

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIERES

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

Comme exigence partielle
de la maîtrise en biophysique

Par

Jean-François Comtois

EFFET DES TETES POLAIRES DES PHOSPHOLIPIDES SUR
L'INTERACTION ENTRE L'ACTINE ET LES LIPIDES
MEMBRANAIRES: UNE ÉTUDE PAR CALORIMÉTRIE
DIFFÉRENTIELLE À BALAYAGE ET MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE.

Décembre 1994

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

Il est généralement admis dans la littérature que l'actine est ancrée aux membranes via des protéines transmembranaires. Cependant, des études effectuées dans notre laboratoire ont montré que l'actine interagit aussi de façon directe avec les lipides. L'hypothèse qui a été suggérée est que l'interaction de l'actine avec les lipides est de nature électrostatique et nécessite la présence de cations divalents.

Selon ce mécanisme, la tête polaire des phospholipides joue un rôle déterminant dans l'interaction actine-lipides. Le but de ce travail est d'étudier l'influence de la tête polaire sur l'interaction entre l'actine et les lipides membranaires. Pour ce faire, nous avons étudié l'interaction actine-lipides par calorimétrie différentielle à balayage (DSC) et par microscopie électronique en utilisant un système *in vitro*, composé d'actine purifiée et de membranes artificielles, les liposomes. Nos résultats montrent que:

1. Il y a une interaction directe entre l'actine-F et les liposomes neutres formés de DMPC ou d'un mélange de DMPC:DMPE (1:1). Cette interaction se traduit par la formation de paracristsaux d'actine-F à la surface des liposomes. La présence de cations divalents est nécessaire à l'interaction. Par contre, elle est inhibée par les cations monovalents.
2. Par ailleurs, nous avons mis en évidence un effet des liposomes anioniques, formés d'un mélange de DMPC:DMPS (1:1) ou de DMPC:DMPG (1:1), sur l'actine. Ces lipides entraînent une désorganisation de l'actine qui se trouve alors sous forme d'agrégats. Deux hypothèses pourraient expliquer la formation d'agrégats d'actine:

- a) Un effet indirect des phospholipides sur l'actine. Selon cette hypothèse, il y aurait captation des cations divalents par les charges négatives des phospholipides, ce qui provoquerait une diminution de la concentration des cations libres dans le milieu et, par conséquent, une dépolymérisation de l'actine.
 - b) Un effet détergent des phospholipides. Les lipides agiraient comme un savon en se fixant sur les parties hydrophobes de l'actine, empêchant ainsi l'agrégation des résidus exposés lors de la dénaturation de la protéine. Il est à noter que cette hypothèse n'implique pas une dépolymérisation des filaments d'actine.
3. Les résultats obtenus avec les liposomes chargés négativement, formés de DMPC:DMPA (1:1), montrent qu'il y a une interaction directe avec l'actine-F. Cette interaction est similaire à celle observée entre l'actine et les lipides neutres. L'interaction est probablement due aux molécules de DMPC.
 4. Les expériences effectuées avec les liposomes non-chargés, formés de DGDG, ne montrent aucune interaction avec l'actine. Ces résultats appuient donc le modèle proposé, à savoir que l'interaction actine-lipides est de nature électrostatique.

Dans l'ensemble, les résultats montrent que la nature de la tête polaire des phospholipides influence l'interaction actine-lipides. L'existence de ces interactions actine-lipides dans les membranes naturelles semble possible. Les domaines de lipides formés *in vivo* pourraient servir de sites d'ancrage de l'actine-F.

REMERCIEMENTS

Un travail de recherche est souvent long et difficile et, parfois même, pénible. Cependant, un travail de cette envergure ne se fait pas tout à fait seul et je tiens ici à remercier les personnes qui ont contribué de près ou de loin à ce travail.

D'abord, je suis obligé de remercier mon directeur de recherche, Claude Gicquaud, puisque tous les gens avant moi l'ont fait. Claude, je tiens à te dire sincèrement: MERCI BEAUCOUP!

Je tiens également à remercier tous mes collègues de laboratoire que j'ai côtoyés au cours de ces deux années. Plus particulièrement, je ne veux pas oublier les Nicolas Cermakian, Hélène Bombardier, Pierre Lavigne ainsi que le très grand Jean Désilet pour leur aide et leurs précieux conseils.

Je ne veux pas passer sous silence l'apport de mes parents qui m'ont toujours encouragé et supporté (surtout au hockey!). Enfin, je dois remercier ma compagne Chantale car elle m'a menacé de me quitter si je ne le faisais pas. Merci pour tes délicieux repas et tes talents artistiques, et surtout pour tout le bonheur que tu m'apportes.

TABLE DES MATIERES

	Page
Résumé	i
Remerciements.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des figures.....	x
Liste des tableaux	x v
1. INTRODUCTION.....	1
1.1- L'actine et ses propriétés physico-chimiques.....	1
1.1.1- Actine-G.....	1
1.1.2- Actine-F.....	2
1.1.3- Polymérisation de l'actine.....	3
1.1.4- Paracristsaux d'actine.....	5
1.2- L'actine dans les cellules.....	6
1.3- Protéines liant l'actine à la membrane.....	8
1.4- Interactions protéines-lipides.....	10
1.5- Interaction directe entre l'actine et les lipides membranaires.....	12

1.5.1- Mécanisme proposé pour expliquer l'interaction directe actine-lipides membranaires.....	14
1.6- Objectifs du projet de maîtrise.....	16
1.6.1- Justification du choix des lipides pour étudier l'influence de la tête polaire sur l'interaction directe entre l'actine et les liposomes.....	17
2. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	22
2.1- Liste des produits chimiques.....	22
2.2- Solution tampon.....	22
2.3- Préparation des liposomes.....	23
2.4- Préparation de l'actine.....	25
2.5- Techniques de mesure de l'interaction entre l'actine et les liposomes.....	25
2.5.1- Calorimétrie différentielle à balayage (DSC).....	25
i) La transition de phase des phospholipides.....	29
ii) Effet de la température sur les protéines.....	31
iii) Manipulations pour la technique de DSC.....	32
2.5.2- Microscopie électronique.....	33

3. RÉSULTATS.....	3 4
3.1- Interaction de l'actine-F avec les liposomes composés seulement de DMPC ou d'un mélange de DMPC:DMPE (1:1).....	3 5
3.1.1- Étude de l'interaction actine-liposomes composés seulement de DMPC ou d'un mélange de DMPC:DMPE (1:1) par calorimétrie différentielle à balayage (DSC).....	3 5
i) En absence de cations monovalents.....	3 5
ii) Effet des cations monovalents sur l'interaction actine-liposomes neutres.....	3 9
3.1.2- Étude de l'interaction actine-liposomes composés seulement de DMPC ou d'un mélange de DMPC:DMPE (1:1) par microscopie électronique.....	4 8
i) En absence de cations monovalents.....	4 8
ii) Effet des cations monovalents sur l'interaction actine-liposomes neutres.....	5 0
3.2- Interaction de l'actine-F avec les liposomes composés d'un mélange de DMPC:DMPS (1:1) ou d'un mélange de DMPC:DMPG (1:1).....	5 3
3.2.1- Étude de l'interaction actine-liposomes composés d'un mélange de DMPC:DMPS ou d'un mélange de DMPC:DMPG (1:1) par DSC.....	5 3

i) En absence de cations monovalents.....	5 3
ii) Effet des cations monovalents sur l'interaction entre l'actine et les liposomes composés d'un mélange de DMPC:DMPS (1:1) ou de DMPC:DMPG (1:1).....	5 9
3.2.2- Étude de l'interaction actine-liposomes composés d'un mélange de DMPC:DMPS (1:1) ou de DMPC:DMPG (1:1) par microscopie électronique.....	6 8
i) En absence de cations monovalents.....	6 8
ii) Effet des cations monovalents sur l'interaction entre l'actine et les liposomes composés d'un mélange de DMPC:DMPS (1:1) ou de DMPC:DMPG (1:1).....	6 9
3.3- Interaction de l'actine-F avec les liposomes composés d'un mélange de DMPC:DMPA (1:1).....	7 1
3.3.1- Étude de l'interaction entre l'actine-F et les liposomes composés d'un mélange de DMPC:DMPA (1:1) par DSC.....	7 1
i) En absence de cations monovalents.....	7 1
ii) Effet des cations monovalents sur l'interaction entre l'actine et les liposomes composés d'un mélange de DMPC:DMPA (1:1).....	7 5

3.3.2- Étude de l'interaction entre l'actine-F et les liposomes composés d'un mélange de DMPC:DMPA (1:1) par microscopie électronique.....	8 0
i) En absence de cations monovalents.....	8 0
ii) Effet des cations monovalents sur l'interaction entre l'actine et les liposomes composés d'un mélange de DMPC:DMPA (1:1).....	8 1
3.4- Interaction de l'actine-F avec les liposomes non-chargés composés seulement de DGDG.....	8 3
3.4.1- Étude par DSC de l'interaction entre l'actine-F et les liposomes non-chargés composés seulement de DGDG.....	8 3
3.4.2- Étude par microscopie électronique de l'interaction entre l'actine-F et les liposomes non-chargés composés seulement de DGDG.....	8 5
3.5- Résumé des résultats.....	8 8
4. DISCUSSION.....	8 9
4.1- Critique des techniques utilisées.....	8 9
4.1.1- Méthode de préparation des liposomes.....	8 9
4.1.2- Calorimétrie différentielle à balayage (DSC).....	9 0
4.1.3- Microscopie électronique.....	9 3

4.2- Analyse des résultats.....	94
4.2.1- Analyse des résultats obtenus avec les lipides neutres (DMPC et DMPE).....	94
4.2.2- Analyse des résultats obtenus avec les lipides anioniques (DMPS et DMPG).....	99
4.2.3- Analyse des résultats obtenus avec le DMPA.....	106
4.2.4- Analyse des résultats obtenus avec le DGDG.....	109
4.3- Implication <i>in vivo</i> des interactions actine-lipides membranaires.....	110
5. CONCLUSIONS	112
Références.....	114

LISTE DES FIGURES

Figures	Page
1. Structure tertiaire de l'actine-G.....	2
2. Structure de l'actine-F.....	3
3. Modèle de liaison de l'actine à la membrane de l'épithélium intestinal des bordures en brosse de l'intestin.....	7
4. Modèle de liaison de l'actine à la membrane des globules rouges.....	10
5. Représentation des divers types d'interaction protéines-lipides.....	11
6. Modèle d'interaction directe entre l'actine et les bicouches phospholipidiques.....	15
7a. Structure moléculaire des phospholipides neutres (DMPC et DMPE).....	19
7b. Structure moléculaire des phospholipides anioniques (DMPS, DMPG et DMPA).....	20
7c. Structure moléculaire du DGDG.....	21
8. Représentation schématique des boucles de contrôle du DSC.....	27
9. Thermogramme idéal.....	29

10. Représentation de la transition de phase d'une bicouche phospholipidique.....	3 0
11. Thermogrammes d'une solution d'actine seule, de liposomes composés de DMPC et du mélange actine-liposomes.....	3 6
12. Thermogrammes du mélange actine-liposomes composés de DMPC en présence d'une concentration croissante de KCl.....	3 9
13. Températures de transition de l'actine-F, seule ou en présence de liposomes composés seulement de DMPC ou de DMPC:DMPE (1:1), en fonction de la concentration de KCl.....	4 2
14. Enthalpies calorimétriques de l'actine-F, seule ou en présence de liposomes composés seulement de DMPC ou de DMPC:DMPE (1:1), en fonction de la concentration de KCl.....	4 3
15. Températures de transition de liposomes composés seulement de DMPC, seuls ou en présence d'actine-F, en fonction de la concentration de KCl.....	4 4
16. Températures de transition de liposomes composés de DMPC:DMPE (1:1), seuls ou en présence d'actine-F, en fonction de la concentration de KCl.....	4 5
17. Enthalpies calorimétriques de liposomes composés seulement de DMPC, seuls ou en présence d'actine-F, en fonction de la concentration de KCl.....	4 6
18. Enthalpies calorimétriques de liposomes composés de DMPC:DMPE (1:1), seuls ou en présence d'actine-F, en fonction de la concentration de KCl.....	4 7
19. Coloration négative d'un liposome composé de DMPC:DMPE (1:1) en présence d'actine.....	4 8

