats obtenus par DSC, par fluorimétrie et par turbidimétrie indiquent que l'ATP stabilise l'actine-F. Cette stabilisation est-elle spécifique à l'ATP ou bien peut-elle être produite par d'autres nucléotides? Dans une première

Température

Structure	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C	45 °C	50 °C	55 °C
Hélice ordonnée	24.0	23.9	24.1	24.3	23.5	24.9	24.0
Hélice désordonnée	11.7	10.9	11.2	11.3	10.3	10.9	9.6
Feuillet β	32.6	32.1	32.4	32.4	33.1	32.9	33.9
structure désordonnée	31.5	32.7	31.9	31.6	32.7	30.8	32.0
VALEUR DE k	1.06	1.06	1.06	1.06	1.06	1.07	1.07
%ERREUR	.69	.74	.84	.93	1.01	.99	1.19

Température

Structure	60 °C	65 °C	70 °C	75 °C	80 °C	85 °C	90 °C
Hélice ordonnée	24.9	24.0	21.9	12.7	9.5	10.9	11.0
Hélice désordonnée	9.2	9.25	7.2	3.5	0.65	0.28	0.97
Feuillet β	33.8	35.1	37.6	45.9	49.8	49.7	50.0
structure désordonnée	31.3	30.9	32.2	35.9	37.8	36.8	35.4
VALEUR DE k	1.08	1.09	1.09	1.10	1.08	1.10	1.11
%ERREUR	1.45	1.47	1.75	2.53	3.43	3.70	3.79

Tableau 1: Pourcentage des différentes structures secondaires de la bande amide I de l'actine-F en absence d'ATP. Les résultats sont les mêmes avec l'actine-F en présence de 10 mM d'ATP.

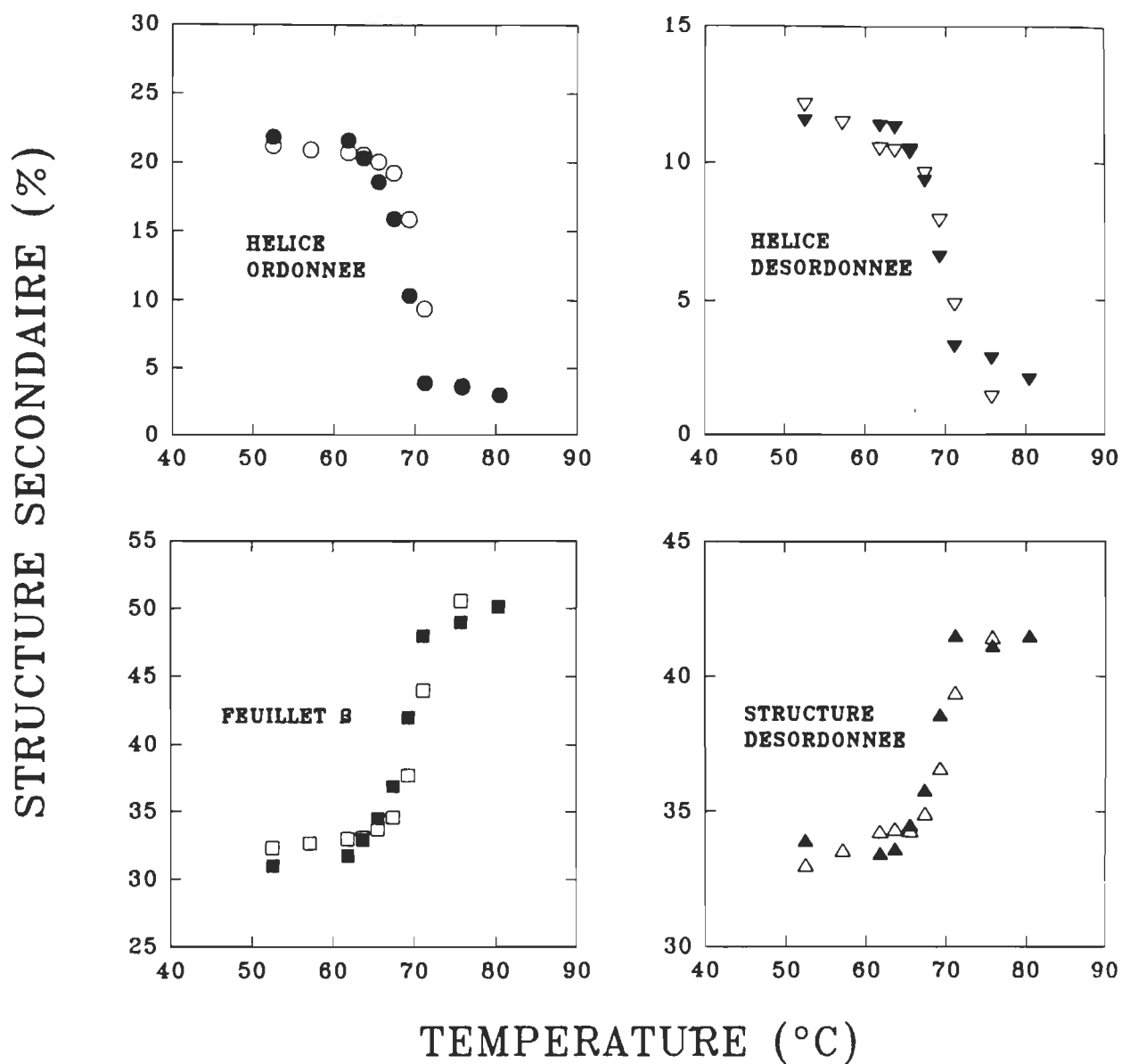


Figure 20: Pourcentage de différentes structures secondaires de la bande amide I de l'actine-F en fonction de la température obtenus par FTIR. Les symboles pleins représentent l'actine-F en absence d'ATP. Les symboles vides, l'actine-F en présence de 10 mM d'ATP.

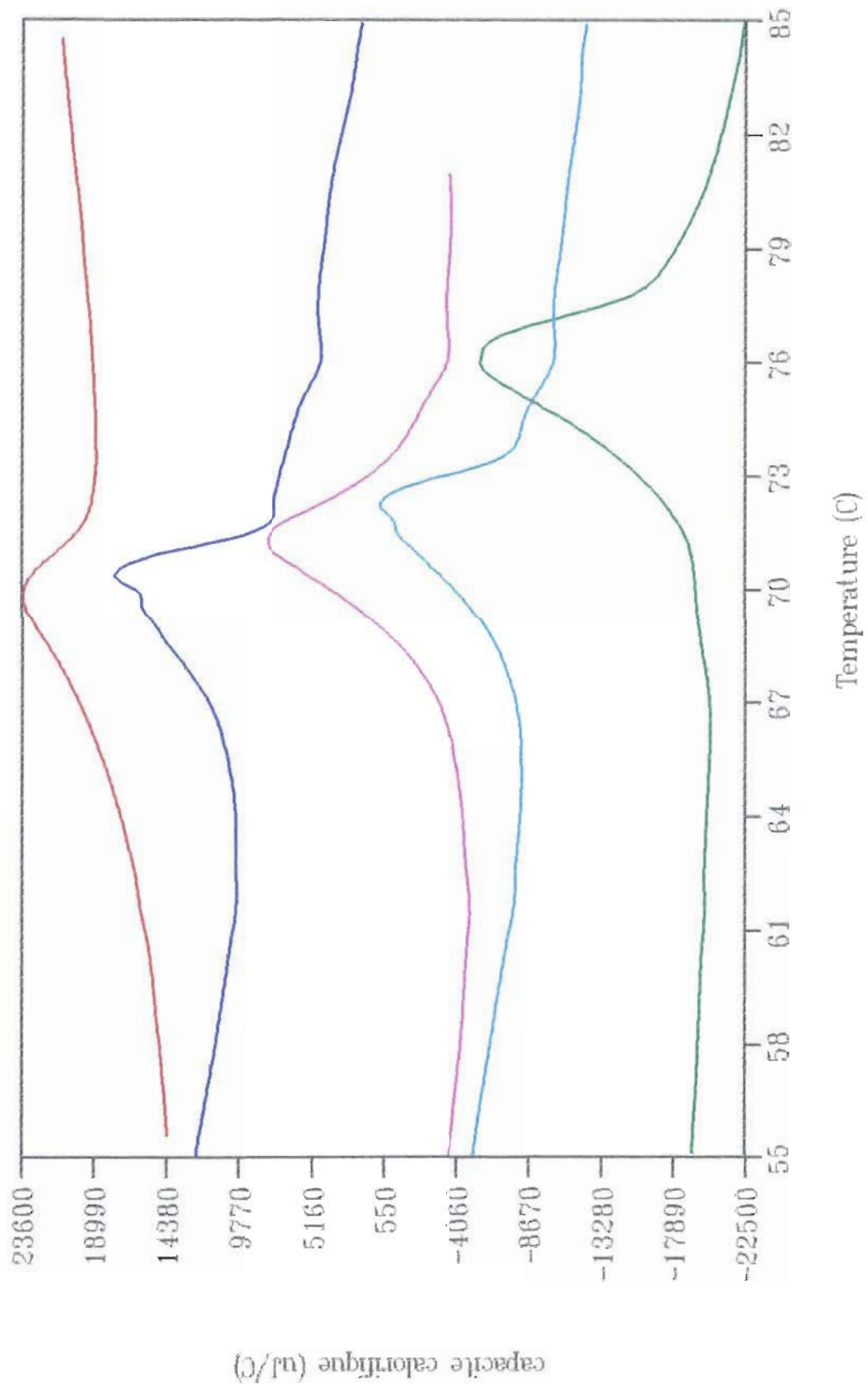
série d'expériences, nous avons comparé l'effet, sur la stabilisation de l'actine-F, de nucléotides qui diffèrent seulement par leur base: le GTP, le CTP, l'ATP et l'UTP.

La figure 21 montre les thermogrammes de l'actine-F en présence de ces différents nucléotides. La figure 22 représente l'effet de différentes concentrations de ces nucléotides sur la température de transition de l'actine-F.

En présence de 5 mM d'ATP, la température de transition de l'actine passe de 69.6°C pour l'actine-F seule à 75.8°C, ce qui donne une stabilisation de 6°C. Par contre, les autres nucléotides n'augmentent que de très peu la température de transition. Le GTP (5 mM) fait passer la température de transition de 69.6°C à 70.8°C, l'UTP (5 mM), de 69.6°C à 72.2°C et le CTP (5 mM) ne change pas la température de transition. On peut remarquer sur la figure 21 que la présence des nucléotides modifie la forme du pic de transition qui devient plus étroit et plus élevé en leur présence. Par conséquent l'actine-F se dénature différemment en présence de ces nucléotides.

N.B. les températures données dans le texte peuvent varier avec celles du thermogramme puisque le thermogramme représente une seule expérience tandis que les températures données dans le texte représentent une moyenne de plusieurs expériences.

Figure 21: (Page suivante) Thermogrammes de l'actine-F en absence d'ATP supplémentaire (rouge) et d'actine-F en présence de différents nucléotides: CTP (bleu foncé), GTP (magenta), UTP (bleu pâle) et ATP (vert). La concentration de l'actine-F est de 3 mg/ml. La concentration des nucléotides est de 3 mM.



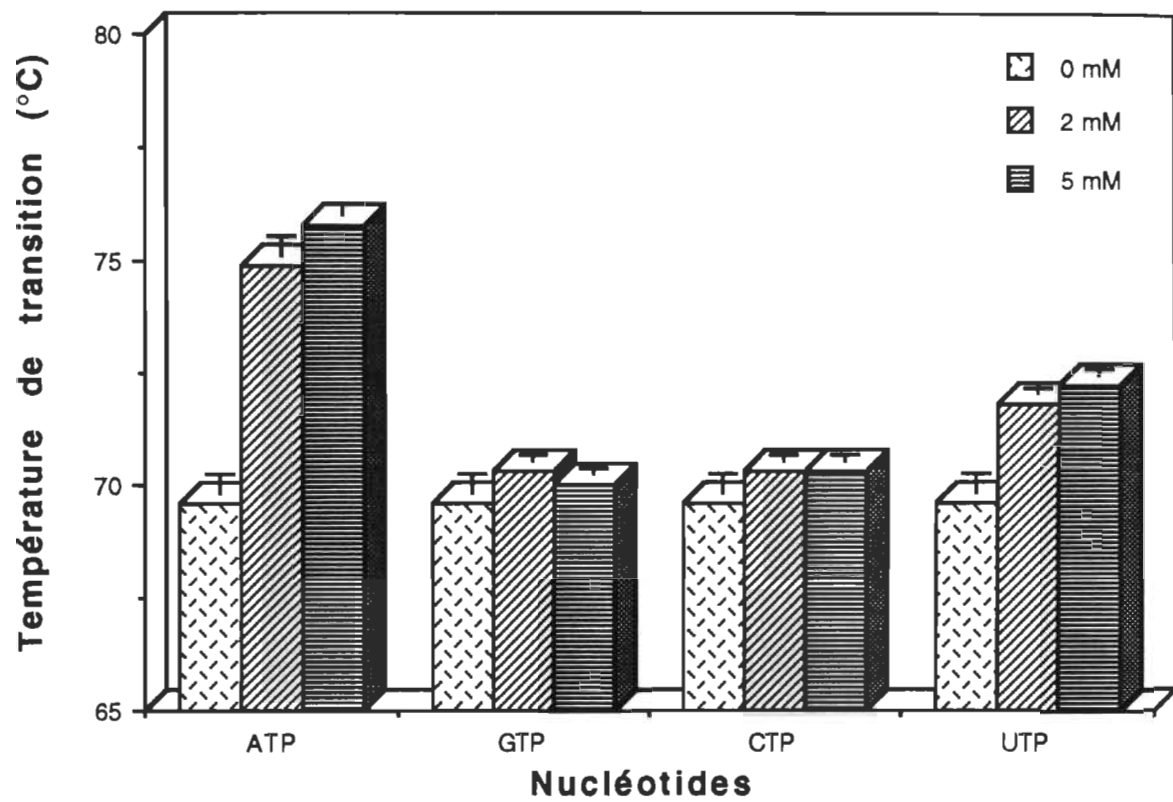


Figure 22: Effet de différentes concentrations de nucléotides sur la température de transition de l'actine-F. La concentration de l'actine est de 3 mg/ml. Les concentrations de nucléotides sont indiquées dans le coin supérieur droit.