20. Vue au microscope électronique d'une structure en "filet" formée par les filaments d'actine à la surface d'un liposome composé de DMPC.....	4 9
21. Colorations négatives de solutions d'actine et de liposomes neutres composés de DMPC:DMPE (1:1) en présence d'une concentration croissante de KCl.....	5 1
22. Coefficient d'interaction pour des liposomes composés de DMPC ou d'un mélange de DMPC:DMPE (1:1), en fonction de la concentration de KCl.....	5 2
23. Thermogrammes d'une solution d'actine seule, de liposomes composés de DMPC:DMPS (1:1) et du mélange actine-liposomes.....	5 4
24. Thermogrammes d'une solution d'actine seule, de liposomes composés de DMPC:DMPG (1:1) et du mélange actine-liposomes.....	5 5
25. Thermogrammes du mélange actine-liposomes composés de DMPC:DMPG (1:1) en présence d'une concentration croissante de KCl.....	6 1
26. Températures de transition de l'actine, seule ou en présence de liposomes composés de DMPC:DMPS (1:1) ou de DMPC:DMPG (1:1), en fonction de la concentration de KCl.....	6 2
27. Enthalpies calorimétriques de l'actine, seule ou en présence de liposomes composés de DMPC:DMPS (1:1) ou de DMPC:DMPG (1:1), en fonction de la concentration de KCl.....	6 3
28. Températures de transition de liposomes composés de DMPC:DMPS (1:1), seuls ou en présence d'actine, en fonction de la concentration de KCl.....	6 4

29. Températures de transition de liposomes composés de DMPC:DMPG (1:1), seuls ou en présence d'actine, en fonction de la concentration de KCl..... 6 5
30. Enthalpies calorimétriques de liposomes composés de DMPC:DMPS (1:1), seuls ou en présence d'actine, en fonction de la concentration de KCl..... 6 6
31. Enthalpies calorimétriques de liposomes composés de DMPC:DMPG (1:1), seuls ou en présence d'actine, en fonction de la concentration de KCl..... 6 7
32. Coloration négative de liposomes composés de DMPC:DMPG (1:1) en présence d'actine..... 6 8
33. Deux liposomes adjacents composés de DMPC:DMPG (1:1) en présence d'actine et de 100 mM KCl..... 6 9
34. Thermogrammes d'une solution d'actine seule, de liposomes composés de DMPC:DMPA (1:1) et du mélange actine-liposomes..... 7 2
35. Thermogrammes du mélange actine-liposomes composés de DMPC:DMPA (1:1) en présence d'une concentration croissante de KCl..... 7 5
36. Températures de transition de l'actine-F, seule ou en présence de liposomes composés de DMPC:DMPA (1:1), en fonction de la concentration de KCl..... 7 8
37. Enthalpies calorimétriques de l'actine-F, seule ou en présence de liposomes composés de DMPC:DMPA (1:1), en fonction de la concentration de KCl..... 7 9

38. Coloration négative d'un liposome composé de DMPC:DMPA (1:1) en présence d'actine.....	8 0
39. Vue au microscope électronique d'un liposome composé de DMPC:DMPA (1:1) en présence d'actine et de 30 mM de KCl.....	8 2
40. Thermogrammes d'une solution d'actine seule, de liposomes composés de DGDG et du mélange actine-liposomes.....	8 4
41. Coloration négative d'un liposome composé de DGDG en présence d'actine.....	8 6
42. Coloration négative d'un liposome composé de DGDG en présence d'actine et de 100 mM de KCl.....	8 7

LISTE DES TABLEAUX

Tableaux	Page
I. Liste des principales protéines liant l'actine aux membranes, leur source et leur rôle.....	9
II. Composition des membranes naturelles en phospholipides.....	1 8
III. Comparaison des paramètres calorimétriques de l'actine-F, seule, en présence de liposomes composés seulement de DMPC, ou d'un mélange de DMPC:DMPE (1:1).....	3 7
IV. Comparaison des paramètres calorimétriques des liposomes composés seulement de DMPC ou d'un mélange de DMPC:DMPE (1:1), seuls ou en présence d'actine.....	3 8
V. Comparaison des paramètres calorimétriques de l'actine-F, seule, en présence de liposomes composés de DMPC:DMPS (1:1), ou d'un mélange de DMPC:DMPG (1:1).....	5 6
VI. Comparaison des paramètres calorimétriques des liposomes composés d'un mélange de DMPC:DMPS (1:1) ou de DMPC:DMPG (1:1), seuls ou en présence d'actine.....	5 8
VII. Comparaison des paramètres calorimétriques de l'actine-F, seule ou en présence de liposomes composés d'un mélange de DMPC:DMPA (1:1).....	7 3

VIII. Comparaison des paramètres calorimétriques des liposomes composés d'un mélange de DMPC:DMPA (1:1), seuls ou en présence d'actine-F.....	74
IX. Comparaison des paramètres calorimétriques de l'actine-F, seule ou en présence de liposomes non-chargés composés seulement de DGDG.....	84
X. Écarts type calculés sur la valeur moyenne de la T_m et du ΔH_{cal} de l'actine seule, en présence de différentes concentrations de KCl.....	91

1. INTRODUCTION

1.1- L'actine et ses propriétés physico-chimiques.

L'actine est une protéine très importante que l'on retrouve dans la plupart des cellules eucaryotes. La comparaison des structures primaires montre que la molécule d'actine a été hautement conservée au cours de l'évolution puisqu'on n'observe que des différences mineures dans les séquences d'acides aminés d'actine d'origine différente (139, 140).

On retrouve l'actine sous deux formes: la forme globulaire ou monomérique appelée actine-G et la forme polymérisée ou filamenteuse appelée actine-F.

1.1.1- Actine-G

L'actine monomérique possède un poids moléculaire d'environ 42500 daltons et est composée de 375 acides aminés (actine de lapin). La structure secondaire est composée approximativement de 40% de feuillets β et de 30% d'hélices α , le reste étant désorganisé (58, 59) (fig.1). Le monomère possède une charge globale négative (148).

L'actine-G possède plusieurs sites de liaison: un site pour le nucléotide (ADP ou ATP), un site de haute affinité pour un cation divalent, cinq sites de basse affinité pour un cation divalent ou monovalent et plusieurs autres sites de très basse affinité pour les cations.

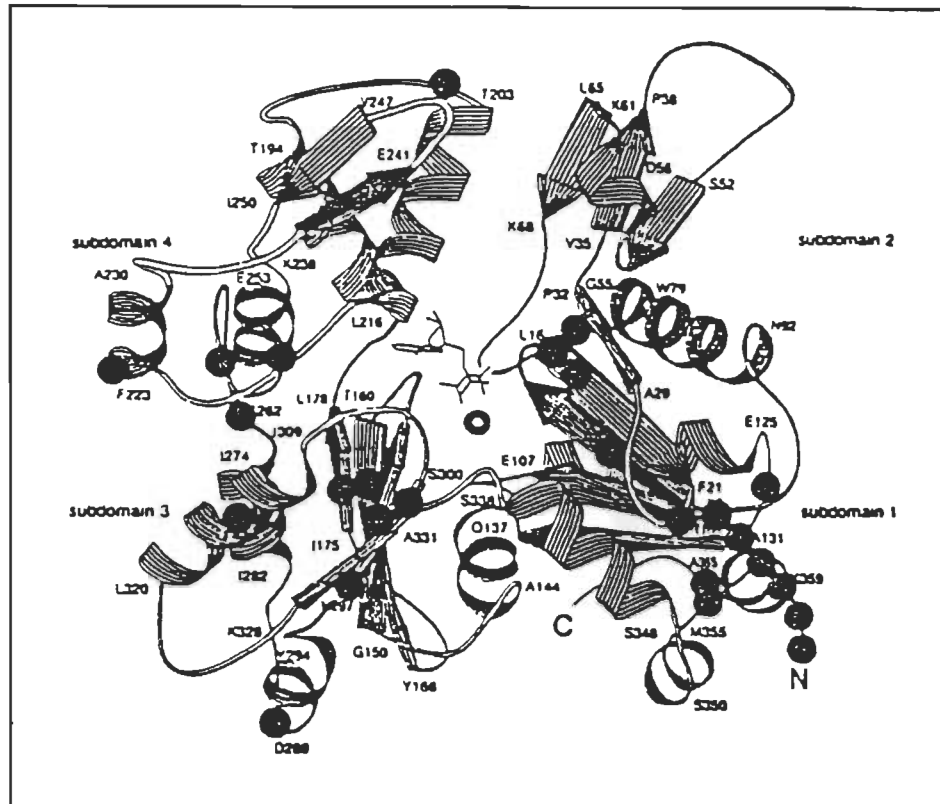


Figure 1: Structure tertiaire de l'actine-G selon Kabsch *et al.*, 1990 (58).

1.1.2 - Actine-F

L'actine filamenteuse est formée par l'association de plusieurs monomères d'actine-G. La structure du filament est une double hélice enroulée à droite ou à gauche. Le pas de l'hélice est d'environ 37.5 nm et contient 13 monomères, chacun distancé de 5.5 nm. Le diamètre du filament d'actine est de 7 nm (33) (fig.2).

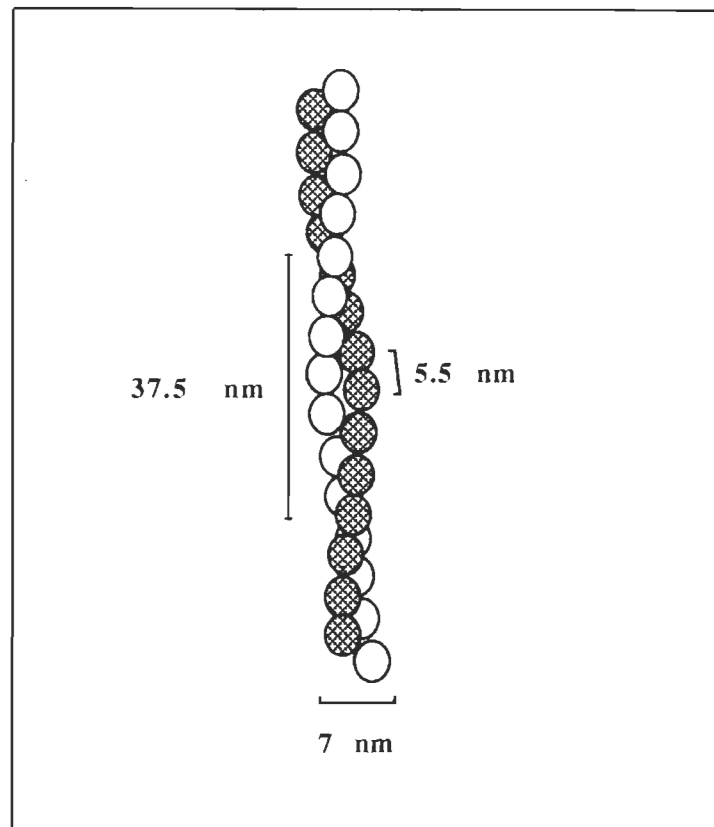


Figure 2: Structure de l'actine-F selon De Rosier et Tilney, 1984 (33).

1.1.3- Polymérisation de l'actine

La polymérisation de l'actine-G *in vitro* est initiée par l'ajout de cations qui vont se fixer sur les sites de hautes et basses affinités (5, 78, 129, 130). Les sels généralement utilisés pour induire la polymérisation sont le KCl, le MgCl₂ ou le CaCl₂ aux concentrations d'une centaine de mM pour le KCl et de l'ordre du mM pour les cations divalents. La polymérisation se fait en plusieurs étapes qui sont les suivantes:

1. **activation:** liaison de cations divalents (Ca^{2+} ou Mg^{2+}) aux sites de moyenne affinité et changement de conformation des monomères d'actine-G (39, 115, 116).
2. **nucléation:** association de monomères pour former des noyaux (trimères) qui ont une plus grande probabilité de croître en filaments que de se décomposer en monomères. C'est l'étape la plus lente de la polymérisation puisque la probabilité que trois monomères se rencontrent et forment un noyau est faible (94, 95, 145).
3. **élongation:** croissance bidirectionnelle du polymère par l'ajout de monomères aux deux extrémités du noyau. Une extrémité polymérise plus rapidement que l'autre (76).
4. **équilibre ou état stable:** aucune croissance du filament; il y a polymérisation à une extrémité (bout +) et dépolymérisation à l'autre extrémité (bout -). C'est l'étape où on atteint la concentration critique, c'est-à-dire la concentration de monomères d'actine-G où il n'y a aucune croissance du filament. Au-dessus de cette concentration, il y a polymérisation (88, 144), en dessous, dépolymérisation.

Évidemment, il faut bien comprendre que ces étapes servent à simplifier l'explication de la polymérisation de l'actine. En réalité, on ne peut pas vraiment déterminer où s'arrête la nucléation et où commence l'élongation. C'est un processus continu et dynamique.

Au cours de la polymérisation, il se produit une hydrolyse de l'ATP lié aux monomères. Le nucléotide est très important lors de la polymérisation de l'actine. Ainsi, l'actine ne peut polymériser si elle n'a pas un nucléotide lié sur son site, que ce soit l'ADP ou l'ATP (36, 65, 66, 77, 128). Cependant, l'hydrolyse de l'ATP n'est pas nécessaire à la polymérisation (17, 27, 103, 109) mais elle est essentielle à la dépolymérisation (99). Selon Carlier et al., 1984 (17), il y a formation d'un "cap ATP" à l'extrémité du filament qui maintient la stabilité du polymère alors que le coeur du filament est composé de sous-unités d'actine-ADP. Les références 15, 16, 38, et 62 sont de bonnes revues sur la polymérisation de l'actine.