La figure 23 montre l'enthalpie calorimétrique de la réaction de dénaturation de l'actine-F en présence de différentes concentrations de nucléotides. On peut remarquer que l'enthalpie calorimétrique de l'actine-F est plus élevée en présence d'ATP. Elle passe de 163 kcal/mol en absence d'ATP à 237 kcal/mol en présence de 5 mM d'ATP. Par contre les autres nucléotides font baisser l'enthalpie calorimétrique de l'actine-F. Le GTP (5 mM) la fait passer de 163 kcal/mol (actine seule) à 112 kcal/mol, l'UTP (5 mM) à 101 kcal/mol et le CTP (5mM) à 110 kcal/mol.

Conclusion: La stabilisation thermique de l'actine-F est donc spécifique à la présence de l'adénine comme base du nucléotide.

3.2.2 Effet du nombre de phosphates du nucléotide

Nous avons établi que l'ATP stabilise l'actine contre la dénaturation thermique et que l'adénine est essentielle à son activité. Le nombre de phosphates est-il important dans l'activité de ce nucléotide? Nous avons comparé, dans une deuxième série d'expériences, l'activité de différents nucléotides: l'ATP (trois phosphates), l'ADP (deux phosphates), l'AMP et l'AMPc (un phosphate) et l'adénosine (aucun phosphate).

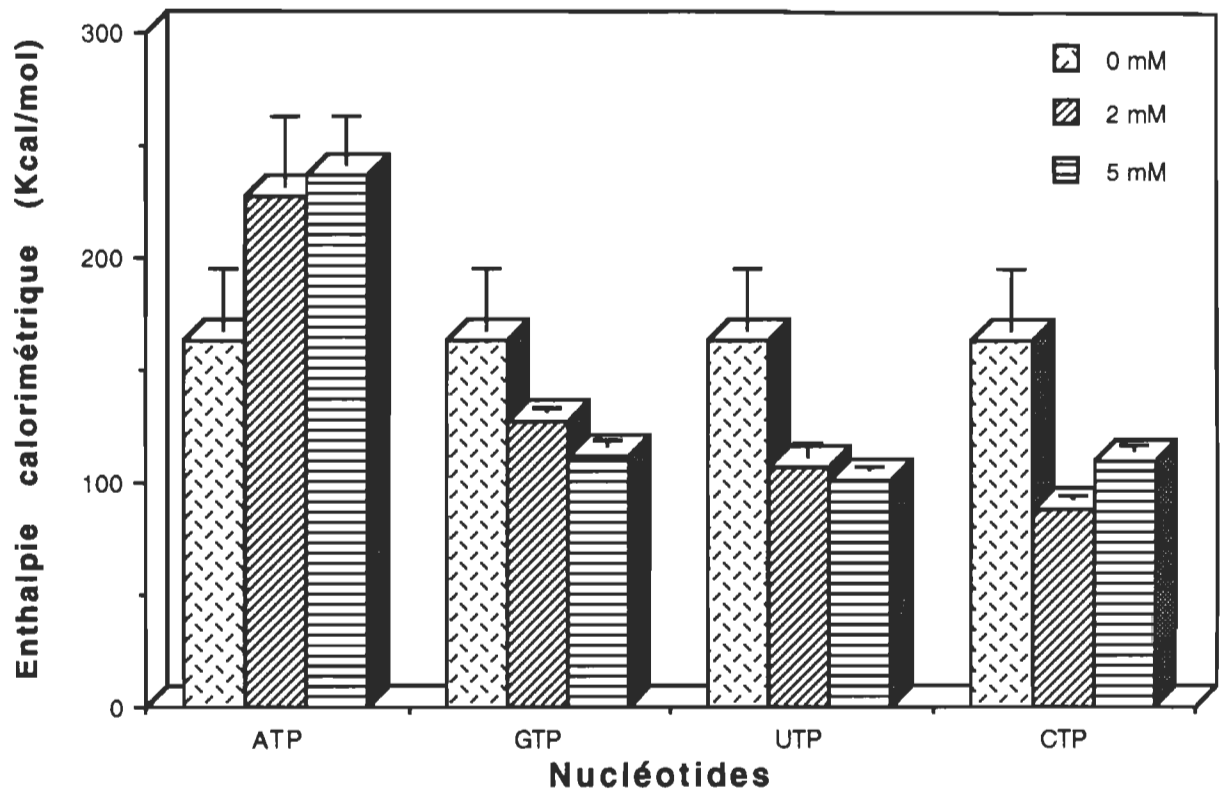


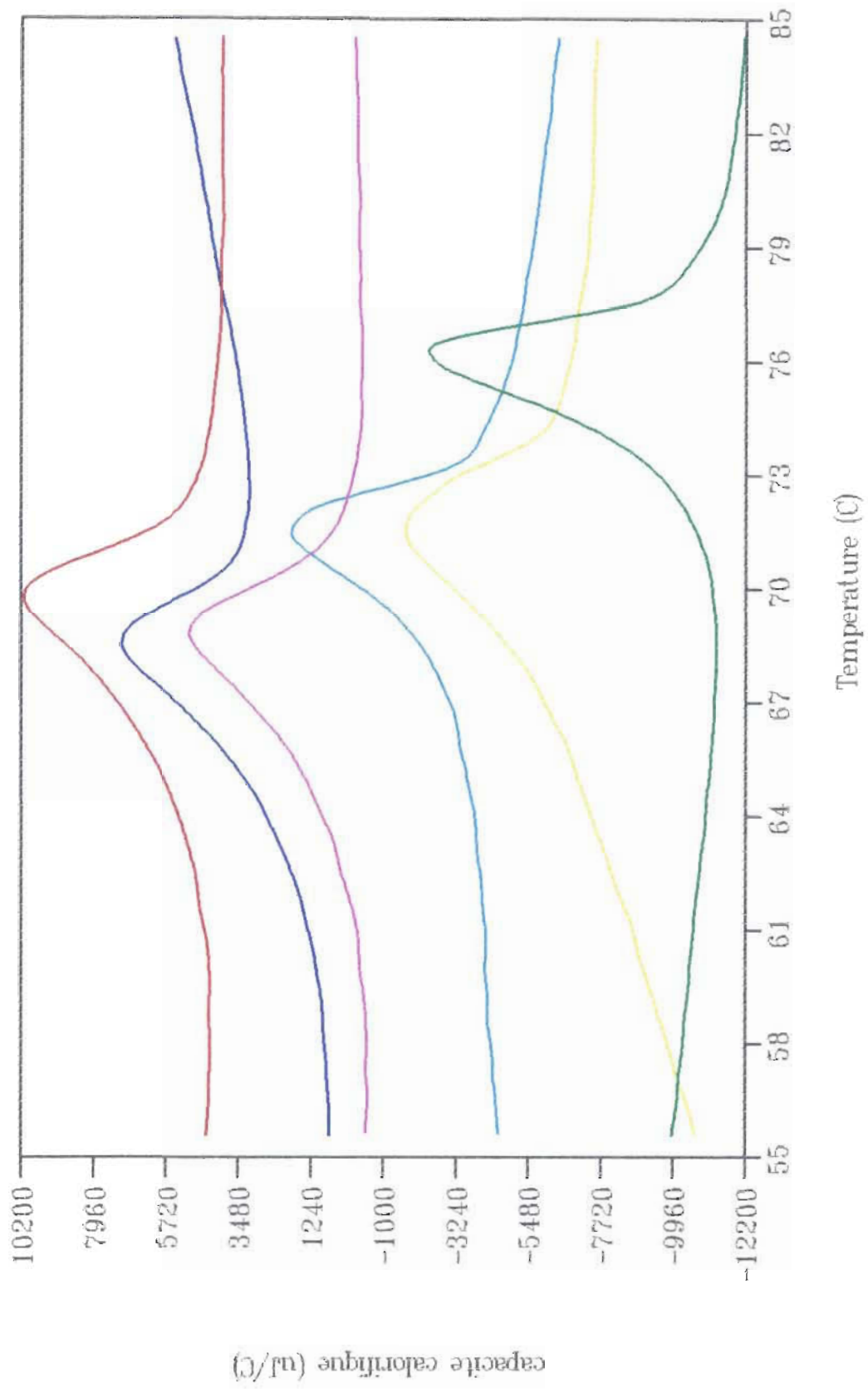
Figure 23: Effet de différentes concentrations de nucléotides sur l'enthalpie calorimétrique de l'actine-F. La concentration de l'actine-F est de 3 mg/ml. Les concentrations de nucléotides sont indiquées dans le coin supérieur droit.

La figure 24 montre les thermogrammes de l'actine-F en présence de 3 mM de ces différents nucléotides. La figure 25 représente l'effet de différentes concentrations de ces nucléotides sur la température de transition.

On peut remarquer sur les figures 24 et 25, que l'ADP et l'AMP ont un effet beaucoup plus faible que l'ATP sur le changement de la température de transition de l'actine-F. En effet, l'ATP (5 mM) fait passer la température de transition de l'actine-F de 69.6°C (actine-F seule) à 75.8°C, soit une stabilisation de 6°C. Par contre, la présence d'ADP (5 mM) ou l'AMP (5mM) n'augmente la température de transition de l'actine-F que de 2°C. Elle passe de 69.6°C en absence de nucléotide à 71.7°C en présence d'ADP ou d'AMP. L'AMPc et l'adénosine provoquent une baisse de la température de transition qui passe de 69.9°C à 68.7°C pour de faibles concentrations (5 mM) et de 69.6°C à 66°C pour de fortes concentrations de ces nucléotides (15 mM). Cette baisse de la température de transition indique que les nucléotides rendent l'actine-F plus sensible à la température. Le nombre de phosphate est donc important dans le phénomène de stabilisation de l'actine-F. On peut remarquer sur la figure 24 que ces nucléotides (ADP, AMP, AMPc et adénosine), mais non l'ATP, ne modifient pas ou très peu le pic de transition thermique de l'actine-F.

N.B. les températures données dans le textes peuvent être différentes de celles du thermogramme puisque le thermogramme représente une seule expérience et les températures données, une moyenne de plusieurs expériences.

Figure 24: (Page suivante) Thermogrammes d'actine-F seule (rouge) et d'actine-F en présence de différents nucléotides: adénosine (bleu foncé), AMPc (magenta), ADP (bleu pâle), AMP (jaune) et ATP (vert). La concentration de l'actine-F est de 3 mg/ml. La concentration des nucléotides est de 3 mM.



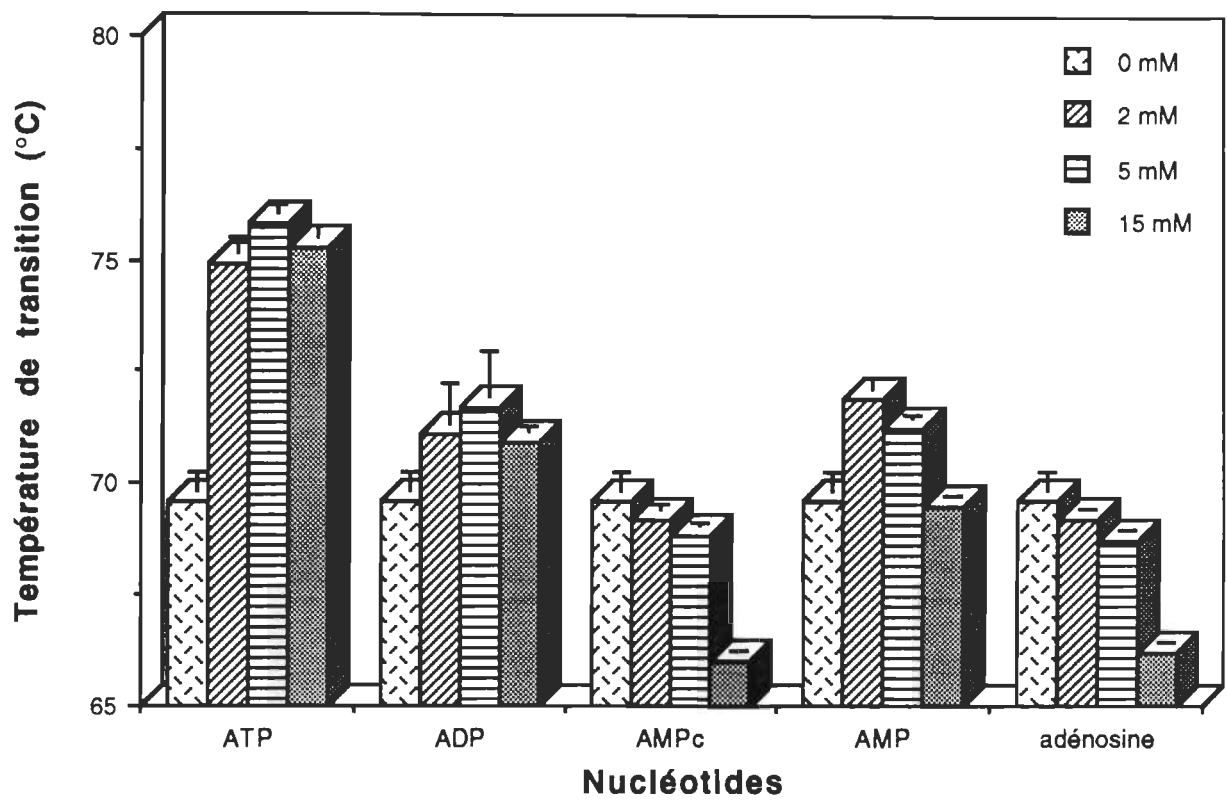


Figure 25: Effet de différentes concentrations de nucléotides (ATP, ADP, AMPc, AMP et adénosine) sur la température de transition de l'actine-F obtenue en DSC. La concentration de l'actine est de 3 mg/ml. Les concentrations de nucléotides sont indiquées dans le coin supérieur droit.