1.1.4- Paracristaux d'actine

In vitro, l'actine peut former des structures régulières appelées paracristaux. Ces paracristaux sont formés grâce aux interactions latérales entre les filaments d'actine qui se produisent dans certaines conditions non physiologiques (généralement en présence d'un excès de charges positives).

En présence de grandes concentrations d'ions Mg^{2+} (> 25 mM), on obtient les paracristaux de Hanson (49). Ces structures paracristallines sont composées de filaments d'actine parallèles et en phase. Ces paracristaux sont produits lorsque les sites cationiques, de très faible affinité de l'actine, sont comblés (130).

Les paracristaux de Kawamura (60) sont un autre type de paracristaux formés au pHi de l'actine en présence de 100-200 mM KCl et de 0.4 mM d'ATP. On obtient alors des structures où les filaments d'actine s'entrecroisent en "filet"

(type I et II) ou des paracristsaux similaires à ceux obtenus par Hanson (type III).

Les microcristaux de Dos Remedios et al. (34) peuvent être obtenus en présence d'ions lanthanides tel le gadolinium. Ces microcristaux sont constitués par l'accolement latéral et régulier de monomères d'actine disposés en monocouche.

Ces paracristsaux sont formés dans des conditions différentes de celles qui prévalent *in vivo*. Cependant, on a retrouvé, dans les cellules, des structures paracrystallines formées d'actine mais associées à d'autres protéines (33).

Des paracristsaux peuvent aussi être obtenus *in vitro* en présence de polyamines telles la spermidine et la spermine (96). Les polyamines sont des substances polycationiques très répandues chez tous les organismes vivants.

1.2- L'actine dans les cellules

L'actine joue deux rôles principaux dans les cellules:

1. L'actine joue d'abord un rôle dans les phénomènes de motilité cellulaire tels la contraction musculaire (26, 54, 82, 105, 124), le déplacement de cellules par la formation de pseudopodes (25, 35, 132, 147), la phagocytose, l'exocytose (8, 14, 24, 135, 136) et le déplacement d'organites à l'intérieur des cellules (11, 14, 32, 84, 87). L'actine est aussi impliquée dans le phénomène de cytokinèse (40, 51, 118), dans la production d'un courant cytoplasmique chez les amibes (10, 98) et dans la transmission synaptique (20).
2. L'actine a aussi une fonction dans la structure et la forme des cellules en participant à l'élaboration du cytosquelette.

L'exemple le plus connu est celui du globule rouge (fig.4) où l'actine est une partie intégrante d'un réseau complexe des protéines responsables de la forme biconcave, caractéristique des érythrocytes (47, 122).

Un autre exemple bien connu est celui des microvillosités intestinales où des faisceaux d'actine déforment la membrane pour donner la forme allongée aux microvillosités (85) (fig.3). L'actine est liée latéralement et par l'extrémité du faisceau à la membrane via des protéines membranaires telles l' α -actinine et le complexe 110 kDa-calmoduline.

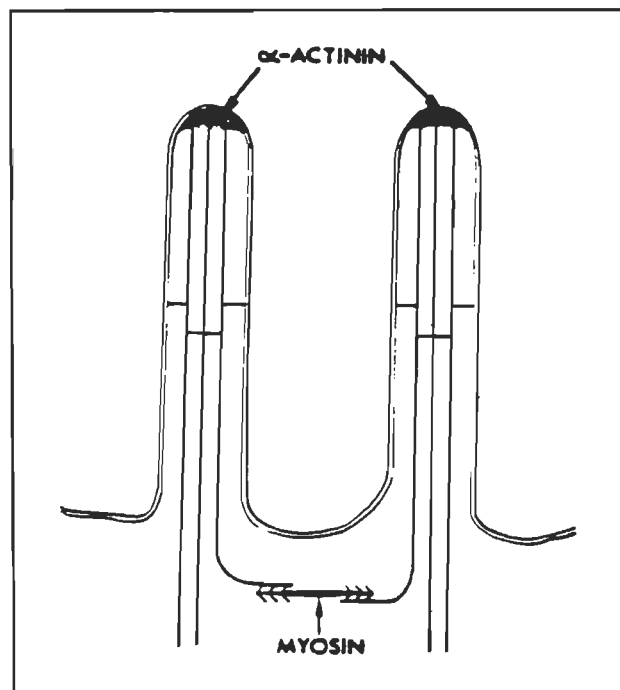


Figure 3: Modèle de liaison de l'actine à la membrane de l'épithélium intestinal des bordures en brosse de l'intestin selon Mooseker et Tilney, 1975 (85). On note un attachement perpendiculaire à la membrane par l' α -actinine et un attachement parallèle par le complexe 110 kDa-calmoduline.

Pour jouer leurs rôles, les filaments d'actine doivent être attachés à la membrane. Il est maintenant bien établi, dans la littérature, que l'actine s'attache aux membranes via des protéines transmembranaires.

1.3- Protéines liant l'actine à la membrane

L'attachement de l'actine aux membranes est essentiel pour certains phénomènes biologiques tels la phagocytose, l'exocytose, la pinocytose, l'élaboration des pseudopodes, etc. Le tableau I dresse une liste de quelques protéines liant l'actine à la membrane.

Certaines de ces protéines d'ancrage de l'actine agissent seules pour établir la liaison actine-membrane. C'est le cas notamment de l' α -actinine présente dans les cellules intestinales (85). Par contre, d'autres protéines d'ancrage s'associent à une ou plusieurs autres protéines intégrales ou périphériques. C'est le cas du complexe 110kD-calmoduline situé dans les microvillosités intestinales (11, 19, 85, 108) ainsi que du complexe bien connu actine-spectine-ankirine-bande 3 (fig.4) mis en évidence dans le globule rouge (7, 19, 47, 73, 108, 122).

Tableau I. Liste des principales protéines liant l'actine aux membranes, leur source et rôle (d'après réfs. 7, 11, 12, 13, 18, 19, 47, 55, 61, 73, 85, 97, 104, 108, 114, 117, 122, 148, 150).

Nom de la protéine	P.M. (Da)	Source	Rôle dans les cellules
Ponticuline	17000	<i>Dictyostelium</i> et neutrophiles	Site de nucléation de l'actine
Taline	215000	Muscle lisse et plaquettes	Lie l'actine à la membrane plasmique via la vinculine. Site de nucléation de l'actine
Spectrine/ fodrine	240000/ 235000	Plupart des cellules	Ancrage latéral de l'actine à la membrane plasmique
Protéine 4.1/ synapsine	78000	Plupart des cellules	Lie la spectrine et renforce la liaison actine-spectrine
α -actinine	90000- 100000	Plupart des cellules	Lie l'actine au complexe taline-vinculine
Vinculine	116000	Plupart des cellules	Lie l' α -actinine et la taline. Lie aussi l'actine directement
Myosine I (110kD- calmoduline)	110000- 140000	Épithélium intestinal et <i>Dictyostelium</i>	Ancrage latéral des filaments d'actine à la membrane des microvillosités
ABP-280 (filamine)	250000	Plupart des cellules	Lie l'actine à la membrane plasmique des plaquettes
Complexe GP IIb/IIIa	155000/ 114000	Plaquettes	S'associe à l'actine après activation des plaquettes
Complexe CAG/ protéine 58 kDa	190000/ 58000	microvillosités de cellules cancéreuses	Site d'ancrage des filaments d'actine à la membrane
Dystrophine	427000	Fibre musculaire	Ancrage latéral des filaments d'actine au sarcolemme
Hisactophilline	17000	<i>Dictyostelium</i>	possiblement un site de nucléation de l'actine
Connectine	70000	cellules cancéreuses de souris	Site d'ancrage de l'actine à la membrane

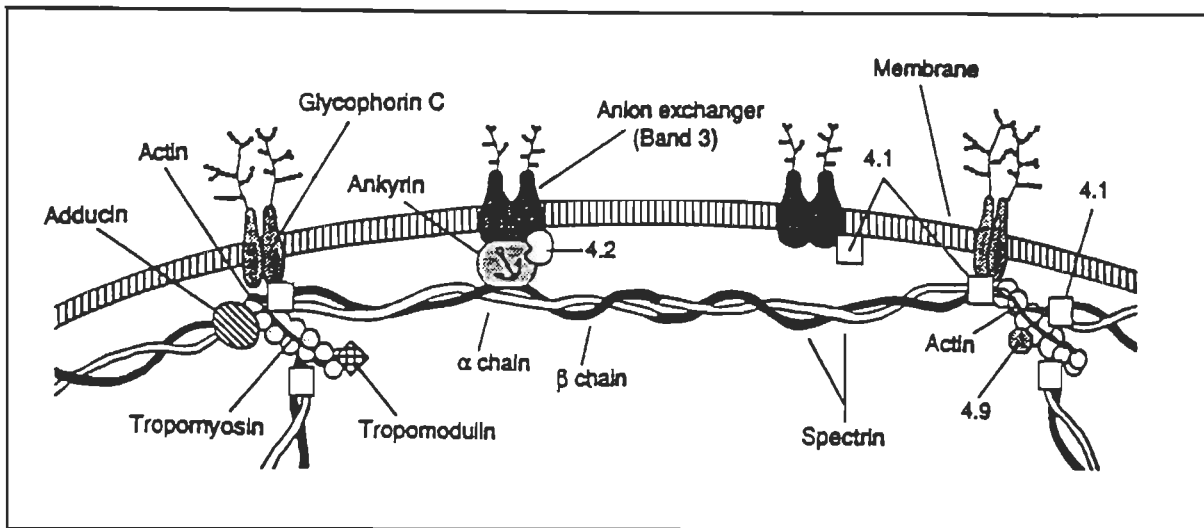


Figure 4: Modèle de liaison de l'actine à la membrane des globules rouges selon Luna et Hitt, 1992 (73). L'actine est ancrée à la membrane via un complexe de protéines périphériques composé principalement de la spectrine, l'ankirine et de la bande 3.

1.4 - Interaction protéines-lipides.

Papahadjopoulos *et al.*, 1975 (100) ont proposé une classification des interactions protéines-lipides selon trois catégories. Elles sont définies par les effets des interactions protéines-lipides sur la transition de phase principale des lipides (fig.5).

1. La première catégorie est une liaison électrostatique de la protéine avec les têtes polaires. L'effet sur la bicouche phospholipidique inclut une augmentation de l'enthalpie calorimétrique de transition accompagnée soit d'une augmentation ou d'aucune modification de la température de transition (la signification des différents paramètres calorimétriques sera expliquée à la section 2.5.1). Cette interaction représente une simple liaison de surface de la protéine sur la bicouche lipidique sans pénétration dans la région hydrocarbonée.

2. Les interactions du groupe 2 dépendent aussi des forces électrostatiques à la surface de la bicouche. Contrairement au premier groupe, on remarque une diminution drastique de la température et de l'enthalpie calorimétrique de la transition de phase des lipides. Cette interaction représente une liaison de surface suivie d'une pénétration partielle de la protéine dans la bicouche phospholipidique.
3. La troisième catégorie dépend d'interactions strictement non polaires, sans l'intervention de charges électrostatiques. Il n'y a pas d'effet appréciable sur la température de transition, mais une diminution linéaire de l'enthalpie calorimétrique, proportionnelle au pourcentage de protéine. Cette interaction indique que la protéine est incorporée à l'intérieur de la bicouche, associée avec un nombre limité de molécules de lipides via des interactions non polaires.

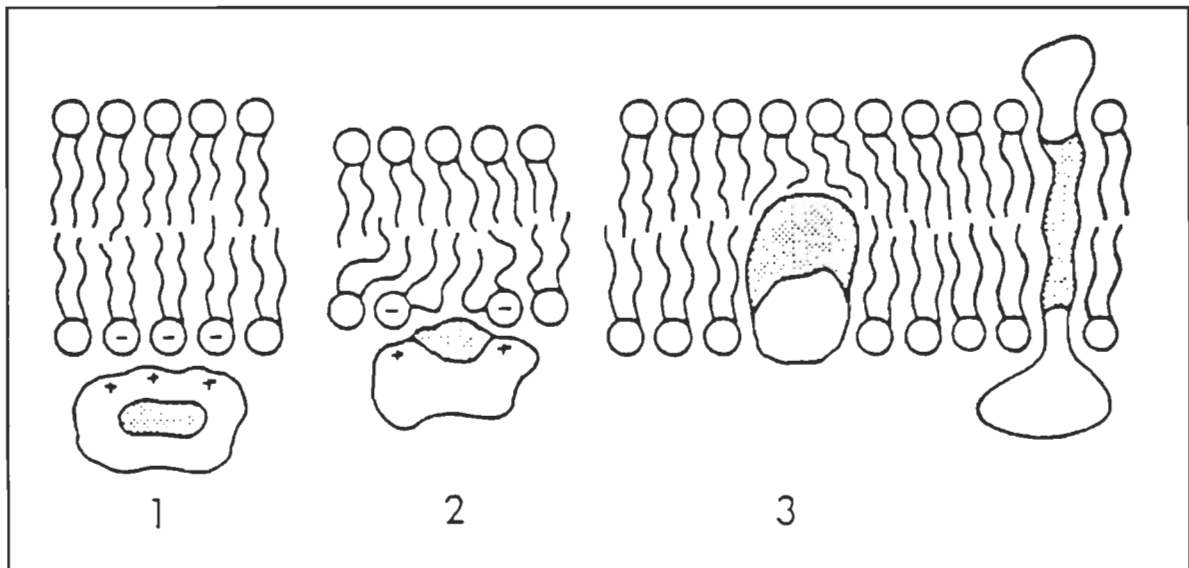


Figure 5: Représentation des divers types d'interaction protéines-lipides selon Papahadjopoulos *et al.*, 1975 (100).