La figure 26 montre l'effet de différentes concentrations de ces nucléotides sur l'enthalpie calorimétrique de l'actine-F. En présence d'ATP, l'enthalpie calorimétrique de l'actine-F est plus élevée, elle passe de 163 kcal/mol à 237 kcal/mol. On note aussi une légère augmentation en présence d'ADP, elle passe de 163 kcal/mol à 169 kcal/mol et avec l'AMP (5 mM), elle passe de 163 kcal/mol à 177 kcal/mol. L'AMPc (5 mM) et l'adénosine (5 mM) font baisser l'enthalpie calorimétrique de l'actine-F qui passe de 163 kcal/mol à 147 kcal/mol pour l'AMPc et à 128 kcal/mol pour l'adénosine. À plus forte concentration, l'AMPc (15 mM) et l'adénosine (15 mM) font baisser l'enthalpie calorimétrique de façon encore plus marquée, de 163 kcal/mol à 89 kcal/mol pour l'AMPc et à 112 kcal/mol pour l'adénosine.

Conclusion: La présence des trois phosphates de l'ATP est essentielle pour obtenir une stabilisation de l'actine-F.

3.2.3 Effet du phosphate inorganique et de ses analogues

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, l'hydrolyse de l'ATP par l'actine-F se fait en deux étapes. La première étape, qui consiste en un clivage de l'ATP, est irréversible tandis que la deuxième étape qui est réversible est le relargage du phosphate inorganique dans le milieu (figure 5). C'est ce relargage de phosphate qui diminue l'interaction entre les monomères du filament (15).

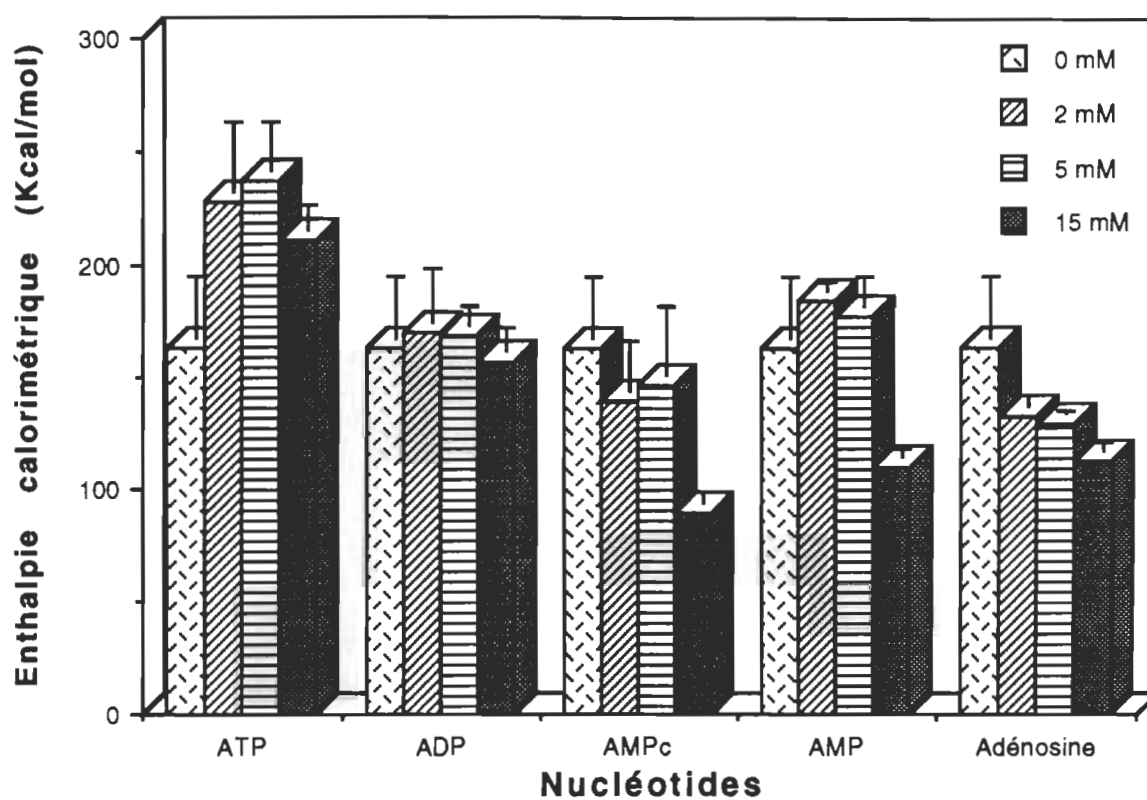


Figure 26: Effet de différentes concentrations de nucléotides (ATP, ADP, AMPc, AMP et adénosine) sur l'enthalpie calorimétrique de l'actine-F. La concentration de l'actine-F est de 3 mg/ml. Les concentrations de nucléotides sont indiquées dans le coin supérieur droit.

Nous avons montré que la présence des trois phosphates de l'ATP est essentielle à l'activité du nucléotide. Lors de l'hydrolyse de l'ATP par l'actine-F le lien du troisième phosphate est hydrolysé. Nous avons alors la formation de l'intermédiaire $\text{ADP} \cdot \text{P}_i$. Cet intermédiaire possède aussi trois phosphates. Le troisième phosphate n'est plus lié au nucléotide mais reste dans le site du monomère d'actine. Ce phosphate est ensuite libéré dans le milieu. En augmentant la concentration de phosphate inorganique, on peut diminuer la libération du phosphate du monomère d'actine (16, 22, 65, 108) et ainsi vérifier si le complexe actine $\text{ADP} \cdot \text{P}_i$ est aussi stable que le complexe actine-ATP.

D'autre part, les fluorures de béryllium et d'aluminium sont des analogues structuraux du phosphate inorganique (figure 27) qui ont la propriété de se fixer à la place du P_i dans le monomère d'actine- $\text{ADP} \cdot \text{P}_i$ et donner ainsi un monomère d'actine- $\text{ADP} \cdot \text{BeF}_3$ ou d'actine- $\text{ADP} \cdot \text{AlF}_4$. Cette affinité est beaucoup plus forte que celle du phosphate inorganique (22).

La figure 28 représente les thermogrammes de l'actine-F en présence d'ATP, de phosphate inorganique, de fluorure de béryllium et de fluorure d'aluminium. La figure 29 représente l'effet de différentes concentrations de ces complexes sur la température de transition de l'actine-F.

On peut remarquer sur les figures 28 et 29, que l'ajout d'ATP (5 mM) fait passer la température de transition de l'actine-F de 69.6°C (actine seule) à 75.8°C soit une stabilisation de 6°C. La présence de phosphate inorganique n'a pas

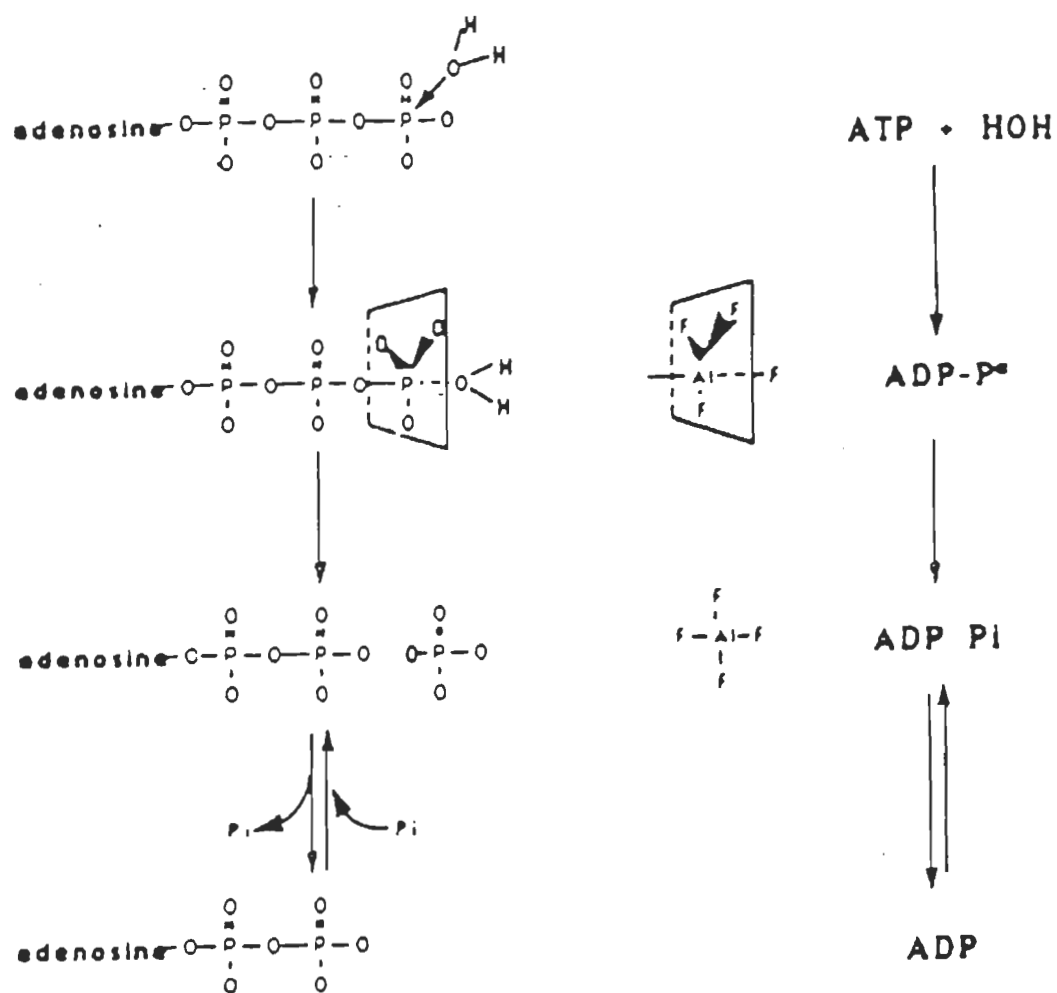
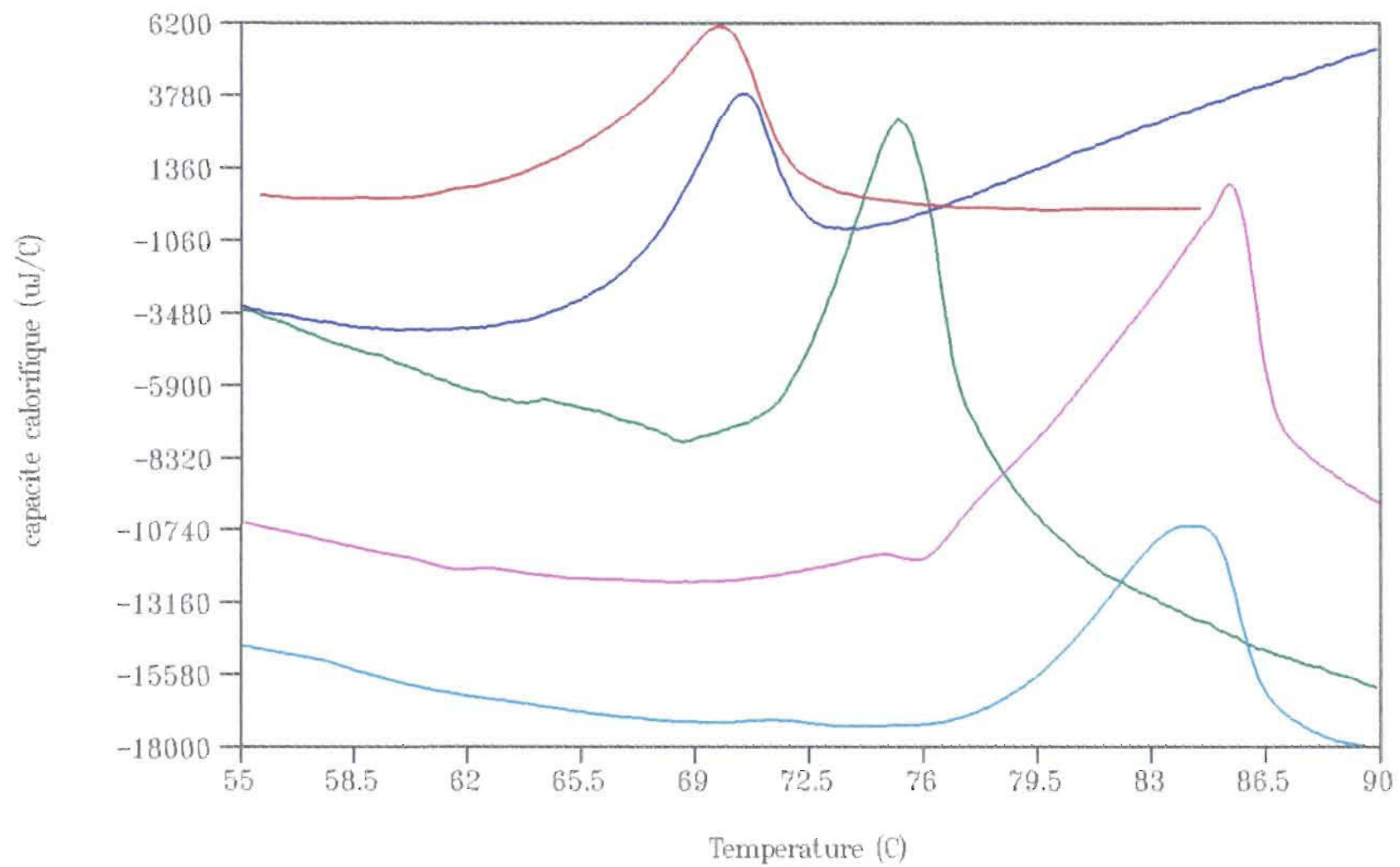


Figure 27: Analogues du phosphate et hydrolyse de l'ATP. Tiré de Carlier, 1992.

Figure 28: (Page suivante) Thermogrammes d'actine-F seule (rouge) et d'actine-F en présence de 5 mM de phosphate inorganique (bleu foncé), de 3 mM d'ATP (vert) et de ses analogues structuraux (0.1 mM): fluorure d'aluminium (magenta) et fluorure de béryllium (bleu pâle). La concentration de l'actine-F est de 3 mg/ml.



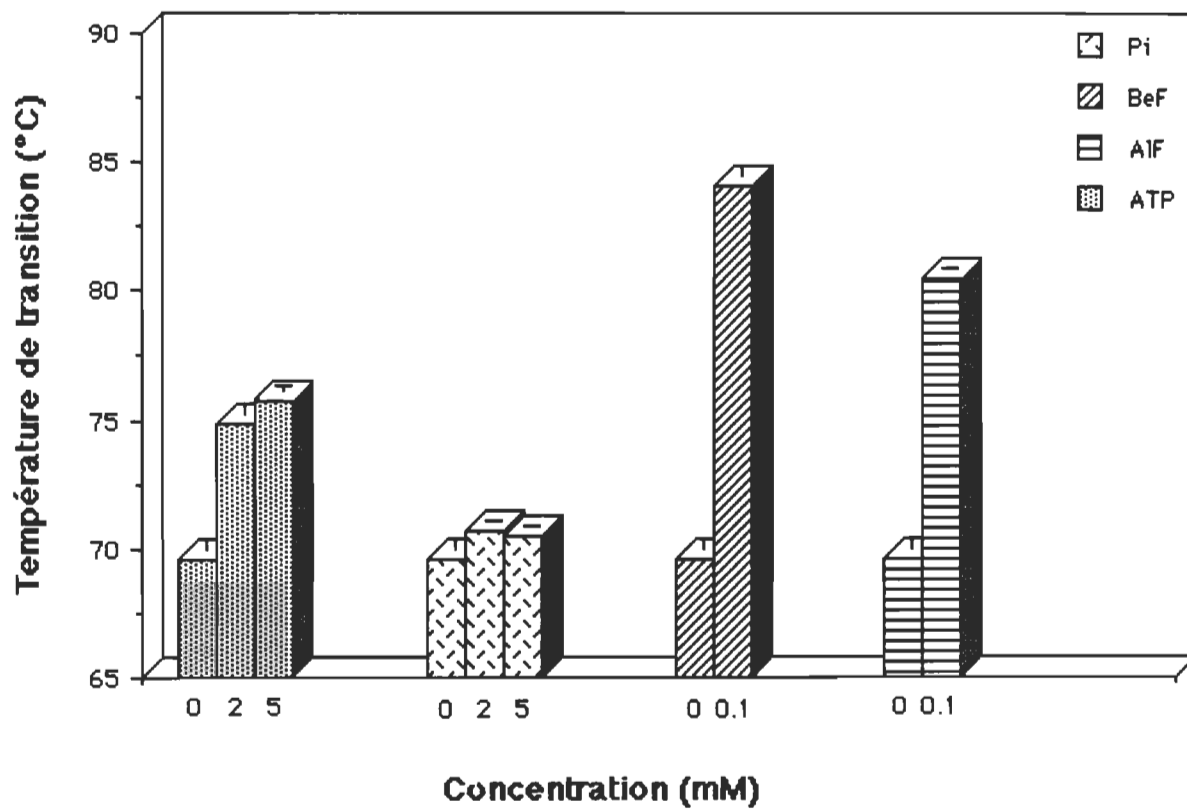


Figure 29: Effet de différentes concentrations d'ATP, de phosphate inorganique, de fluorure de béryllium et de fluorure d'aluminium sur la température de transition de l'actine-F obtenu par DSC. La concentration de l'actine-F est de 3 mg/ml. Les différents composés sont identifiés dans le coin supérieur droit.

d'effet sur la température de transition. Par contre, la présence de fluorure de béryllium ou de fluorure d'aluminium augmente la température de transition de l'actine-F de façon très importante. Elle passe de 69.6°C pour l'actine-F seule à 84°C pour l'actine en présence de fluorure de béryllium et à 80.4°C pour le fluorure d'aluminium.

La figure 30 nous montre l'effet des fluorures de béryllium et des fluorures d'aluminium sur l'enthalpie calorimétrique de l'actine-F. On peut remarquer que seul l'ATP fait augmenter l'enthalpie calorimétrique. Par contre, le phosphate (5 mM) fait passer l'enthalpie calorimétrique de 163 kcal/mol à 135 kcal/mol, le fluorure de béryllium (0.1 mM) de 163 kcal/mol à 147 kcal/mol et enfin le fluorure d'aluminium (0.1 mM) de 163 kcal/mol à 139 kcal/mol.

N.B.: nous avons utilisé des concentrations de fluorure d'aluminium et de béryllium (0.1 mM) plus faibles que celles des nucléotides tel que recommandé par Bigay *et al* (6) pour obtenir les complexes AlF_4 et BeF_3 qui sont des analogues du PO_4 . Si on augmente les concentrations d'aluminium ou de béryllium, il se forme des complexes $Al^{(n)}F$ et $Be^{(n)}F$ qui ne sont plus des analogues du phosphate.

Conclusion: La présence du phosphate inorganique n'a pas d'effet sur la température de transition de l'actine-F. Par contre la présence des analogues structuraux du phosphate inorganique augmente de façon très importante (+ 14°C) la température de transition de l'actine. Ils stabilisent donc très fortement l'actine-F contre la dénaturation thermique.

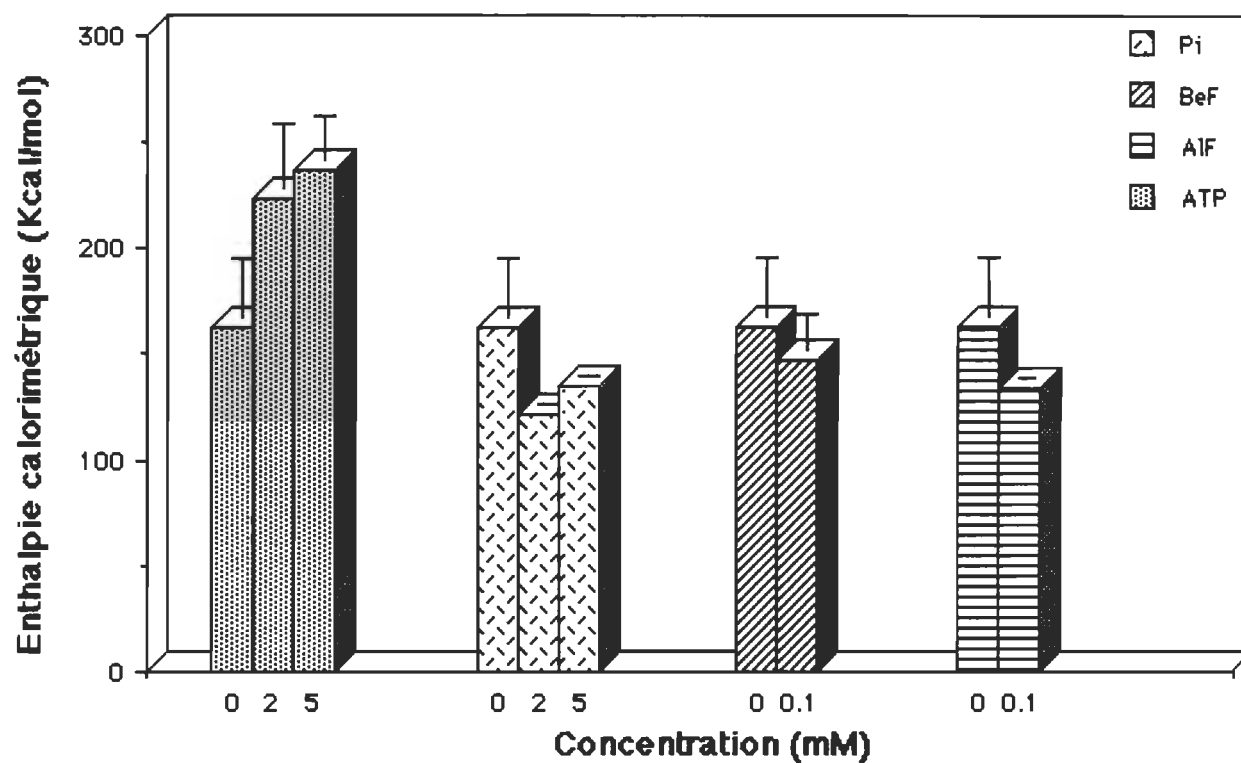


Figure 30: Effet de différentes concentrations d'ATP, de phosphate inorganique, de fluorure de béryllium et de fluorure d'aluminium sur l'enthalpie calorimétrique de l'actine-F. La concentration d'actine-F est de 3 mg/ml. Les différents composés sont identifiés dans le coin supérieur droit.

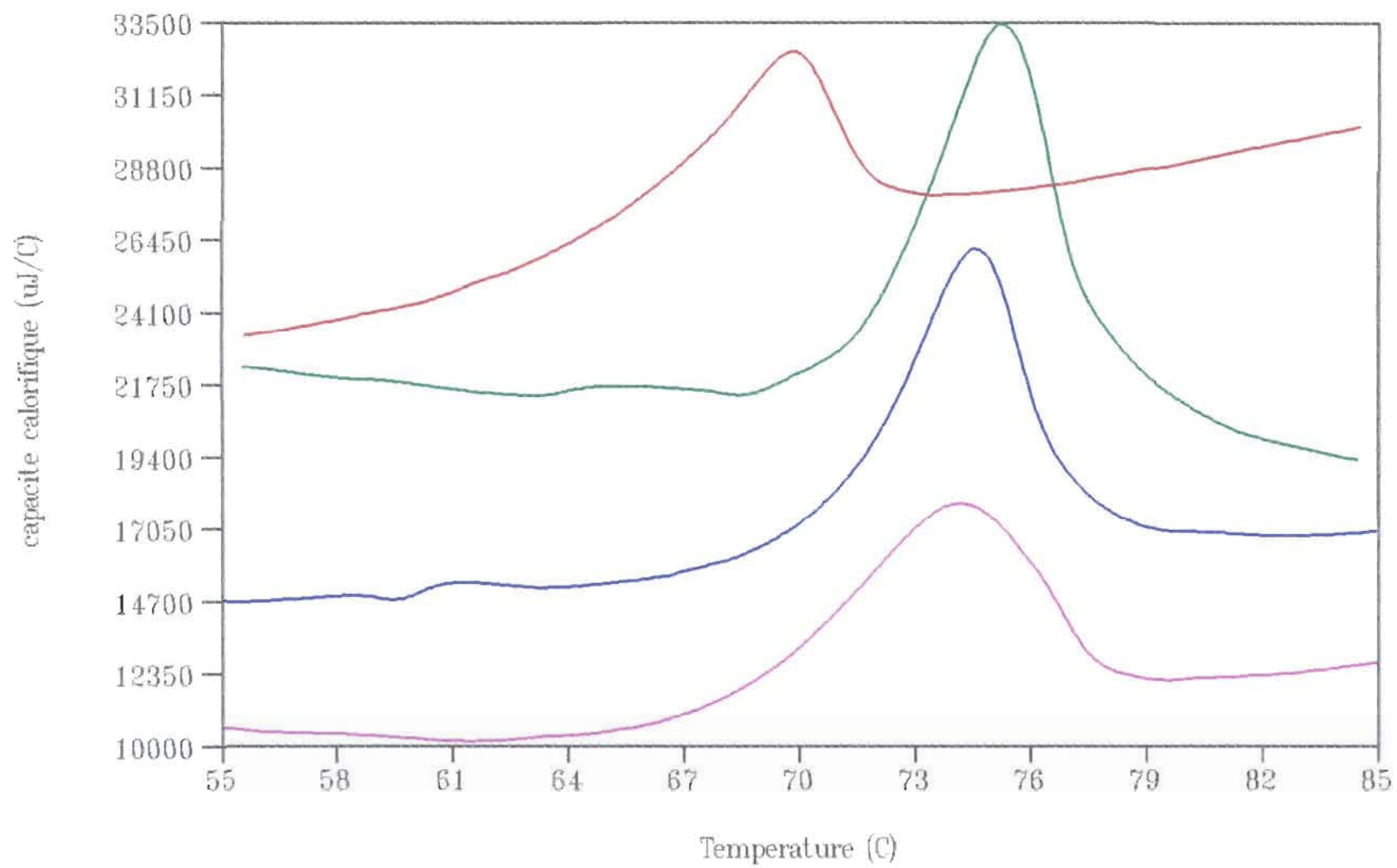
3.3 Effet de l'hydrolyse de l'ATP sur la stabilisation thermique de l'actine-F.