1.5 - Interaction directe entre l'actine et les lipides membranaires.

Comme mentionné précédemment, la plupart des travaux concernant l'interaction actine-membrane portent sur l'étude de protéines intermédiaires. Cependant, quelques études ont montré qu'il existe une interaction directe entre l'actine et les lipides membranaires *in vitro*. Toutefois, il n'a jamais été démontré que cette interaction existe *in vivo*. Ainsi, le groupe de Okimasu *et al.* (92, 93, 137, 138) a montré que l'actine-F peut se lier directement avec des vésicules de phosphatidylcholine. Cette interaction est inhibée par une incorporation croissante de cholestérol dans les liposomes. Étant donné cet effet inhibiteur du cholestérol, leurs conclusions sont que l'interaction directe entre l'actine et les lipides membranaires est peu probable *in vivo*.

Quelques études isolées ont été effectuées sur l'interaction directe entre l'actine et les lipides membranaires. Entre autres, Llerenas, 1985 (72) a montré que l'actine-F interagit avec les monocouches de phosphatidylcholine et que l'ajout de Ca^{2+} intensifie cette interaction. Taylor et Taylor, 1992 (133) ont démontré qu'il y a formation de paracristaux d'actine sur des monocouches composées de phospholipides en présence d'amine quaternaire.

Les travaux les plus importants ont été effectués par le groupe de Gicquaud et ses collaborateurs. Ces travaux ont d'abord démontré que l'actine filamenteuse interagit de façon directe avec les liposomes chargés positivement par l'ajout de stéarylamine (113) et que l'actine globulaire polymérise à la surface de ces liposomes en présence de faibles concentrations de cations (67). Cependant, ces travaux ont peu d'intérêt

compte tenu que les membranes naturelles sont composées essentiellement de lipides de charge neutre et négative.

St-Onge et Gicquaud, 1989 (126) ont montré que l'interaction actine-lipides de charge globale neutre (PC) est possible en présence d'un minimum de 3 mM de cations divalents (Ca^{2+} ou Mg^{2+}). Cette interaction n'est pas observée en présence de fortes concentrations de cations monovalents (KCl). Contrairement aux résultats de Okimasu *et al.*, l'interaction actine-lipides n'est pas inhibée par la présence de cholestérol selon St-Onge et Gicquaud, 1990 (127).

Les travaux de Pigeon, 1992 (107) ont confirmé que l'interaction directe actine-lipides de charge globale neutre (DPPC) est de nature électrostatique. Il propose un mécanisme d'interaction impliquant les charges négatives des filaments d'actine et les charges positives des liposomes. Ce mécanisme d'interaction serait initié par une densité critique de charges positives à atteindre, en excès à la surface de la bicouche, pour qu'il y ait interaction directe actine-lipides. Ces résultats sont appuyés par les travaux de Grimard *et al.*, 1993 (46) en monocouche. Ces études ont démontré que l'augmentation de la densité des charges positives dans la monocouche de lipides (composée seulement de PC ou d'un mélange PC-stéarylamine) favorise l'interaction de l'actine avec les molécules de lipides, ce qui indique que l'adsorption de l'actine est facilitée par les interactions électrostatiques.

Les travaux de Gicquaud, 1993 (45) réalisés par calorimétrie différentielle à balayage (DSC) ont montré que l'interaction actine-liposomes composés de DSPC se traduit par un changement de conformation drastique de la protéine (formation de paracristsaux d'actine à la surface des liposomes), alors que les molécules de lipides à l'intérieur de la bicouche

lipidique sont peu affectées. La calorimétrie a aussi montré que la présence de fortes concentrations de KCl inhibe l'interaction. Les résultats de ces travaux mènent donc à la même conclusion que ceux obtenus antérieurement par ce groupe de recherche, à savoir que l'interaction actine-lipides est de nature électrostatique.

1.5.1 - Mécanisme proposé pour expliquer l'interaction directe actine-lipides membranaires.

Compte tenu des résultats obtenus, le groupe de recherche de Gicquaud et ses collaborateurs a proposé un mécanisme moléculaire pouvant expliquer l'interaction directe entre l'actine et les lipides membranaires neutres (fig.6). Ce mécanisme repose sur des travaux portant sur la liaison des cations divalents aux phospholipides. Les travaux de Herbette *et al.*, 1984 (52), Lis *et al.*, 1981 (71) et de McLaughlin *et al.*, 1978 (80) ont montré que les cations divalents se lient à la tête polaire au niveau du groupement phosphate des molécules de phospholipides. D'autres travaux ont montré que les cations divalents se lient aux molécules de phospholipides dans une stoechiométrie de un ion pour deux molécules de lipides (2, 3, 119). Les cations divalents forment un complexe avec deux molécules de phospholipides en neutralisant les charges négatives des groupements phosphates. La formation de ce complexe est accompagnée d'un changement d'orientation de la tête polaire où le groupement triméthylamine est repoussé vers l'extérieur de la bicouche. La charge positive de ce groupement devient plus accessible en surface et la charge globale de la bicouche est alors positive, ce qui permet une interaction directe de l'actine avec la membrane.

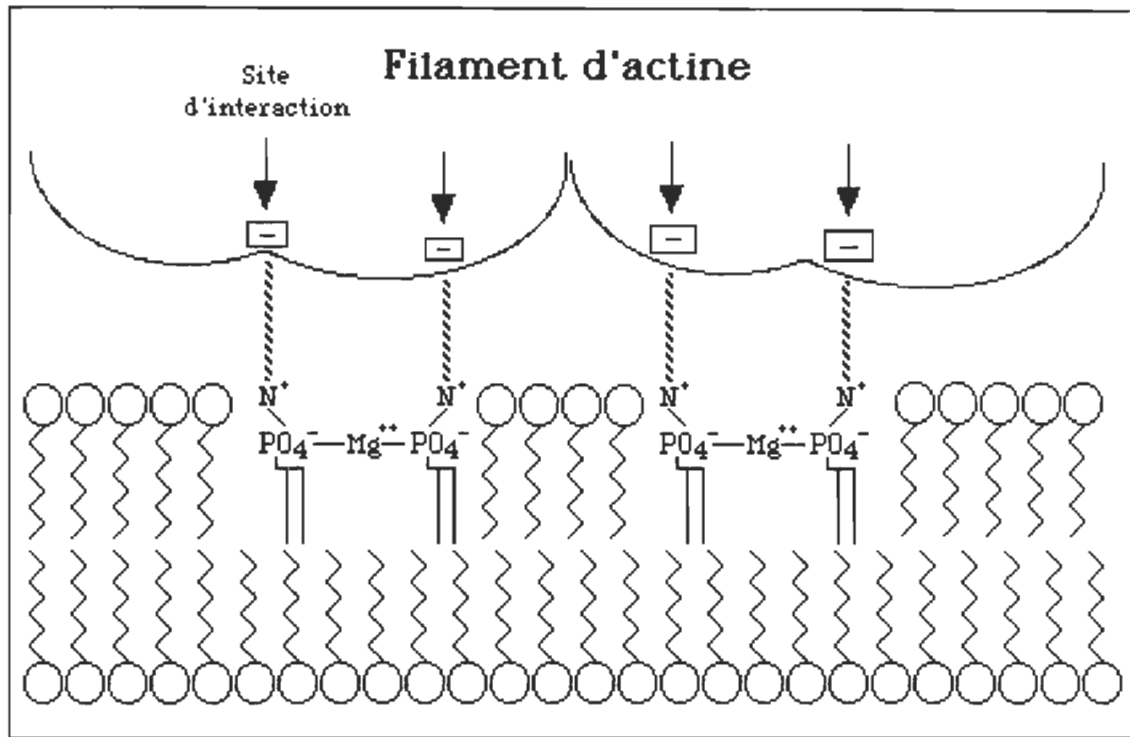


Figure 6: Modèle d'interaction directe entre l'actine et les bicouches phospholipidiques proposé par Gicquaud (45) et Pigeon (107).

La neutralisation des charges négatives des groupements phosphates des phospholipides par les cations divalents est essentielle pour que l'actine, chargée négativement à pH physiologique, puisse interagir avec une bicouche de charge globale positive. Il est important de mentionner que seulement une faible proportion de molécules de phospholipides disponibles sur la membrane est impliquée dans l'interaction avec l'actine étant donné que la superficie d'une molécule d'actine est beaucoup plus grande que celle d'une molécule de lipide. Ceci n'exclut pas le fait qu'une molécule d'actine peut interagir avec plusieurs molécules de lipides. Cependant, cette interaction est limitée au nombre de sites disponibles sur l'actine.

1.6- Objectifs du projet de maîtrise.

Les travaux de mes prédécesseurs ont montré qu'il existe une interaction directe entre l'actine et les lipides membranaires *in vitro*. Selon l'hypothèse proposée par le groupe de Gicquaud, cette interaction actine-membrane est un phénomène électrostatique et implique plus particulièrement la tête polaire des phospholipides. Si cette hypothèse est vraie, en changeant la tête polaire des phospholipides, on devrait modifier l'interaction actine-lipides.

Le but de mon projet de maîtrise est d'étudier l'interaction actine-lipides et plus particulièrement, l'influence de la tête polaire des phospholipides sur cette interaction, par microscopie électronique et calorimétrie différentielle à balayage (DSC).

Pour ce faire, nous utiliserons un système, *in vitro*, composé d'actine purifiée et de membranes artificielles: les liposomes. L'utilisation de liposomes est très pratique puisqu'elle nous permet d'en varier la composition en phospholipides. Ainsi, pour étudier seulement l'influence de la tête polaire dans l'interaction actine-lipides, nous utiliserons des phospholipides purs ayant la même longueur de chaîne carbonée mais en faisant varier seulement la tête polaire (voir section 1.6.1).

1.6.1 - Justification du choix des lipides pour étudier l'influence de la tête polaire sur l'interaction directe entre l'actine et les liposomes.

Pour étudier l'influence de la tête polaire sur l'interaction actine-lipides, nous utiliserons des liposomes composés de phospholipides saturés ayant une chaîne carbonée de 14 carbones (dimyristoyl). Seule la tête polaire sera différente. Les têtes polaires étudiées seront constituées soit d'une choline (PC), soit d'une éthanolamine (PE), d'une sérine (PS), d'un glycérol (PG) ou d'un acide phosphatidique (PA). La température de transition (T_m) est de 24, 50, 38, 23 et 51°C respectivement pour le DMPC (9), DMPE, DMPS, DMPG et DMPA (131). Ces phospholipides sont ceux qui composent les membranes naturelles. La composition en phospholipides des membranes naturelles de différentes cellules est résumée dans le tableau II. La structure moléculaire de ces phospholipides est illustrée aux figures 7a et 7b (50).

Les études effectuées par mes prédécesseurs ont montré que la charge des liposomes est un facteur important lors de l'interaction avec l'actine. Cependant, ces études ont été effectuées avec des liposomes composés principalement de PC et de substances absentes des membranes naturelles telle que la stéarylamine. L'utilisation de phospholipides retrouvés dans les membranes naturelles est donc plus proche des conditions *in vivo*. Par ailleurs, les liposomes composés de phospholipides ayant une chaîne carbonée de 14 carbones ont des températures de transition plus basses que la température de dénaturation de l'actine-F. Ceci permet d'obtenir des thermogrammes plus faciles à interpréter puisque les deux transitions de phase, celle des liposomes et celle de l'actine-F, sont bien séparées.

Tableau II. Composition des membranes naturelles en phospholipides (en % de la quantité totale de lipides).