La stabilisation de l'actine est spécifique à l'ATP. Ce nucléotide est une molécule dont la fonction est surtout de céder de l'énergie lors de l'hydrolyse du troisième phosphate. On peut se demander si l'hydrolyse de l'ATP joue un rôle dans la stabilisation thermique de l'actine-F. Nous avons donc comparé l'activité de l'ATP à celle d'analogues structuraux non-hydrolysables de l'ATP: l'AMP-PNP et l' ϵ -ATP.

La figure 31 montre les thermogrammes d'actine-F en présence d'ATP et de ses analogues non-hydrolysables et la figure 32 représente l'effet de différentes concentrations de ces nucléotides sur la température de transition de l'actine-F.

On peut remarquer que l'AMP-PNP et l' ϵ -ATP sont aussi actifs que l'ATP. L'ATP (2 mM) fait passer la température de transition de 69.6°C à 74.9°C, l'AMP-PNP (2 mM) de 69.6°C à 73.9 °C et l' ϵ -ATP (2 mM) de 69.6°C à 74.6°C soit une stabilisation d'environ 4°C. On note aussi un changement dans la forme des thermogrammes lorsque l'actine-F est en présence d'ATP ou de ses analogues non-hydrolysables. L'ATP et l' ϵ -ATP donnent un pic de transition plus étroit et plus élevé que l'actine-F seule. L'AMP-PNP donne un pic plus large, ce qui indique que l'actine se dénature différemment en présence de ces nucléotides.

Figure 31: (Page suivante) Thermogrammes de l'actine-F seule (rouge) et d'actine-F en présence d'ATP (vert) et de ses analogues non-hydrolysables: ϵ -ATP (bleu) et AMP-PNP (magenta). La concentration des nucléotides est de 3 mM et la concentration de l'actine-F est de 3 mg/ml.



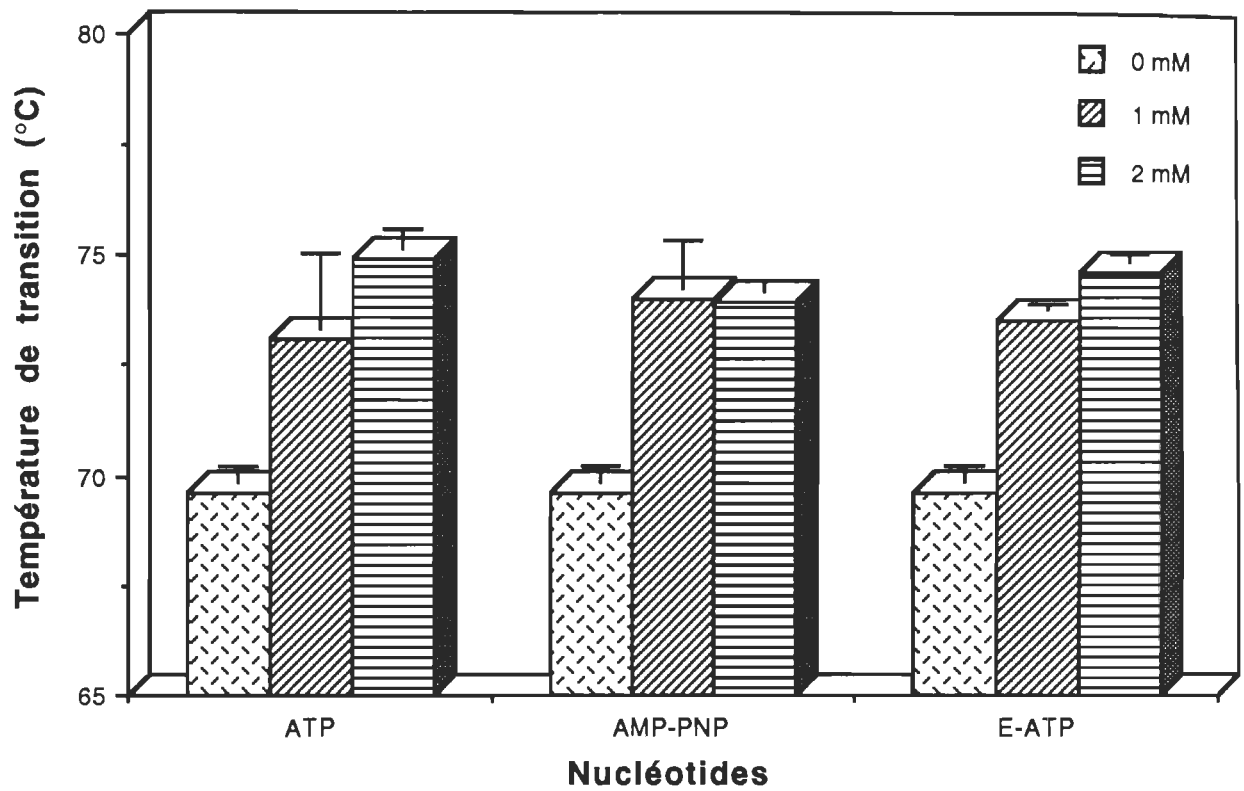


Figure 32: Effet de différentes concentrations d'ATP et de ses analogues non-hydrolysables sur la température de transition de l'actine-F. La concentration de l'actine-F est de 3 mg/ml. Les concentrations de nucléotides sont indiquées dans le coin supérieur droit.

La figure 33 montre l'effet de ces nucléotides sur l'enthalpie calorimétrique de l'actine-F. La présence d'ATP (2 mM) augmente l'enthalpie calorimétrique de l'actine-F de 163 kcal/mol à 227 kcal/mol. Par contre, l'AMP-PNP (2 mM) et l' ϵ -ATP (2 mM) font baisser l'enthalpie calorimétrique de 163 kcal/mol à 129 kcal/mol pour l'AMP-PNP et de 163 kcal/mol à 124 kcal/mol pour l' ϵ -ATP.

Conclusion: Les analogues non-hydrolysables de l'ATP sont aussi actifs que l'ATP lui-même. Par conséquent, l'hydrolyse du phosphate- γ ne semble pas jouer de rôle dans le phénomène de stabilisation de l'actine-F.

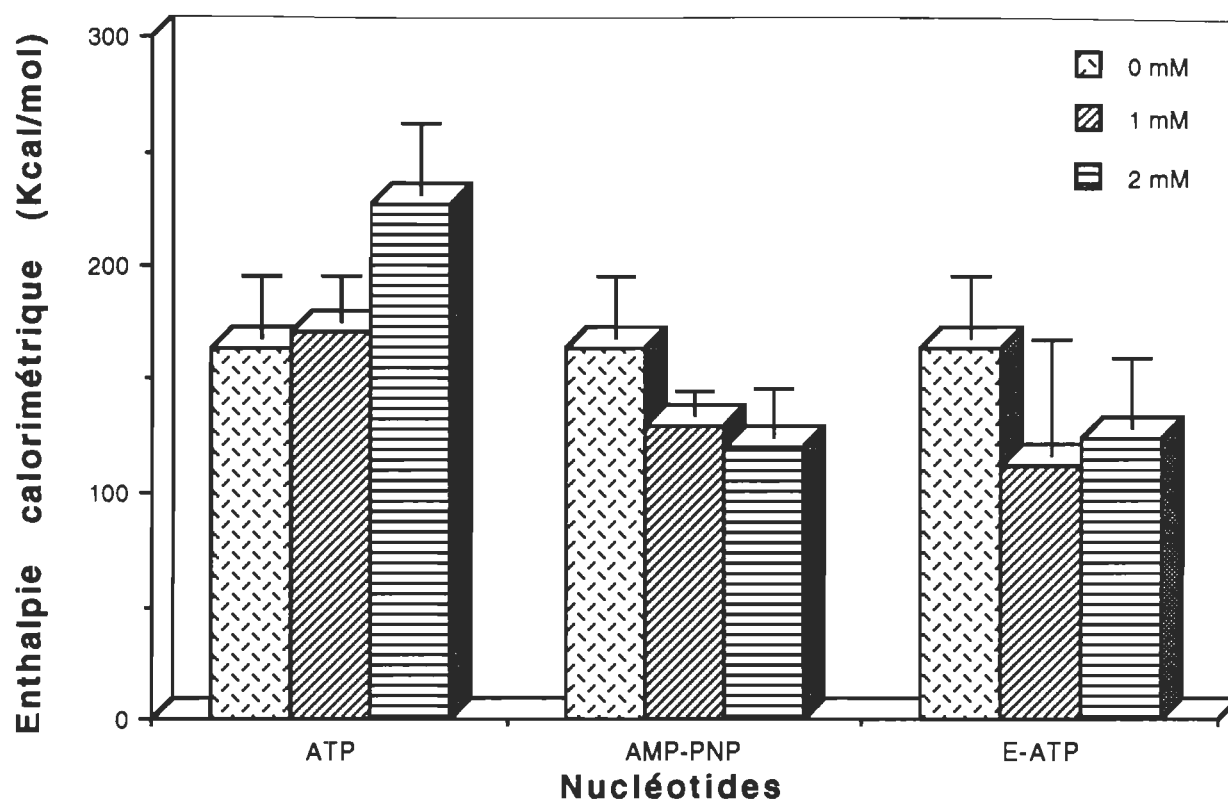


Figure 33: Effet de différentes concentrations d'ATP et de ses analogues non-hydrolysables sur l'enthalpie calorimétrique de l'actine-F. La concentration de l'actine-F est de 3 mg/ml. Les concentrations de nucléotides sont indiquées dans le coin supérieur droit.

3.4 Résumé des résultats

Nous présentons ici un tableau qui donne l'ensemble des résultats obtenus par calorimétrie différentielle à balayage et qui permet de comparer l'effet des différents nucléotides et leurs analogues, sur l'actine.

Nucléotide	conc. (mM)	T _m (°C)	ΔH (Kcal/mol)
ATP	0	69.6 ± 0.4	163 ± 28
	1	73.1 ± 1.7	171 ± 20
	2	74.9 ± 0.4	227 ± 31
	5	75.8 ± 0.2	237 ± 21
	15	75.3 ± 0.2	211 ± 10
GTP	0	69.6 ± 0.4	163 ± 28
	2	70.3 ± 0.1	127 ± 1
	5	70.0 ± 0.1	112 ± 2
CTP	0	69.6 ± 0.4	163 ± 28
	2	70.3 ± 0.1	88 ± 1
	5	70.3 ± 0.1	110 ± 2
UTP	0	69.6 ± 0.4	163 ± 28
	2	71.8 ± 0.1	107 ± 6
	5	72.2 ± 0.1	101 ± 1
AMP	0	69.6 ± 0.4	163 ± 28
	2	71.9 ± 0.2	184 ± 4
	5	71.2 ± 0.1	177 ± 13
	15	69.5 ± 0.1	109 ± 4
AMPc	0	69.6 ± 0.4	163 ± 28
	2	69.2 ± 0.1	139 ± 23
	5	68.8 ± 0.1	147 ± 30
	15	66.0 ± 0.1	89 ± 5
Adénosine	0	69.6 ± 0.4	163 ± 28
	2	69.2 ± 0.1	132 ± 5
	5	68.7 ± 0.1	128 ± 2
	15	66.2 ± 0.1	112 ± 4

Nucléotide	conc. (mM)	T _m (°C)	ΔH (Kcal/mol)
ADP	0	69.6 ± 0.4	163 ± 28
	2	71.1 ± 0.9	170 ± 24
	5	71.7 ± 1.0	169 ± 8
	15	70.9 ± 0.2	157 ± 11
AMP-PNP	0	69.6 ± 0.4	163 ± 28
	1	74.0 ± 1.1	129 ± 11
	2	73.9 ± 0.3	120 ± 21
ε-ATP	0	69.6 ± 0.4	163 ± 28
	1	73.5 ± 0.2	112 ± 50
	2	74.6 ± 0.2	124 ± 30
Phosphate inorganique	0	69.6 ± 0.4	163 ± 28
	2	70.7 ± 0.1	121 ± 4
	5	70.5 ± 0.1	135 ± 3
Fluorure de Be	0	69.6 ± 0.4	163 ± 28
	0.1	84 ± 0.4	147 ± 17
Fluorure d'Al	0	69.6 ± 0.4	163 ± 28
	0.1	80.4 ± 0.1	139 ± 1

4. DISCUSSION

4.1 Introduction

La principale contribution de notre travail est d'avoir établi que l'ATP stabilise l'actine contre la dénaturation thermique ainsi que contre l'effet de hautes pressions. Cette stabilisation est spécifique à l'ATP et la présence du troisième phosphate est essentielle à cette stabilisation.

4.2 Critique de certaines techniques

4.2.1 Le FTIR

À l'aide du FTIR à température variable nous avons montré que l'ATP ne stabilisait pas l'actine-F contre la dénaturation thermique. Ce résultat est en contradiction avec les résultats obtenus par DSC qui ont montré que l'ATP stabilise l'actine-F contre la dénaturation thermique.

Une différence importante entre les deux méthodes est que pour le DSC, nous devons utiliser des solutions d'actine peu concentrées (3 mg/ml), tandis que le FTIR implique l'emploi de culots d'actine obtenus par centrifugation. Ce culot est très concentré. Nous l'estimons à 100 à 200 mg d'actine/ml. Ces hautes

concentrations sont nécessaires car les cellules du FTIR ont un parcours optique très faible.

Or l'actine est une ATPase. Plus la concentration d'actine est élevée, plus l'hydrolyse de l'ATP est rapide (2, 113). De plus, comme dans toute réaction enzymatique, la réaction est plus rapide si on augmente la température.

Asai et Tawada (2), qui ont étudié l'activité ATPasique de l'actine-F, ont trouvé que 2.5 mg/ml d'actine hydrolysait 4 μ M d'ATP par minute et ce, à 53°C. À partir de ce résultat, on peut estimer, qu'aux concentrations d'actine et d'ATP utilisées pour le FTIR (de l'ordre de 100 mg d'actine/ml et 10 mM d'ATP), tout l'ATP est complètement hydrolysé en moins d'une heure.

Or, dans les expériences faites par FTIR à température variable, on trace une série de spectres infrarouge à une température donnée. Chaque tracé dure environ 2 minutes et 2 autres minutes sont nécessaires pour équilibrer la température. Il faut donc plus de 3 heures pour atteindre la température de dénaturation de l'actine-F (70°C) et près de 5 heures pour faire l'expérience au complet. Il est donc très probable que tout l'ATP ait été hydrolysé bien avant que l'on atteigne la température de dénaturation. En conséquence, on ne peut pas voir de stabilisation de l'actine par l'ATP avec cette technique puisqu'il n'y a plus d'ATP lors de la dénaturation. Nous ne nous sommes rendus compte de ce problème que lors de l'analyse des résultats. En principe, il aurait été possible de répéter l'expérience, mais en commençant à tracer les spectres infra-rouges un peu avant la température de dénaturation de l'actine soit 55°C. Ceci n'a pas été

possible car cette expérience a été faite à Québec et l'appareil n'est plus disponible.

Par contre, le FTIR à haute pression a permis de mettre en évidence une stabilisation de l'actine par l'ATP alors que cette technique utilise aussi des culots d'actine dont la concentration est très élevée. Il se produit donc sûrement l'hydrolyse d'une partie importante de l'ATP au cours de cette expérience en FTIR à haute pression. Cependant l'expérience est beaucoup plus rapide (2 heures au lieu de 5 heures pour le FTIR à température variable) et elle se fait à température ambiante. L'hydrolyse d'ATP est donc plus lente. Il est donc probable qu'il reste assez d'ATP pour pouvoir stabiliser l'actine au moment de la dénaturation. S'il n'y avait pas eu d'hydrolyse d'ATP au cours de cette expérience, la stabilisation de l'actine aurait été probablement beaucoup plus marquée puisque les concentrations d'ATP auraient été plus élevées.

4.2.2 Le DSC

Le DSC est une technique relativement récente dont les fondements théoriques ont été développés pour des réactions réversibles. De la thermodynamique de réactions réversibles, il a été défini certains paramètres tels que l'enthalpie calorimétrique qui est l'énergie nécessaire à la réaction, la coopérativité qui représente la quantité de molécules qui réagissent simultanément au cours d'une réaction, et la température de transition qui représente la température à laquelle la moitié des molécules ont réagi.

Or, la dénaturation de l'actine est une réaction irréversible. Certains paramètres, en particulier l'enthalpie calorimétrique et la coopérativité n'ont plus nécessairement la même signification que pour les réactions réversibles. Il n'existe que peu d'études sur la calorimétrie des systèmes irréversibles (5, 30, 61) et la signification physique de ces paramètres n'a pas encore été établie de manière satisfaisante. Il nous est donc difficile de préciser quelle est la signification physique de certaines de ces valeurs thermodynamiques.

Dans plusieurs cas, nous avons mentionné un changement dans la forme du termogramme de l'actine-F lorsque celle-ci est en présence d'un nucléotide. Nous serions tenté de faire intervenir un changement de la coopérativité de la réaction de dénaturation de l'actine-F. Or la coopérativité d'une réaction ne peut pas s'appliquer à notre système. La notion de coopérativité est utilisée pour des systèmes réversibles et concerne seulement les petites molécules. La réaction de dénaturation de l'actine-F est une réaction irréversible. De plus, l'actine est une grosse molécule. La notion de coopérativité n'est donc pas applicable. On se contentera donc de dire qu'un changement de la forme du pic de dénaturation de l'actine-F signifie que l'actine-F se dénature différemment.

Cependant, les résultats que nous avons obtenus sont surtout comparatifs. C'est-à-dire que nous avons comparé la température de transition et l'enthalpie calorimétrique de l'actine-F en présence et en absence de nucléotides. Toute modification en présence de nucléotide signifie que ce nucléotide interagit avec l'actine. La température de transition de l'actine représente la température à laquelle se fait la dénaturation de l'actine-F. Elle peut donc être utilisée pour

évaluer la stabilité de la protéine. Une hausse de la température de transition signifie une plus grande stabilité de la protéine et une baisse, une moins grande stabilité. Certains nucléotides, comme l'ATP augmentent l'enthalpie calorimétrique de l'actine, d'autres nucléotides la diminuent. Une augmentation de l'enthalpie calorimétrique signifie qu'il faut fournir plus d'énergie pour dénaturer la protéine, une baisse de l'enthalpie calorimétrique signifie qu'il faut fournir moins d'énergie. Pouvons-nous associer une hausse de l'enthalpie calorimétrique avec la stabilisation thermique d'une protéine? Nous allons tenter de répondre à cette question dans la prochaine section.

4.2.3 Analyse des résultats

À l'aide de différentes techniques, nous avons montré que la présence d'ATP augmente la température de transition thermique de l'actine-F, c'est-à-dire stabilise la protéine. Cet effet est spécifique à l'ATP car les autres nucléotides (GTP, CTP, UTP, ADP, AMP, AMPc et adénosine) ne provoquent que peu d'augmentation de la température de transition de l'actine-F.

La présence du phosphate- γ de l'ATP est nécessaire à la stabilisation de l'actine-F. Ce résultat est celui obtenu avec les nucléotides ADP, AMP, AMPc et adénosine. Ces nucléotides ont la même base que l'ATP, mais le nombre de phosphate varie. Moins le nucléotide est phosphorylé, moins il stabilise l'actine-F. Il est donc évident que le nombre de phosphate du nucléotide joue un rôle fondamental dans la stabilisation de l'actine.

Un deuxième résultat obtenu avec les fluorures de béryllium et d'aluminium permettent de conclure que le phosphate- γ de l'ATP, c'est-à-dire le troisième phosphate du nucléotide, est nécessaire à la stabilisation de l'actine. En effet, les fluorures de béryllium ou d'aluminium, qui sont des analogues structuraux du phosphate inorganique qui occupent la place du phosphate- γ , ont aussi une action stabilisante.

Les résultats obtenus avec les analogues non-hydrolysables de l'ATP soulèvent certaines questions. Pourquoi ne stabilisent-ils pas l'actine-F plus fortement que l'ATP? On devrait s'attendre à des résultats semblables à ceux obtenus avec les fluorures de béryllium et d'aluminium. Si les fluorures de béryllium et d'aluminium sont plus efficaces pour stabiliser l'actine que l'ATP, c'est probablement parce que l'ATP, contrairement aux fluorures de béryllium et d'aluminium, subit une hydrolyse. Pourquoi est-ce que l'AMP-PNP et l' ϵ -ATP ne sont-ils pas plus efficaces que l'ATP? Deux explications peuvent être avancées: premièrement, que l'hydrolyse de l'ATP ne joue aucun rôle dans le phénomène de stabilisation de l'actine-F et deuxièmement, l'affinité de l'AMP-PNP et de l' ϵ -ATP pour le site du nucléotide est plus faible et ne peut compétitionner avec l'ADP ou l'ATP qui reste lié au filament et ne protège que partiellement l'actine contre la dénaturation.

En analysant les résultats, nous remarquons que nous avons trois sortes de nucléotides. Premièrement, l'ATP et, dans une moindre mesure, l'ADP et l'AMP, font augmenter la température de transition et augmenter l'enthalpie calorimétrique de l'actine-F. On peut donc dire qu'ils stabilisent l'actine-F.

Deuxièmement, nous avons l'AMPc et l'adénosine qui diminuent la température de transition et l'enthalpie calorimétrique de l'actine-F, ainsi que le GTP, le CTP, l'AMP et le Pi qui ne modifient pas la température de transition mais font diminuer l'enthalpie calorimétrique de l'actine-F. On peut affirmer que ces nucléotides destabilisent l'actine-F.

Troisièmement, l'AMP-PNP, l' ϵ -ATP et les fluorures de bérillium et d'aluminium font augmenter de façon importante la température de transition mais par contre font diminuer l'enthalpie calorimétrique de l'actine-F. Cela signifie que la dénaturation de l'actine-F, en présence de ces nucléotides, se fait à plus haute température mais demande moins d'énergie pour se dénaturer. Ces nucléotides stabilisent-ils ou destabilisent-ils l'actine-F?

La stabilité d'une protéine dépend plutôt de l'énergie libre (ΔG). Comme on ne peut pas calculer l'énergie libre avec la technique utilisée, nous ne pouvons pas répondre de manière précise à cette question en ce qui concerne cette troisième catégorie de nucléotides.

4.3 Quel site du nucléotide est impliqué dans la stabilisation de l'actine-F?

Selon la littérature, il existe deux sites pour les nucléotides dans le monomère d'actine: un site de haute affinité et un site de basse affinité.

1) Le site de haute affinité se situe à l'intérieur du sillon entre les deux domaines du monomère. Ce site a une haute affinité pour l'ATP et l'ADP (4) et il est très spécifique car il ne lie aucun autre nucléotide. La présence d'ATP ou d'ADP à l'intérieur de ce site est nécessaire pour maintenir le monomère d'actine sous sa forme native (89). C'est à l'intérieur de ce site que se produit l'hydrolyse de l'ATP au cours de la polymérisation.

2) Le site de basse affinité a été caractérisé par Kiessling *et al* (53) et par Hozumi (42, 43, 44). Il s'agit d'un site peu spécifique. D'après Hozumi, l'affinité de ce site serait plus grande pour l'ADP. On peut classer l'affinité des nucléotides pour ce site dans l'ordre suivant: ADP > ATP >> IDP > GDP = UTP. L'AMP et le PPI ne se lient pas à ce site (42, 43, 44).

Kiessling et ses collaborateurs (53) arrivent à une conclusion semblable. Ce site aurait plus d'affinité pour le CTP et l'ITP que pour l'ADP et l'ATP (53). On ne connaît pas de fonction à ce site et il ne semble pas intervenir dans l'hydrolyse d'un nucléotide.

On peut se demander lequel de ces deux sites est impliqué dans la stabilisation de l'actine-F contre la dénaturation thermique et la dénaturation aux hautes pressions. Nos résultats montrent que l'ATP stabilise l'actine-F contre la dénaturation. Cette stabilisation ne se produit qu'avec l'ATP et non avec d'autres NTP, tels que le GTP, l'UTP et le CTP. De plus, en testant les différents dérivés de l'ATP tels que l'ADP, l'AMP, l'AMPc et l'adénosine, nous avons établi que la

présence du troisième phosphate est nécessaire à l'activité du nucléotide. En conséquence, nous pouvons conclure que le site impliqué dans la stabilisation de l'actine-F correspond davantage au site de haute affinité.

Cette conclusion est confirmée par le fait que le phosphate inorganique n'a pas d'activité. Par contre, le fluorure de béryllium et d'aluminium, analogues structuraux du phosphate inorganique, entraînent une très grande stabilisation de l'actine-F. Les analogues structuraux du phosphate inorganique agissent, selon Carlier, au niveau du site de haute affinité (22). Le filament d'actine, après hydrolyse de l'ATP va se retrouver avec des monomères contenant un ADP, le site du phosphate inorganique étant libre pour fixer le fluorure de béryllium ou le fluorure d'aluminium (voir la figure 26). Ces composés restent fortement liés au site de liaison et miment l'effet qu'aurait le phosphate inorganique s'il avait la même affinité que les fluorures de béryllium ou d'aluminium pour ce site.