Type de membrane	Phospholipides totaux	Pourcentage des lipides par rapport aux phospholipides totaux					
		PC	PE	PS	PA	PG	DGDG
Érythrocyte (humain) ^a	56	23	20	11	<1	0	0
Myéline (humain) ^a	33	11	14	7	<1	0	0
Mitochondrie (membrane externe) ^b	97	42	24	<1	<1	10	0
Microsome (hépatocyte de rat) ^c	89	55	24	0	<1	2	0
Chloroplaste (thylacoïde) ^d	19	5	0	0	0	14	29
E. coli ^a	100	0	80	0	0	15	0

^a d'après Shechter, E., 1990 (120)

^b d'après Datta, D.B., 1987 (30)

^c d'après Thompson *et al.*, 1986-87 (134)

^d d'après Murphy *et al.*, 1983 (86)

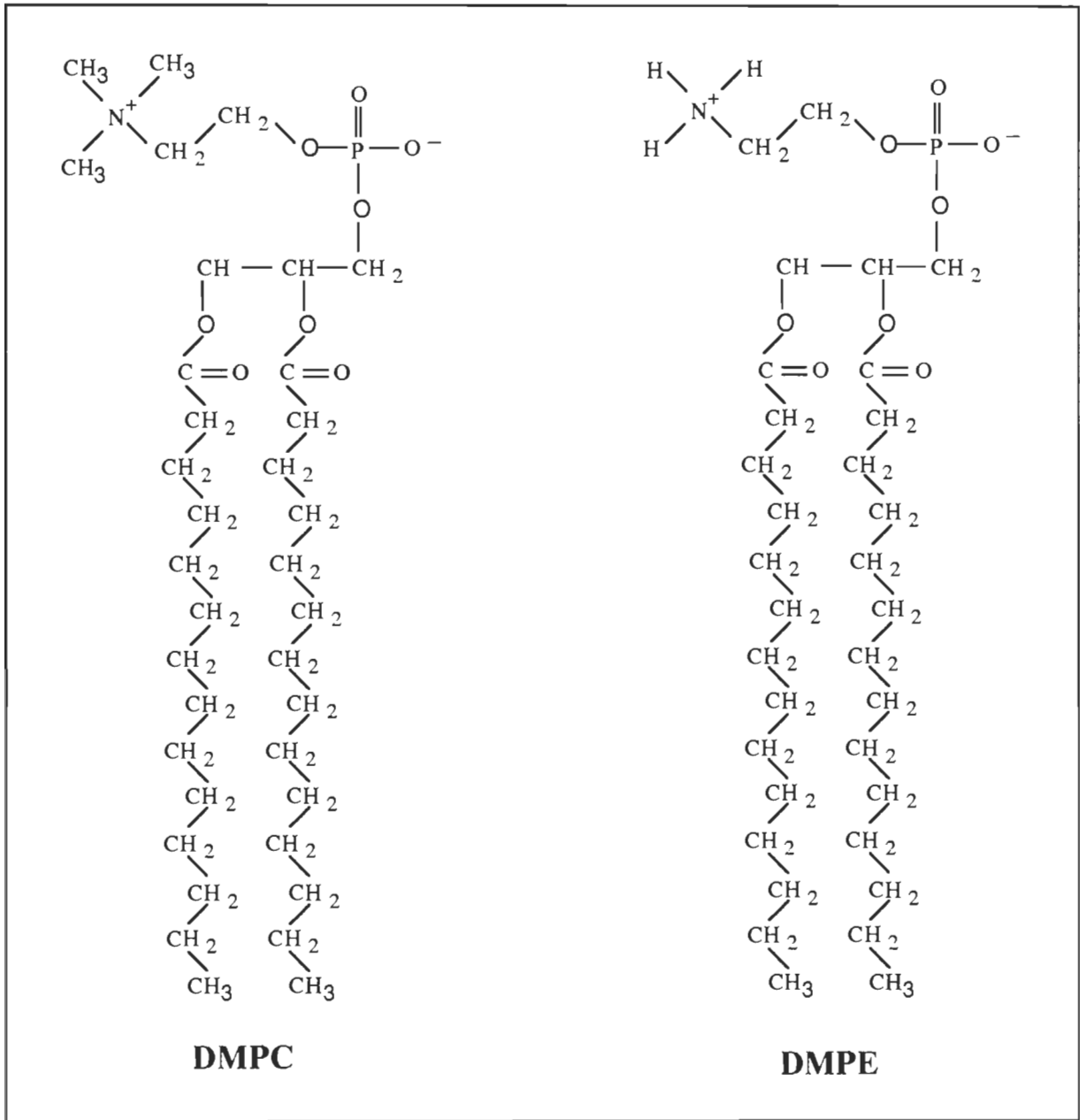


Figure 7a: Structure moléculaire des phospholipides neutres (DMPC et DMPE).

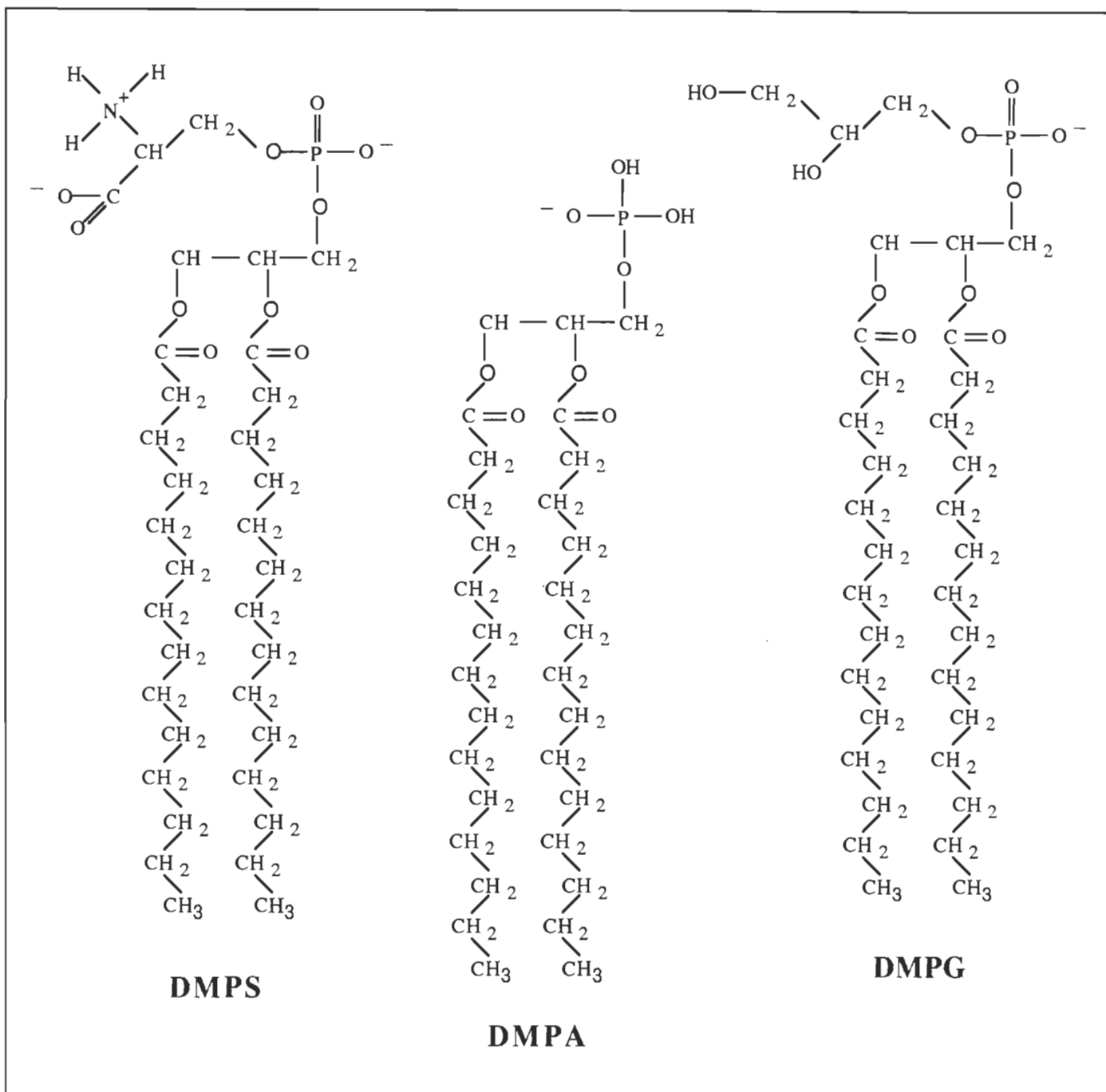


Figure 7b: Structure moléculaire des phospholipides anioniques (DMPS, DMPG et DMPA).

Le mécanisme d'interaction entre l'actine et les liposomes neutres (PC) décrit par Pigeon, 1992 (107) et Gicquaud, 1993 (45) implique la présence de cations divalents et monovalents. Cette interaction est donc de nature électrostatique. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons pensé utiliser un lipide n'étant pas chargé, soit le digalactosyldiglycérade (DGDG). Le DGDG est un des constituants majeurs de la membrane des thylacoïdes dans les chloroplastes des cellules végétales (tableau II). Sa structure est schématisée à la figure 7c (121).

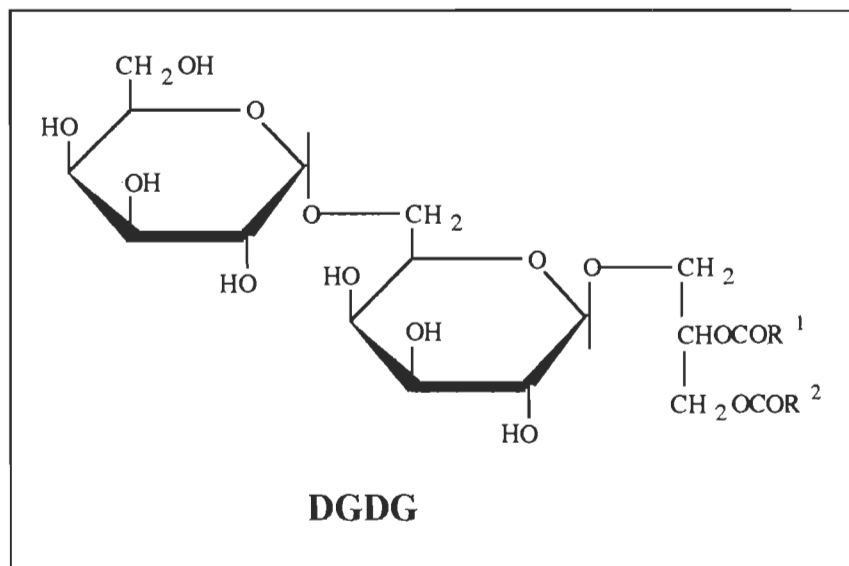


Figure 7c: Structure moléculaire du DGDG.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1- Liste des produits chimiques

<u>Nom du produit</u>	<u>No de catalogue</u>
Dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC)	8 5 0 3 4 5
Dimyristoylphosphatidyléthanolamine (DMPE)	8 5 0 7 4 5
Dimyristoylphosphatidylsérine (DMPS)	8 3 0 0 3 3
Dimyristoylphosphatidylglycérol (DMPG)	8 4 0 4 4 5
Acide dimyristoylphosphatidique (DMPA)	8 3 0 8 4 5
Digalactosyldiglycérine (DGDG)	D - 4 6 5 1

Ces lipides proviennent de la compagnie Avanti polar lipids, inc. (Alabaster, Al, USA), sauf le DGDG qui provient de Sigma Chemical Co. (St-Louis, Mo, USA) Ils sont sous forme de poudre et sont utilisés sans aucun contrôle de pureté.

Les autres produits sont de grade analytique.

2.2- Solution tampon

Une seule solution tampon a été utilisée:

Tampon G: tampon Tris-HCl pH 8.0 (2 mM); CaCl₂ (0.2 mM); β-mercaptoéthanol (0.5 mM); azide de sodium (0.01%); et de l'ATP (0.2 mM). Ce tampon sert à diluer l'actine-G et à préparer les liposomes.

2.3- Préparation des liposomes

Les cations divalents qui sont nécessaires pour la polymérisation de l'actine ont aussi des effets sur la formation des liposomes. Ainsi, certains phospholipides anioniques tels DMPS, DMPG et DMPA, utilisés seuls, ne forment pas de liposomes mais plutôt des structures lamellaires en présence de cations divalents. Pour pallier à cette difficulté, nous avons mélangé chacun de ces lipides avec le DMPC selon une proportion en poids de 1:1. L'examen de ces préparations au microscope électronique montre que ces mélanges forment des liposomes en présence de cations divalents. Les seuls phospholipides utilisés à 100% dans nos membranes artificielles seront le DMPC et le DGDG.

Les liposomes ont été préparés par la méthode de congélation-décongélation de Bally *et al.* (4) comme suit:

Les phospholipides sont dissous dans quelques millilitres de chloroforme pour être déposés dans un ballon en verre de 100 ml. Le solvant est chauffé à 65 °C pour bien dissoudre les phospholipides. Le solvant est ensuite évaporé sous vide à l'aide d'un rotoévaporateur Büchi modèle R 110. Une fois le chloroforme évaporé, le ballon est chauffé sous vide à 65 °C pour au moins 30 minutes, afin d'éliminer toute trace de solvant. On obtient alors un mince film de lipides sur la paroi du ballon.