D'autre part, Hozumi (42, 43) mentionne un changement de conformation de la molécule d'actine lorsque la protéine est liée au site de basse affinité (deuxième site) (42, 43). Ce changement de conformation a été mis en évidence par un changement de susceptibilité de l'actine-F à la protéolyse.

Nos résultats en FTIR ne montrent pas de changement de conformation de l'actine-F lorsqu'elle est en présence d'ATP. Ce résultat nous porte à croire que le site impliqué n'est pas le site de basse affinité mais celui de haute affinité. Cependant, cela n'est pas une certitude car on peut envisager un changement de

conformation qui ne modifierait pas la proportion d'hélices- α et de feuillets- β donc de la bande amide I.

4.4 Hypothèses sur le mécanisme de stabilisation de l'actine

On peut émettre deux hypothèses pour expliquer la stabilisation de l'actine-F par l'ATP.

4.4.1 Déplacement de l'équilibre actine-F \rightleftharpoons G

Il existe l'équilibre suivant entre l'actine-F et l'actine-G .



L'actine-G se dénature à 60°C (61). Lorsque l'actine est en filament elle se dénature à plus haute température c'est-à-dire à 70°C. En conséquence, les monomères d'actine-G vont se dénaturer avant les monomères qui composent le filament. Ceci entraîne un déplacement de l'équilibre vers la dépolymérisation de l'actine comme suit:



La stabilisation de l'actine-F par l'ATP peut s'expliquer par le fait que la présence d'une grande concentration d'ATP augmente la stabilité des extrémités du filament et retarde ainsi la dépolymérisation (13, 15), donc sa dénaturation.



Cette hypothèse est confirmée par les résultats obtenus avec les analogues structuraux du phosphate. Ces composés ont une très grande affinité pour le site du phosphate inorganique situé près de l'ADP dans le site de haute affinité et restent fortement liés à l'intérieur de ce site simulant l'intermédiaire ADP*Pi. Le monomère ayant son site du phosphate inorganique occupé, stabilise aussi les extrémités du filament d'actine, ce qui retarde sa dépolymérisation entraînant une plus grande stabilité thermique du filament d'actine.

4.4.2 Changement de conformation du filament d'actine

La deuxième hypothèse pour expliquer la stabilisation thermique de l'actine-F par l'ATP serait que l'ATP stabilise l'ensemble du filament.

En effet, Janmey et ses collaborateurs (49) ont rapporté que l'actine-F-ADP, fait à partir de monomères d'actine ADP, est plus flexible que l'actine-F-ADP obtenue par polymérisation d'actine-G-ATP, et hydrolyse subséquente de l'ATP. Ces résultats sont essentiellement obtenus par l'observation des filaments au microscope électronique. D'autres chercheurs, Frieden et Patane (34), Hill et Kirschner (40) et Oosawa (72) ont aussi observé, par fluorescence, des changements de conformation de l'actine en présence d'ATP. Ils concluent que l'ATP induirait un changement de conformation du filament d'actine qui serait alors plus stable. Le changement de conformation de l'actine-F provoqué par l'ATP est assez important puisqu'il peut être observé par microscope électronique (49) et par des changements de fluorescence du filament (34).

Au cours de nos expériences, nous n'avons pas observé de changement de conformation important de l'actine-F détectable à l'aide du FTIR, ce qui signifie que le changement de conformation que nous avons observé en présence d'ATP est différent de celui reporté par les auteurs précédents et que, par conséquent, la stabilisation de tout le filament, dans nos conditions expérimentales, est peu probable.

4.5 La stabilisation de l'actine-F par l'ATP joue-t-elle un rôle *in vivo*?

Nous avons montré que la stabilisation de l'actine-F par l'ATP se fait à des concentrations de l'ordre du millimolaire, c'est-à-dire des concentrations qui

existent dans les cellules. On peut donc envisager la possibilité que l'actine soit stabilisée, *in vivo*, par l'ATP et que cela puisse correspondre à une fonction.

Aucun rôle de la stabilisation de l'actine-F par l'ATP n'a été proposé précédemment. Nous avons mis en évidence que l'actine est plus résistante à la dénaturation thermique et à la dénaturation aux hautes pressions en présence d'ATP. Ce phénomène nous permet d'émettre l'hypothèse que l'actine existe sous deux états différents:

- Un état "plus stable" en présence d'ATP.
- Et un état "moins stable" en absence d'ATP.

Dans les cellules, l'actine se retrouverait dans l'état "plus stable" puisque la concentration d'ATP cellulaire est élevée. L'actine serait alors en état d'effectuer un travail mécanique. Une hypothèse séduisante serait de relier la stabilisation de l'actine par l'ATP aux travaux de Schutt et Lindberg (84). Ces auteurs ont émis l'hypothèse que le filament d'actine peut jouer un rôle actif dans la contraction musculaire. Ceci implique que l'actine-F existe sous deux états conformationnels. La première conformation est dite hélicoïdale. C'est sous cette conformation que l'on retrouve généralement le filament d'actine. La deuxième conformation est dite en ruban qui serait une double hélice détortillée. Le filament d'actine, en passant de la configuration hélicoïdale à la configuration en ruban crée un mouvement de vis qui va faire se déplacer le filament sur les têtes de myosine et provoquer ainsi la contraction musculaire. L'ATP pourrait jouer un rôle dans le changement de

conformation de l'actine en fournissant l'énergie nécessaire à cette transformation. La base de leur théorie repose sur l'observation de cristaux d'actine filamenteuse au moyen de la diffraction des rayons X.

Par contre, cette hypothèse n'a jamais reçu de confirmation et notre travail ne permet pas d'appuyer directement l'hypothèse de Schutt et Lindberg.

5. CONCLUSIONS

Les résultats présentés dans ce travail montrent que:

1) L'actine est stabilisée par l'ATP. En effet, en présence d'ATP, l'actine possède une plus grande résistance à la dénaturation thermique et à la dénaturation aux hautes pressions.

2) La stabilisation de l'actine est spécifique à l'ATP. Les autres nucléotides (GTP, CTP, UTP, ADP, AMP, AMPc et adénosine) sont moins efficaces que l'ATP sur la résistance à la dénaturation de la protéine.

3) La présence du phosphate- γ de l'ATP est nécessaire à la stabilisation de l'actine mais l'hydrolyse de l'ATP ne joue aucun rôle.

4) Le site de liaison du monomère d'actine impliqué dans cette stabilisation correspond d'avantage au site de haute affinité des nucléotides plutôt qu'au site de base affinité identifié par Hozumi (42, 43, 44) et Kiessling (53) car ce dernier n'est pas spécifique à l'ATP.

5) La stabilisation de l'actine par l'ATP ne semble pas provoquer de changement au niveau de la structure secondaire de la protéine.

6) Enfin, la stabilisation se fait à des concentrations compatibles avec celles *in vivo*. On peut donc envisager la possibilité que cet effet de l'ATP soit relié à une fonction cellulaire.

6. RÉFÉRENCES

- 1) Adelstein, R.S. et Eisenberg, E. *Regulation and kinetics of the actin-myosin-ATP interaction.* Ann. Rev. Biochem., 1980, **49**, 921-956.
- 2) Asai, H. et Tawada, K. *Enzymic nature of F-actin at high temperature.* J. Mol. Biol., 1966, **20**, 403-417.
- 3) Barber, B.H. et Crumpton, M.J. *Actin associated with purified lymphocyte plasma membrane.* FEBS Letters, 1976, **66**, 215-220.
- 4) Barden, J.A.; Curmi, P.M.G. et Dos Remedios, C.G. *Crystalline actin tubes. The effect of the Th^{4+} on actin and the role of ionic charge in tube formation.* J. Biochem., 1982, **92**, 1319-1323.
- 5) Bertazzon, A.; Tian, G.H; Lamblin, A. et Tian Yow Tsong. *Enthalpic and entropic contributions to actin stability: Calorimetry, circular dichroism, and fluorescence study and effects of calcium.* Biochemistry, 1990, **29**, 291-298.
- 6) Bigay, J.; Deterre, P.; Pfister, C. et Chabre, M. *Fluoride complexe of aluminum or beryllium G-proteins as reversibly bound analogues of the γ phosphate of GTP.* EMBO J., 1987, **6**, 2907-2913.
- 7) Blikstad, I.; Markey, F.; Carlson, L.; Persson, T. et Lindberg, U. *Selective assay of monomeric and filamentous actin in cell extracts, using inhibition of deoxyribonuclease I.* Cell, 1978, **15**, 935-943.
- 8) Bonder, E.M.; Fishkind, J. et Mooseker, M.S. *Direct measurement of critical concentrations and assembly rate constants at the two ends of an actin filament.* Cell, 1983, **34**, 491-501.

- 9) Bray, D. et Thomas, C. *Unpolymerized actin in fibroblast and brain*. J. Mol. Biol., 1976, **105**, 527-544.
- 10) Bretscher, A. et Weber, K. *Isolation of actin and microfilament-associated proteins in the microvilli and terminal web of the intestinal brush border by immuno-fluorescence microscopy*. J. Cell Biol., 1978, **79**, 839-845.
- 11) Burridge, K. et Phillips, J.H. *Association of actin and myosin with secretory granule membranes*. Nature, 1975, **254**, 526-529.
- 12) Carlier, M.F. *Measurement of Pi dissociation from actin filaments following ATP hydrolysis using a linked enzyme assay*. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1987, **143**, 1069-1075.
- 13) Carlier, M.F. *Actin polymerization and ATP hydrolysis*. Adv. Biophys., 1990, **26**, 51-73.
- 14) Carlier, M.F. *Actin: protein structure and filament dynamics*. J. Biol. Chem., 1991, **266**, 1-4.
- 15) Carlier, M.F. *Nucleotide hydrolysis regulates the dynamics of actin filaments and microtubules*. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B., 1992, **336**, 93-97.
- 16) Carlier, M.F.; Didry, D.; Melki, R.; Chabre, M. et Pantaloni, D. *Stabilization of microtubules by inorganic phosphate and its structural analogues, the fluoride complexes of Aluminum and Beryllium*. Biochemistry, 1988, **27**, 3555-3559.
- 17) Carlier, M.F. et Pantaloni, D. *Direct evidence for ADP-Pi-F-actin as the major intermediate in ATP-actin polymerization. Rate of dissociation of Pi from actin filaments*. Biochemistry, 1986, **25**, 7789-7792.

- 18) Carlier, M.F. et Pantaloni, D. *Binding of phosphate to F-ADP-actin and role of F-ADP-Pi-actin in ATP-actin polymerization.* J. Biol. Chem., 1988, **263**, 817- 825.
- 19) Carlier, M.F.; Pantaloni, D.; Evans, J.A.; Lambooy, P.K.; Korn, E.D. et Webb, M.R. *The hydrolysis of ATP that accompanies actin polymerization is essentially irreversible.* FEBS Letters, 1988, **235**, 211-214.
- 20) Carlier, M.F.; Pantaloni, D. et Korn, E.D. *Evidence for an ATP cap at the ends of actin filaments and its regulation of the F-actin steady state.* J. Biol. Chem., 1984, **259**, 9983-9986.
- 21) Carlier, M.F.; Pantaloni, D. et Korn, E.D. *Polymerization of ADP-actin and ATP-actin under sonication and characteristics of the ATP-actin equilibrium polymer.* J. Biol. Chem., 1985, **260**, 6565-6571.
- 22) Combeau, C. et Carlier, M.F. *Probing the mechanism of ATP hydrolysis on F-actin using vanadate and the structural analogs of phosphate BeF_3^- and AlF_4^- .* J. Biol. Chem., 1988, **263**, 17429-17436.
- 23) 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.
- 24) Cooke, R. *The role of the bound nucleotide in the polymerization of actin.* Biochemistry, 1975, **14**, 3250-3256.
- 25) Dancker, P. *Stabilization of actin filaments by ATP and inorganic phosphate.* Z. Naturforsch., 1989, **44c**, 698-704.
- 26) 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.

- 27) Dousseau, F. et Pézolet, M. *Determination of the secondary structure content of proteins in aqueous solutions from their amide I and amide II infrared bands. Comparaison between classical and partial least-squares methods.* Biochemistry, 1990, **29**, 8771-8779.
- 28) Eckert, B.S. et McGee-Russel, S.M. *The patterned organization of thick and thin microfilaments in the contracting pseudopod of Dictyostelium.* J. Cell Sci., 1973, **13**, 727-739.
- 29) 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.
- 30) Fausnaugh, J.L; Blazyk, J.F.; El-Saleh, S.C. et Johnson, P. *Calorimetric studies on monomeric and polymeric actin.* Experimentia, 1984, **40**, 83-84.
- 31) Fox, J.E. *Identification of actin-binding protein as the protein linking the membrane skeleton to glycoprotein on platelet plasma membranes.* J. Biol. Chem., 1985, **260**, 11970-11977.
- 32) 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.
- 33) Frieden, C. *Actin and tubulin polymerization: the use of kinetic methods to determine mechanism.* Ann. Rev. Biophys. Chem., 1985, **14**, 189-210.
- 34) Frieden, C. et Patane, K. *Differences in G-actin containing bound ATP or ADP: The Mg^{2+} -induced conformational change requires ATP.* Biochemistry, 1985, **24**, 4192-4196.
- 35) 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.

- 36) Gershman, L.C.; Selden, L.A.; Kinosian H.J. et Estes, J.E. *Preparation and polymerization properties of monomeric ADP-actin*. Biochim. Biophys. Acta, 1989, **995**, 109-115.
- 37) Grazi, E.; Ferri, A. et Cino, S. *The polymerization of actin. A study of the nucleation reaction*. Biochem. J., 1983, **213**, 727-732.
- 38) Hanson, J., Abstr. 7th Int. Cong. Biochem., Tokyo, 1976 II-327; Sym. Biol. Hung., 1976, **8**, 99.
- 39) Heacock, C.S. et Bamburg, J.R. *Levels of filaments and globular actin in chinese hamster ovary cells through-out the cell cycle*. Exp. Cell Res., 1983, **147**, 240-246.
- 40) Hill, T.L. et Kirschner, M.W. *Subunit treadmilling of microtubules or actin in the presence of cellular barriers: Possible conversion of chemical free energy into mechanical work*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1982, **79**, 490-494.
- 41) Hirokawa, S et Tilney, L.G. *Interaction between actin filaments and membranes in quick frozen and deeply etched hair cells of chick ear*. J. Cell Biol., 1982, **95**, 249-261.
- 42) Hozumi, T. *Structural aspects of skeletal muscle F-actin as studied by tryptic digestion: Evidence for a second nucleotide interacting site*. J. Biochem., 1988a , **104**, 285-288.
- 43) Hozumi, T. *Structural aspects of skeletal muscle G-actin molecule as studied by proteolytic digestion: Effect of nucleotide*. Biochem. International, 1988b **17**, 171-178.

- 44) Hozumi, T. *A hydrophobicity on skeletal muscle actin molecule modulated by nucleotide binding at a second site*. Biochem. International, 1990, **20**, 45-51.
- 45) Huxley, H.E. *Electron microscope studies on the structure of natural and synthetic protein filaments from striated muscle*. J. Mol. Biol., 1963, **7**, 281-308.
- 46) Ikeuchi, Y.; Ito, T. et Fukazawa, T. *A kinetic analysis of thermal denaturation of F-actin*. Int. J. Biochem., 1981, **13**, 1065-1069.
- 47) Ikeuchi, Y.; Iwamura, K.; Machi, T.; Kaimoto, T. et Suzuki, A. *Instability of F-actin in the absence of ATP: A small amount of myosin destabilizes F-actin*. J. Biochem., 1992, **111**, 606-613.
- 48) Ikeuchi, Y.; Iwamura, K. et Suzuki, A. *Heat denaturation of rabbit skeletal G-actin in the presence of ATP*. J. Sci. Food Agric., 1990, **50**, 287-296.
- 49) Janmey, P.A.; Hvidt, S.; Oster, G.F.; Lamb, J.; Stossel, T.P. et Hartwig, J.H. *Effect of ATP on actin filament stiffness*. Nature, 1990, **347**, 95-99.
- 50) Jeon, K.W. et Jeon, M.S. *Cytoplasmic filaments and cellular wound healing in Amoeba proteus*. J. Cell Biol., 1975, **67**, 243-249.
- 51) Kabsch, W. et Vandekerckhove, J. *Structure and function of actin*. Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 1992, **21**, 49-76.
- 52) Kasai, M.; Nakano, E. et Oosawa, F. *Polymerization of actin free from nucleotides and divalent cations*. Biochim. Biophys. Acta, 1965, **94**, 494-503.
- 53) Kiessling, P.; Polzar, B. et Mannherz, H.G. *Evidence that the presumptive second nucleotide interacting site on actin is of low specificity and affinity*. Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 1993, **374**, 183-192.

- 54) Kondo, H. et Ishiwata, S. *Unidirectional growth of F-actin*. J. Biochem., 1976, **79**, 159-171.
- 55) Konno, K. *G-actin structure revealed by chymotryptic digestion*. J. Biochem., 1988, **103**, 386-392.
- 56) Korn, E.D. *Biochemistry of actomyosin-dependant cell motility (a review)*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1978, **75**, 588-599.
- 57) Korn, E.D. *Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells*. Physiological Reviews, 1982, **62**, 672-737
- 58) Korn, E.D.; Carlier, M.F. et Pantaloni, D. *Actin polymerization and ATP hydrolysis*. Science, 1988, **238**, 638-644.
- 59) Lal, A.A. et Korn, E.D. *Reinvestigation of the inhibition of actin polymerization by profilin*. J. Biol. Chem., 1985, **260**, 10132-10138.
- 60) 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.
- 61) Le Bihan, T. *Approche cinétique de la dénaturation thermique de l'actine: Contribution expérimentale et théorique*. Thèse de maîtrise en biophysique, UQTR, 1993.
- 62) Le Tilly, V., Sire, O., Alpert, B. et Wong, P. *An infrared study of ^2H -bond variation in myoglobin revealed by high pressure*. Eur. J. Biochem., 1992, **205**, 1061- 1065
- 63) Mannherz, H.G. et Goody, R.S. *Proteins of contractile systems*. Ann. Rev. Biochem., 1976, **45**, 427-465.

- 64) Martonosi, A.; Molino, C.M.; Gergely, J. *The binding of divalent cations to actin*. J. Biol. Chem., 1964, **239**, 1057-1064.
- 65) Maruta, S.; Henry, G.D.; Sykes, B.D. et Ikebe, M. *Formation of the stable myosin-ADP-Aluminum Fluoride and myosin-ADP-Beryllium Fluoride complexes and their analysis using ^{19}F NMR*. J. Biol. Chem., 1993, **268**, 7093-7100.
- 66) Maruyama, K. et Tsukagoshi, K. *Effects of KCl, MgCl_2 and CaCl_2 concentrations on the monomer-polymer equilibrium of actin in the presence and absence of cytochalasin D*. J. Biochem., 1974, **96**, 605-614.
- 67) Mesland, D.A.M.; Spiele, H. et Roos, E. *Membrane associated cytoskeleton and coated vesicles in cultured hepatocytes visualized by dry cleaving*. Exp. Cell Res., 1981, **132**, 169-184.
- 68) 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.
- 69) 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.
- 70) Neuhaus, J.M.; Wanger, M.; Keiser, T. et Wegner, A. *Treadmilling of actin*. J. Muscle Res. Cell Motility, 1983, **4**, 507-527.
- 71) 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.
- 72) Oosawa, F. *Actin-actin bond strength and the conformational change of F-actin*. Biorheology, 1977, **14**, 11-19.

- 73) 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.
- 74) 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.
- 75) Pantaloni, D.; Carlier M.F.; Coué, M.; Lal, A.A.; Brenner, S.L. et Korn, E.D. *The critical concentration of actin in the presence of ATP increases with the number concentration of filaments and approaches the critical concentration of actin-ADP*. J. Biol. Chem., 1984, **259**, 6274-6283.
- 76) Pardee, J. et Spudich, J. *Purification of muscle actin*. Methods in Enzymology, 1982, **85**, 164-181
- 77) Parker, F. *Application of infrared spectroscopy in biochemistry, biology and medicine*. Plenum, New-York, 1971, 188-231
- 78) Pollard, T.D. *Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments*. J. Cell Biol., 1986, **103**, 2747-2754.
- 79) 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.
- 80) Pollard, T.D. et Mooseker, M.S. *Direct measurement of actin polymerization rate constants by electron microscopy of actin filaments nucleated by isolated microvillus cores*. J. Cell Biol., 1981, **88**, 654-659.
- 81) Riechstein, E. et Korn, E.D. *Acanthamoeba profilin*. J. Biol. Chem., 1979, **254**, 6174-6179.

- 82) Rich, S.A. et Estes, J.E. *Direction of conformational changes in actin proteolytic digestion: evidence for a new monomeric species.* J. Mol. Biol., 1976, **104**, 777-792.
- 83) Schroeder, T.E. *Actin in dividing cells: contractile ring filaments bind heavy meromyosin.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1973, **70**, 1688-1692.
- 84) Schutt, C.E. et Lindberg, U. *Actin as the generator of tension during muscle contraction.* Proceeding of the national academy of sciences of the U.S.A., 1992, 89, 319-323
- 85) 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.
- 86) Smith, P.R. *Towards and alignment of the actin molecule within the actin filament.* Ultramicroscopy, 1984, **13**, 113-123.
- 87) Stendahl, O.T. et Stossel, T.P. *Actin-binding protein amplifies actomyosin contraction, and gelsolin confers calcium control on the direction of contraction.* Biochem. Biophys. Res. Comm., 1980, **92**, 675-681.
- 88) Straub, F.B. *Actin.* Stud. Inst. Med. Chem. Univ. Szeged, 1942, **2**, 3-16.
- 89) 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.
- 90) Strzelecka-Golaszewska, H.; Prochniewicz, E. et Drabikowski, W. *Interaction of actin with divalent cations. 1. The effect of various cations on the physical state of actin.* Eur. J. Biochem., 1978a, **88**, 219-227.

- 91) Strzelecka-Golaszewska, H.; Prochniewicz, E. et Drabikowski, W. *Interaction of actin with divalent cations. 2. Characterization of protein-metal complexes.* Eur. J. Biochem., 1978b, **88**, 229-237.
- 92) Stull, J.T. *Phosphorylation of contractile proteins in relation to muscle function.* Adv. Cyclic Nucleotide Res., 1980, **113**, 39-93.
- 93) Susi, H. *Structure and stability of biological macromolecules.* Timasheff, S. and Fasman, G. Edts, Marcel Dekker, New-York, 1969, 575-663.
- 94) Swanston-Flatt, S.K.; Carlsson, L. et Gylfe, E. *Actin filament formation in pancreatic β -cells during glucose stimulation of insulin secretion.* FEBS Letters, 1980, **117**, 299-302.
- 95) 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.
- 96) Tellam, R. *Mechanism of calcium chloride induced actin polymerization.* Biochemistry, 1985, **24**, 4455-4460.
- 97) Tilney, L.G. *Polymerization of actin. V. A new organelle, the actomere, that initiates the assembly of actin filaments in Thyone sperm.* J Cell Biol., 1978, **77**, 551-564.
- 98) Tilney, L.G. et Inoue, S. *Acrosomal reaction of Thyone sperm. I. Changes in the sperm head vizualized by high resolution video microscopy.* J. Cell Biol., 1982, **93**, 812-819.
- 99) Tilney, L.G. et Kallenbach, N. *Polymerization of actin. VI. The polarity of the actin filaments in the acrosomal process and how it might be determined.* J. Cell Biol., 1979, **81**, 608-623.
- 100) Tobacman, L. et Korn, E.D. *The kinetics of actin nucleation and polymerization.* J. Biol. Chem., 1983, **258**, 3207-3214.

- 101) Tuszyndki, G.P.; Daniel, J.L. et Stewart, G. *Association of protein with platelet cytoskeleton*. Seminars in Hematology, 1985, **22**, 303-312.
- 102) Valentin-Ranc, C. et Carlier, M.F. *Evidence for the direct interaction between tightly bound divalent metal ion and ATP on actin*. J. Biol. Chem., 1989, **264**, 20871-20880.
- 103) 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.
- 104) Wanger, M.; Kieser, T.; Neuhaus, J.M. et Wegner, A. *The actin treadmill*. Can. J. Biochem., 1985, **63**, 414-421.
- 105) Wegner, A. *Head to tail polymerization*. J. Mol. Biol., 1976, **108**, 139-150.
- 106) 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.
- 107) Wegner, A. et Engel, J. *Kinetics of the cooperative association of actin to actin filaments*. Biophys. Chem., 1975, **3**, 215-225.
- 108) Werber M.M.; Peyser Y.M. et Muhlrads, A. *Characterization of stable beryllium fluoride, aluminum fluoride, and vanadate containing myosin subfragment 1-nucleotide complexes*. Biochemistry, 1992, **31**, 7190-7197.
- 109) Wong, P. *High-pressure chemistry and biochemistry*. NATO ASI (Adv. Sci. Inst.), 1987, Ser. C, Math. Sci., **197**, 381-400.

- 110) Wong, P., Moffat, D. et Beaudais, F. *Crystalline quartz as an internal pressure calibrant for high-pressure infrared spectroscopy*. Appl. Spectrosc., 1985, **39**, 733-735.
- 111) Woodrum, D.T.; Rich, S.A.; Pollard, T.D. *Evidence for biased bidirectional polymerization of actin filaments using heavy meromyosin prepared by an improved method*. J. Cell Biol., 1975, **67**, 231-235.
- 112) Yin, H.L. et Stossel, T.P. *Control of cytoplasmic actin gel-sol transformation by gelosin, a calcium-dependent regulatory protein*. Nature (London), 1979, **281**, 583-586.
- 113) Zimmerle, C.T. et Frieden, C. *Effect of temperature on the mechanism of actin polymerization*. Biochemistry, 1986, **25**, 6432-6438.
- 114) Zimmerle, C.T.; Patane, K. et Frieden, C. *Divalent cation binding to the high- and low-affinity sites on G-actin*. Biochemistry, 1987, **26**, 6545-6552.