L'étape suivante consiste à resuspendre la couche de lipides dans le tampon G en brassant et en chauffant le ballon au-dessus de la température de transition des lipides, soit environ 65 °C. À cette étape, des billes de verre de 4 mm de diamètre (11-312B, Fisher Scientific Ltée, Ontario, Canada) sont ajoutées à la préparation pour faciliter le détachement des lipides de la paroi du ballon. Du tampon G est ajouté de manière

à obtenir une concentration de 10 mg de phospholipides par ml. La préparation est ensuite transférée dans un tube Nalgene Cryovial de 15 ml, résistant à l'azote liquide, puis soumise à cinq cycles de congélation-décongélation. La congélation s'effectue dans l'azote liquide, la décongélation dans un bain thermostaté au-dessus de la température de transition des liposomes. Le pH est ajusté à 7.9-8.0.

Les préparations de liposomes sont pipetées dans des ampoules de 1 ml, congelées dans l'azote liquide puis conservées au congélateur à -20 °C, au maximum une semaine. Lors de l'utilisation subséquente des liposomes, ceux-ci sont décongelés rapidement dans un bain thermostaté au-dessus de la température de transition du lipide ou du mélange de lipides utilisé.

Les populations de liposomes, obtenues à l'aide de cette technique, ont une taille variant de 0,2 à 1,0 μm , sauf les liposomes composés seulement de DMPC ou d'un mélange de DMPC:DMPE (1:1) qui ont un diamètre de l'ordre de 3 à 4 μm selon des observations effectuées au microscope électronique. Ces préparations de liposomes sont donc passés dix fois dans un appareil à ultrafiltration (The Extruder de Lipex Biomembranes Inc., Vancouver, Canada) équipé d'un filtre de polycarbonate ayant des pores de 800 nm de diamètre (Nuclepore Corporation, Pleasanton, CA, USA) et ce, au-dessus de la température de transition du lipide utilisé. Ces préparations sont ensuite entreposées au congélateur à -20 °C.

2.4- Préparation de l'actine.

L'actine du muscle de lapin est purifiée à partir de la poudre acétonique par la méthode de Spudich et Watt (123) modifiée par Nonomura *et al.* (91). La concentration de l'actine est déterminée par mesure de l'absorbance à 290 nm, $A^{0.1\%}_{290\text{nm}} = 0.63$.

Pour toutes les manipulations, l'actine-G a été préparée et utilisée dans du tampon G. L'actine-F a été obtenue par l'addition de 2 mM MgCl_2 aux solutions et, selon le cas, par l'addition de différentes concentrations de cations monovalents (KCl), allant de 0 à 150 mM.

2.5 - Techniques de mesure de l'interaction entre l'actine et les liposomes.

2.5.1- Calorimétrie différentielle à balayage (DSC).

Les changements d'état physique, tels une fusion ou une transition d'une phase à une autre, ou encore la dénaturation des protéines, sont des phénomènes qui peuvent être initiés en élevant la température de l'échantillon. L'échantillon peut passer d'une conformation ordonnée à une conformation désordonnée et vice versa. Ces processus sont généralement accompagnés d'une absorption (réaction endothermique) ou d'un dégagement de chaleur (réaction exothermique). Les calorimètres différentiels à balayage sont conçus pour mesurer les changements apparents de capacité calorifique impliqués dans ces processus.

Le calorimètre différentiel à balayage et à conduction de chaleur utilisé, modèle Hart 4207, analyse les flux de chaleur de deux cuvettes, soit une cuvette de référence, qui est en fait un bloc de métal, et une cuvette contenant l'échantillon à tester (fig.8). Ces cellules sont à l'intérieur d'un puits thermique, généralement un bloc de métal. La température de ce bloc augmente de façon linéaire en fonction du temps. On fait varier, à vitesse constante, la température de l'échantillon et de la référence. Un circuit de contrôle de chauffage permet de maintenir à la même température l'échantillon et la référence. Des senseurs thermiques isolent les cellules du puits thermique. La chaleur passant de la source thermique aux cellules le fait à travers les senseurs thermiques. Le paramètre qui est mesuré expérimentalement est la différence de flux de chaleur fourni entre l'échantillon et la référence, pour maintenir échantillon et référence à la même température. Cette différence est nulle tant qu'aucun phénomène thermique n'a lieu dans l'échantillon. Lors d'une transition, qu'elle soit endothermique ou exothermique, le flux de chaleur de l'échantillon est différent de celui de la référence.

La différence de flux de chaleur passant du bloc de métal à une cellule est convertie en signal analogique. Ce signal est associé à la capacité calorifique de la cellule par calibration. On obtient ainsi une courbe appelée thermogramme qui représente la variation de capacité calorifique (ΔC_p , en $\mu J/^\circ C$) mesurée en fonction de la température (fig.9). La variation de capacité calorifique est directement reliée à la mesure de la quantité de chaleur requise pour augmenter la température de l'échantillon dans un intervalle de température.

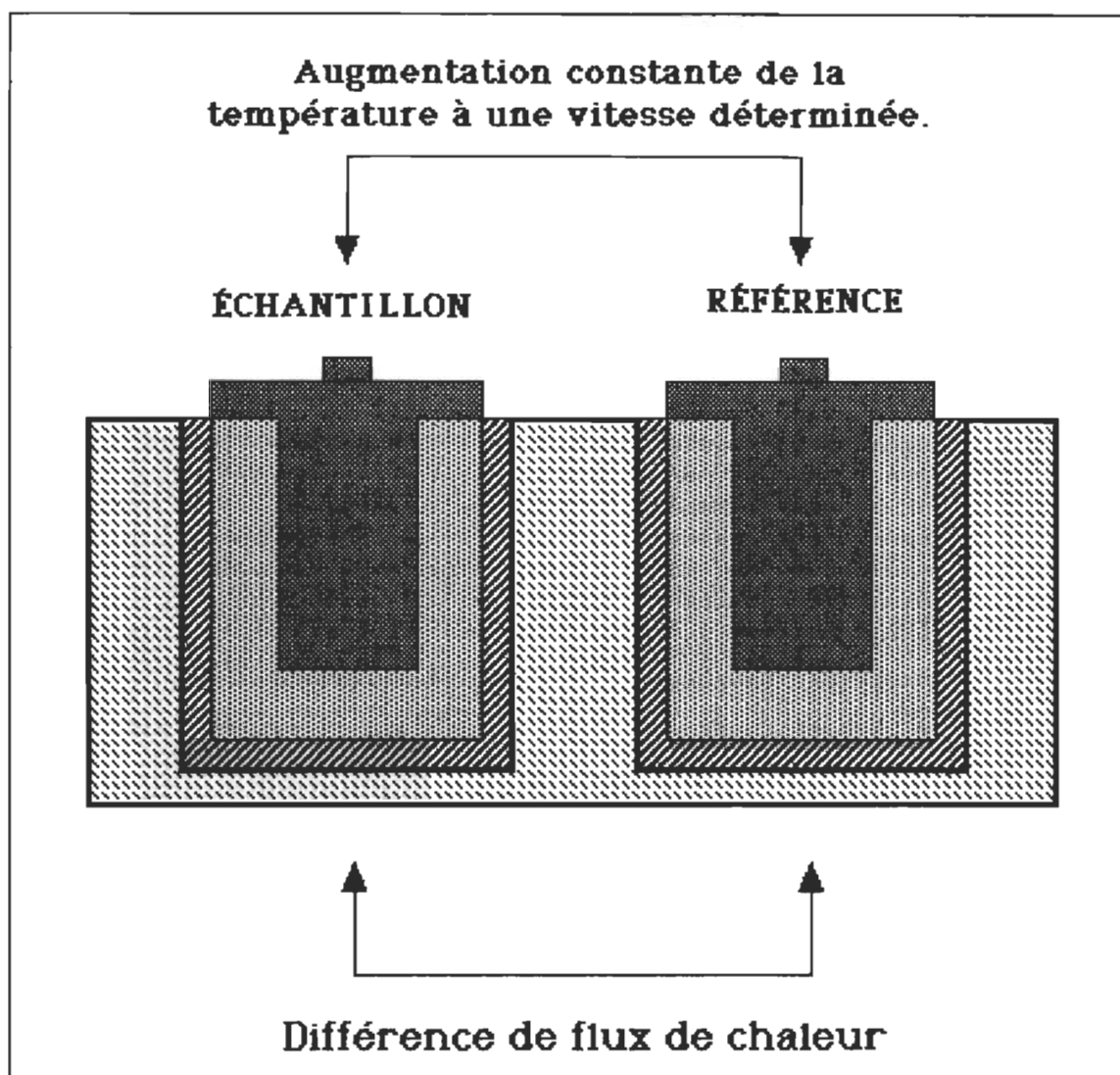


Figure 8: Représentation schématique des boucles de contrôle du DSC.

À partir du thermogramme, on peut mesurer avec précision les changements de capacité calorifique et déterminer plusieurs paramètres thermodynamiques dont la température de transition maximum (T_m), qui est la température à laquelle 50% de la réaction a eu lieu (fig.9). L'enthalpie calorimétrique (ΔH_{cal}) est déterminée en calculant l'aire sous la courbe à l'aide d'un logiciel fourni avec le calorimètre et en divisant par le

nombre de moles contenues dans l'échantillon. Pour calculer l'aire sous la courbe à l'aide du logiciel, l'expérimentateur doit déterminer les températures initiales (T_i) et finales (T_f) de la transition. Le choix de T_i et T_f est donc très subjectif. Le logiciel calcule ensuite l'aire sous la courbe en traçant une ligne droite rejoignant T_i et T_f .

D'autres paramètres calorimétriques peuvent être mesurés à l'aide du calorimètre. Ainsi, l'enthalpie de Van't Hoff est calculée en utilisant l'équation suivante:

$$\Delta H_{vH} = 4RT_m^2 / \Delta T_{1/2}$$

où $\Delta T_{1/2}$ correspond à la différence de température à la moitié de la hauteur de la transition principale. L'enthalpie de Van't Hoff représente l'enthalpie calculé pour un ensemble de molécules, appelé unité coopérative (CU), passant d'un état à un autre en même temps. Le ΔH_{vH} représente donc l'enthalpie normalisée par mole d'unité coopérative alors que le ΔH_{cal} représente l'enthalpie obtenue directement par DSC et normalisée par mole de molécules. Par exemple, dans le cas d'une transition de phase de phospholipides, si 100 molécules de lipides passent d'un état gel à fluide (voir page suivante) en même temps, la valeur de CU est de 100 et le ΔH_{vH} est 100 fois plus grand que le ΔH_{cal} .

À partir de l'enthalpie de van't Hoff, on peut donc calculer l'unité coopérative (CU) qui représente le degré de coopérativité entre les molécules durant la transition de phase et qui se définit comme $CU = \Delta H_{vH} / \Delta H_{cal}$. Une transition de phase soudaine et étroite signifie qu'il y a une grande coopérativité entre les molécules et que la valeur du CU est grande. Il est important de mentionner que le ΔH_{vH} se calcule seulement dans le cas d'un processus réversible. La dénaturation de l'actine étant un processus irréversible, on ne peut donc

appliquer la notion d'enthalpie de Van't Hoff et d'unité coopérative.

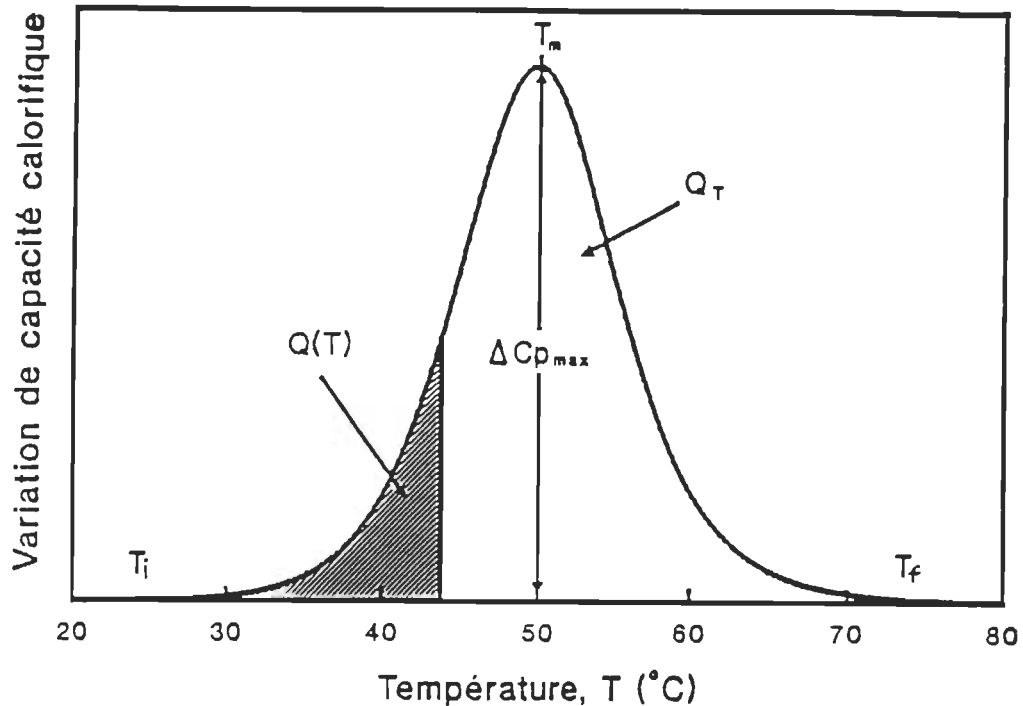


Figure 9: Thermogramme idéal. Processus endothermique se traduisant par une déviation positive de la ligne de base. L'enthalpie est déterminée en calculant l'aire sous la courbe. T_m : température de transition.

i) La transition de phase des phospholipides.

Une des caractéristiques importantes des phospholipides est leur transition de phase. Cette transition correspond au passage d'un état "gel" à un état "liquide-cristallin" ou "fluide" qui se produit lorsqu'on augmente la température (processus de fusion) (21, 22, 23, 63, 64). L'état "gel" est caractérisé par une phase quasi-cristalline où les chaînes d'acides gras sont en conformation tout-*trans*. Il y a une grande cohésion entre les molécules de phospholipides qui forment une bicouche plus épaisse et plus rigide.

L'état "liquide-cristallin" est caractérisé par une phase beaucoup plus fluide où les molécules de phospholipides sont plus mobiles à l'intérieur d'une bicouche plus lâche et moins épaisse. La figure 10 représente les changements d'une bicouche lors de la transition de phase. Il est à noter que la transition de phase d'un phospholipide est un processus réversible. Le processus de fusion d'un lipide est un phénomène endothermique. L'enthalpie calorimétrique de fusion correspond à l'énergie nécessaire pour passer d'un état "gel" à un état "liquide-cristallin".

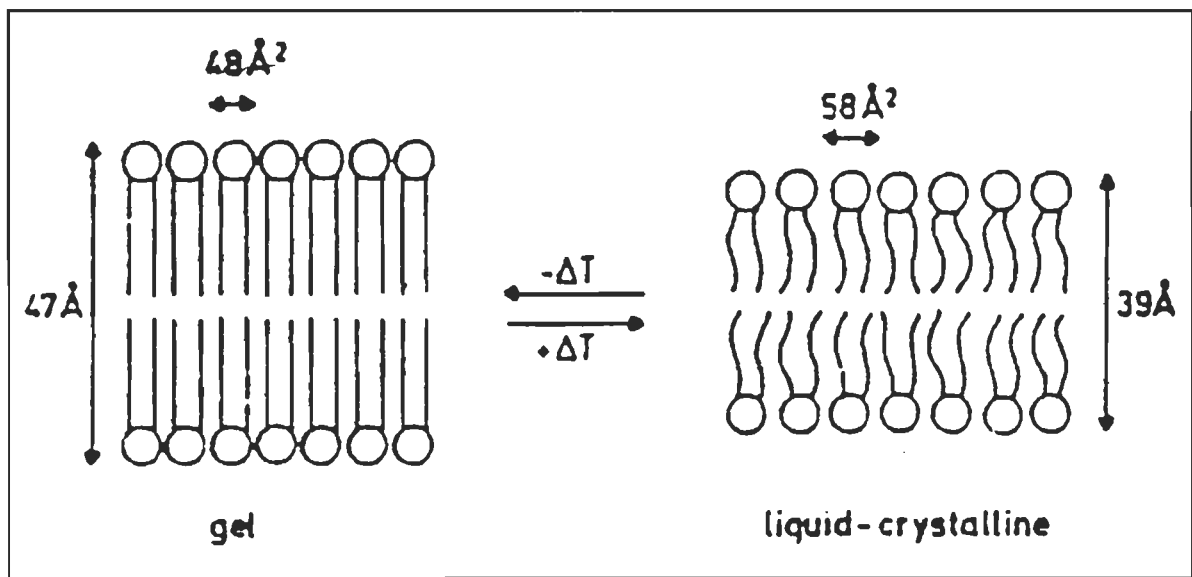


Figure 10: Représentation de la transition de phase d'une bicouche phospholipidique. Les dimensions données sont celles du DPPC dont la température de transition est d'environ 42°C (selon Papahadjopoulos et Kimelberg, 1973 (101)).

Par ailleurs, lorsque la transition de phase est soudaine et s'étend sur un faible écart de température, on dit que le processus est très coopératif. Cela signifie que toutes les

molécules de lipides qui composent la membrane artificielle participent en même temps et de la même façon au passage d'un état à un autre. Ceci se produit généralement lorsqu'un seul type de phospholipide compose la membrane. Cependant, lorsque la membrane est composée d'un mélange de phospholipides, la transition de phase est en général plus large, c'est-à-dire qu'elle se produit sur un plus grand écart de température. Les molécules ne participent pas toutes en même temps au processus. Ceci se produit, par exemple, lorsqu'il y a formation de microdomaines de phospholipides à l'intérieur de la bicouche, certains étant à l'état "gel" et d'autres à l'état "liquide-cristallin" (6, 74, 81).

ii) Effet de la température sur les protéines.

La forme active des protéines est généralement compacte et unique. Les protéines adoptent une configuration tridimensionnelle appelée structure tertiaire ou forme native. Cette configuration compacte des protéines est attribuée aux forces autoassociatives (interactions hydrophobes, interactions Van der Waals). La structure native est due à certaines propriétés des acides aminés qui composent la chaîne peptidique, entre autres à des pontages hydrogènes spécifiques à l'intérieur de la protéine. Les protéines existent donc sous deux états possibles, natif (forme fonctionnelle et compacte) ou dénaturé (forme non fonctionnelle légèrement ou totalement déployée).

Le phénomène de dénaturation thermique des protéines se produit lorsque les forces d'hydratation de résidus non polaires sont supérieures aux forces stabilisantes, telles les interactions de Van der Waals et les ponts hydrogènes (112). L'augmentation de la température a pour effet de favoriser le potentiel d'hydratation des solutions et, dans le cas des protéines, ce seuil critique est relativement peu élevé,

normalement en deçà de 100 °C. L'augmentation de la température cause donc une rupture des interactions hydrophobes et des ponts hydrogènes à l'intérieur des protéines. Les protéines passent d'un état fonctionnel (natif) à un état non fonctionnel (dénaturé). Le déploiement provoque l'exposition des résidus non polaires internes à l'eau (ou autre solvant) ce qui provoque plusieurs modifications physiques. En calorimétrie, on observe une augmentation de la capacité calorifique associée au transfert d'un composé non polaire à l'eau (111). Le $\Delta H_{c,a1}$ correspond donc à l'énergie qu'il faut fournir pour briser les liens hydrophobes et hydrogènes d'une protéine, pour passer de l'état natif à dénaturé.

iii) Manipulations pour la technique de DSC.

Les solutions d'actine seule, de liposomes seuls et d'un mélange actine + liposomes sont préparées de manière à obtenir un volume final de 1 ml avec une concentration d'actine de 1.2 mg/ml et de liposomes de 4.6 mg/ml. Les solutions sont ensuite dégazées sous une cloche de verre afin d'éliminer les artefacts dus au dégazage de la solution au cours de la chauffe. La solution de polymérisation de l'actine, soit 2 mM Mg^{2+} et, selon le cas, différentes concentrations d'une solution de KCl, préalablement dégazées, sont ensuite ajoutées à l'actine seule, aux liposomes seuls et au mélange actine-liposomes.

Ces solutions sont ensuite déposées dans la cuvette en acier inoxydable du calorimètre différentiel à balayage Hart 4207. Le poids final d'échantillon déposé dans chaque cuvette est de 900 mg. La ligne de base est tracée par la suite pour chaque cellule en utilisant le tampon G. Le taux de chauffe utilisé pour toutes les expériences est de 40 °C/h.

Par ailleurs, Pigeon, 1992 (107) a démontré que l'utilisation de différentes préparations de liposomes augmente le pourcentage d'erreur sur le calcul de la température de transition et de l'enthalpie calorimétrique. C'est pourquoi une même préparation de liposomes et une même préparation d'actine ont été utilisées pour chaque série d'expériences.

2.5.2- Microscopie électronique.

Une goutte du mélange actine-liposomes, dans les mêmes conditions que pour la calorimétrie est diluée 15 fois avec du tampon G + Mg^{2+} , puis déposée sur une grille recouverte de formvar-carbone. On enlève le surplus à l'aide d'un papier filtre. La préparation est colorée négativement avec de l'acétate d'uranyl 1% en solution aqueuse. Les préparations sont observées à l'aide d'un microscope électronique à transmission Phillips 201 fonctionnant à 60 ou 80 kV.

Pour quantifier l'interaction actine-liposomes en microscopie électronique, un coefficient a été défini par Gicquaud et Cermakian. Le système consiste à observer un minimum de 150 liposomes pour chaque préparation en microscopie électronique et de donner à chacun une valeur entre 0 et 2. Si l'interaction est complète, c'est-à-dire que les filaments d'actine recouvrent plus de 85 % de la surface du liposome, le coefficient d'interaction est de 2. Si les filaments d'actine recouvrent entre 15 et 85 % de la surface du liposome, l'interaction est alors partielle et la valeur du coefficient d'interaction est de 1. Si aucune interaction n'est observée, soit moins de 15 % de filaments d'actine recouvrant le liposome, la valeur de 0 est donnée. Les valeurs de 15 et 85 % sont déterminées par l'expérimentateur lors de l'observation directe des grilles au microscope électronique. On obtient ainsi un coefficient d'interaction (C.I.) indiquant le degré d'intensité de l'interaction actine-lipides membranaires.

3. RÉSULTATS

Cette partie est divisée en quatre sections qui représentent les résultats obtenus avec les différents lipides utilisés pour ce projet. Chaque section est divisée en deux sous-sections où on présente d'abord les résultats obtenus par calorimétrie différentielle à balayage (DSC), et ensuite, les résultats de la microscopie électronique.

Avant de commencer l'analyse des résultats, il est essentiel d'expliquer un point important concernant la technique de DSC. La calorimétrie différentielle à balayage est une méthode indirecte pour mesurer les interactions protéines-lipides. Ainsi, une modification du thermogramme de dénaturation de l'actine ne constitue pas nécessairement une preuve d'interaction avec le liposome. On n'observe pas cette interaction en soi, mais son effet présumé sur la dénaturation. On peut donc parfaitement envisager que cette interaction ne survienne que sous forme d'un effet des lipides sur le processus de dénaturation et d'agrégation de la protéine. On ne conclura qu'à une interaction "vraie" si des données en sens contraire des types suivants sont obtenues:

- Démonstration directe de cette interaction par microscopie électronique.
- Modification du thermogramme du liposome dont la T_m est inférieure à celle de l'actine.

3.1 - Interaction de l'actine-F avec les liposomes composés seulement de DMPC ou d'un mélange de DMPC:DMPE (1:1).

Les résultats obtenus avec les lipides neutres, soit les liposomes composés seulement de DMPC et les liposomes composés d'un mélange de DMPC:DMPE (1:1), sont très similaires et sont donc traités ensemble.

3.1.1 - Étude de l'interaction actine-liposomes composés seulement de DMPC ou d'un mélange de DMPC:DMPE (1:1) par calorimétrie différentielle à balayage (DSC).

i) En absence de cations monovalents.

Les figures 11 et 12 représentent les thermogrammes d'actine seule, de liposomes seuls ou d'un mélange actine-liposomes. Sur la figure 11 on observe trois courbes: 1) la courbe de transition de l'actine-F seule servant de contrôle (vert), 2) la courbe de transition du liposome seul servant aussi de contrôle (rouge), 3) la courbe de transition du mélange d'actine et de liposomes (bleu foncé).

On remarque d'abord que la transition de l'actine-F seule se fait en deux étapes. Le premier pic représente la réaction endothermique de dénaturation de la protéine dont la température de transition (T_m) se situe à 69.0 °C. L'enthalpie calorimétrique (ΔH_{cal}) de la réaction est d'environ 6600 Kj/mole. Le second pic représente la réaction exothermique d'agrégation de l'actine-F qui suit sa dénaturation. À ce stade-ci, il est important de mentionner que seul le pic de dénaturation (endothermique) a été pris en considération lors du calcul de l'enthalpie calorimétrique. L'effet du pic

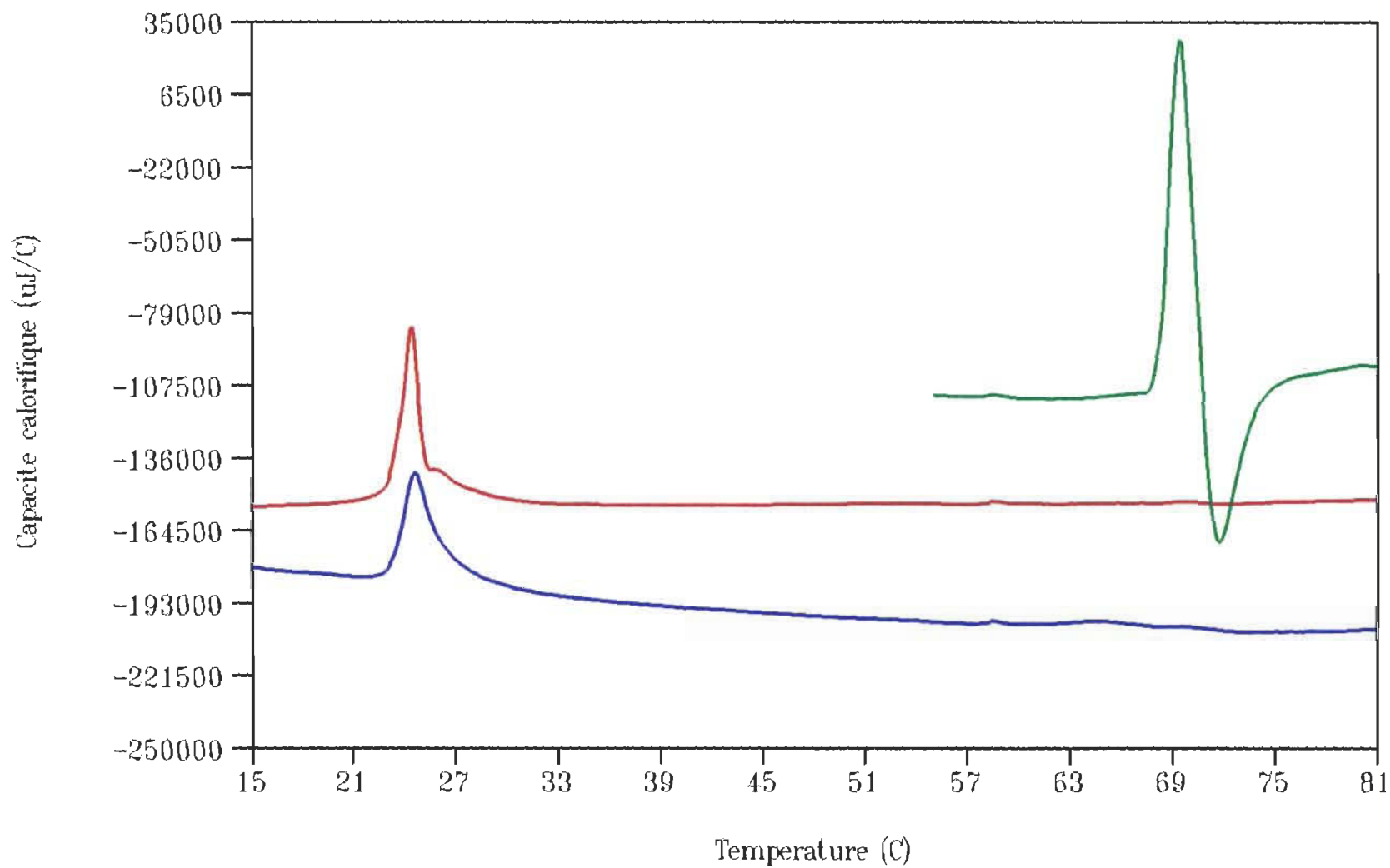
d'agrégation (exothermique) sur l'interprétation des résultats sera débattu à la section discussion.

Les préparations de liposomes seuls présentent une seule transition de phase principale dont les T_m sont de 24.3 °C pour le DMPC et de 41.3 °C pour le mélange DMPC:DMPE (1:1). Le pic qui représente la transition de phase des liposomes composés seulement de DMPC est étroit, la valeur de l'unité coopérative (CU) est de 114, ce qui signifie une grande coopérativité entre les molécules de lipides. La transition de phase des liposomes composés de DMPC:DMPE (1:1) est plus large, ce qui est normal puisque nous sommes en présence d'un mélange homogène de lipides. La température de transition du mélange, 41.3 °C, est intermédiaire entre la T_m du DMPC seul et la T_m du DMPE seul, qui sont de 24 et 50 °C respectivement.

Pour le mélange d'actine + liposomes, le changement le plus important se situe au niveau du pic de dénaturation de l'actine. En effet, on observe une disparition complète du pic de dénaturation thermique de l'actine-F en présence de liposomes (l'interprétation de ce phénomène sera débattue à la section discussion). On peut donc dire que la présence de liposomes neutres a un effet sur le processus de dénaturation de l'actine.

Figure 11: (Page suivante) Thermogrammes d'une solution d'actine seule (vert), de liposomes composés de DMPC (rouge) et du mélange actine-liposomes (bleu foncé). On remarque qu'il y a une disparition complète du pic de dénaturation de l'actine en présence de liposomes.

actine + liposomes de DMPC



Les modifications importantes des paramètres calorimétriques de l'actine et des liposomes sont résumées dans les tableaux III et IV. La température de dénaturation thermique de l'actine, en présence de liposomes, ne peut être estimée puisqu'il n'y a aucune transition et l'enthalpie calorimétrique est égale à 0 Kj/mole (tableau III).

Tableau III. Comparaison des paramètres calorimétriques de l'actine-F, seule, en présence de liposomes composés seulement de DMPC, ou d'un mélange de DMPC:DMPE (1:1).

	Transition principale	
	T_m (°C)	ΔH_{cal} (Kj/mole)
actine-F seule	69.0	6600
actine-F + DMPC	-	0
actine-F + DMPC:DMPE (1:1)	-	0

La transition de phase des liposomes est légèrement modifiée en présence d'actine. La transition principale des liposomes montre un changement significatif quant à la T_m (voir discussion). L'enthalpie calorimétrique des liposomes composés seulement de DMPC passe de 21.5 à 16.3 Kj/mole en présence d'actine-F alors que le ΔH_{cal} des liposomes formés de DMPC:DMPE (1:1) passe de 27.8 à 24.9 Kj/mole en présence d'actine (tableau IV). Compte tenu de l'écart type (voir discussion), la diminution du ΔH_{cal} des liposomes composés

seulement de DMPC en présence d'actine-F est significative alors que la baisse du ΔH_{cal} des liposomes composés de DMPC:DMPE (1:1) n'est pas significative. La présence d'actine modifie le thermogramme des liposomes composés seulement de DMPC alors que le thermogramme des liposomes composés de DMPC:DMPE (1:1) est peu modifié. D'ailleurs, le pic de la transition principale des liposomes composés de DMPC est légèrement plus large indiquant une diminution de la coopérativité entre les molécules de lipides. L'unité coopérative baisse de 114 à 90 en présence d'actine-F.

Tableau IV. Comparaison des paramètres calorimétriques des liposomes composés seulement de DMPC ou d'un mélange de DMPC:DMPE (1:1), seuls ou en présence d'actine.

	Transition principale			CU
	T_m (°C)	ΔH_{cal} (Kj/mole)	ΔH_{vH} (Kj/mole)	
DMPC seul	24.3	21.5	2250	114
DMPC + actine-F	24.6	16.3	1473	90
DMPC:DMPE seul	41.3	27.8	-	-
DMPC:DMPE + actine-F	41.1	24.9	-	-

Ces résultats obtenus en calorimétrie montrent que les liposomes neutres ont un effet sur le processus de dénaturation de l'actine. Cet effet pourrait être dû à une interaction entre l'actine et les liposomes puisqu'on observe une modification du thermogramme des liposomes, en particulier celui des liposomes composés seulement de DMPC.

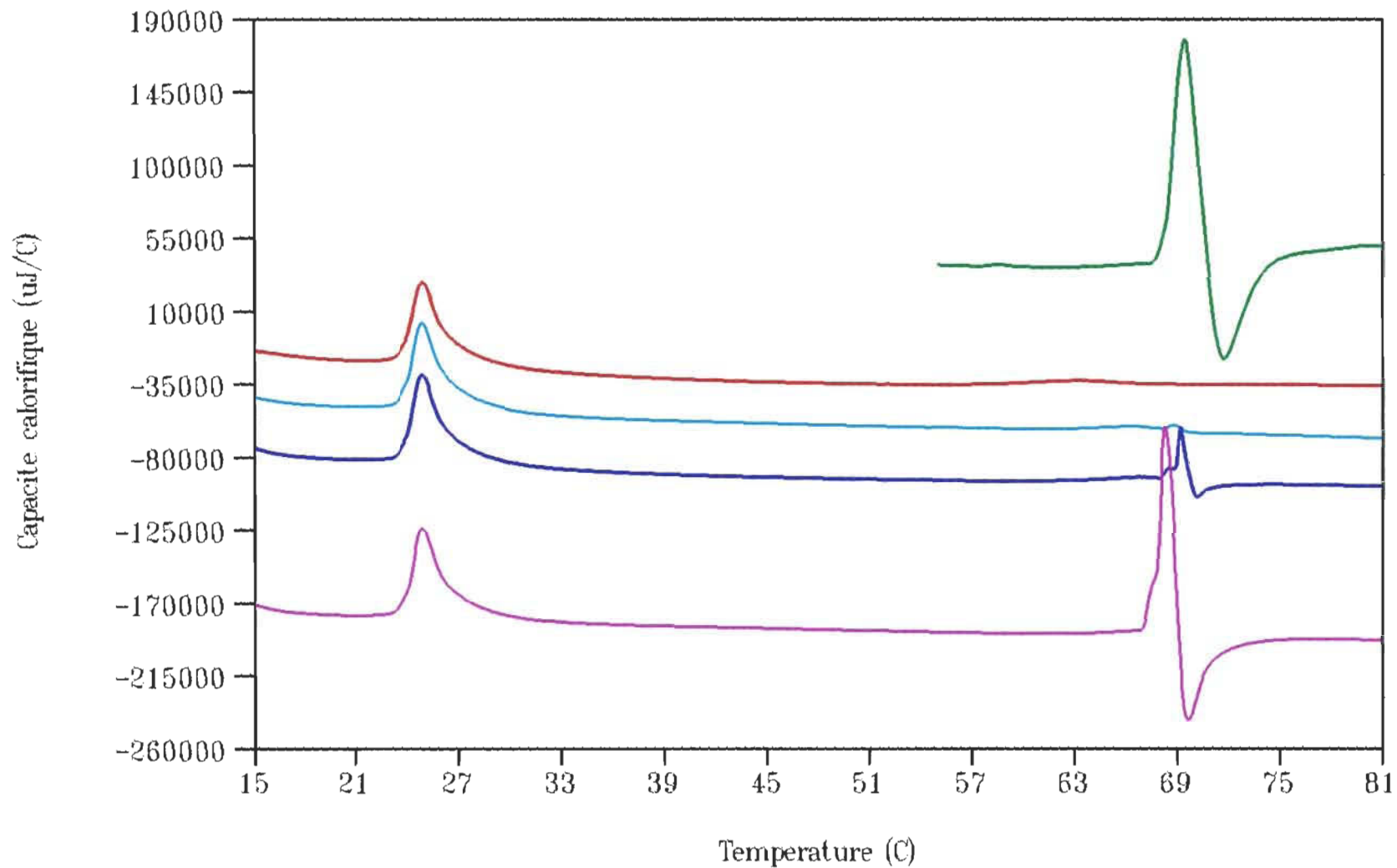
ii) Effet des cations monovalents sur l'interaction actine-liposomes neutres.

Le mécanisme proposé pour expliquer l'interaction directe actine-lipides (voir section 1.5.1) suggère que l'interaction est de type électrostatique. Si cette hypothèse est vraie, on devrait modifier l'interaction en changeant les conditions ioniques. La figure 12 représente les thermogrammes d'un mélange actine + liposomes neutres obtenus en présence de concentrations croissantes de KCl, allant de 0 à 150 mM.

Le profil du pic de dénaturation thermique de l'actine-F seule est affecté par la présence de KCl (non montré). La T_m de l'actine-F seule augmente légèrement avec l'addition de KCl, passant de 69 °C, en présence de 0 mM KCl, à 69.8 °C en présence de 70 mM KCl (fig.13). Par ailleurs, le ΔH_{cal} de dénaturation de l'actine-F seule diminue avec l'addition de KCl pour se stabiliser à environ 3800 Kj/mole en présence de 100 mM KCl (fig.14). L'effet du KCl sur la dénaturation thermique de l'actine-F seule sera expliqué à la section discussion.

Figure 12: (Page suivante) Thermogrammes du mélange actine-liposomes composés de DMPC en présence d'une concentration croissante de KCl: 0 mM (rouge), 20 mM (bleu), 50 mM (bleu foncé) et 100 mM (mauve). L'actine seule servant de contrôle est représentée en vert. On observe une réapparition progressive du pic de dénaturation de l'actine avec l'augmentation de la concentration de KCl.

actine + liposomes de DMPC



On n'observe pas de changement des thermogrammes (non montré), de la T_m et du ΔH_{cal} des liposomes seuls en présence de concentrations accrues de KCl (fig.15, 16, 17 et 18).

Sur la figure 12, les thermogrammes des mélanges actine + liposomes neutres obtenus en présence de concentrations accrues de KCl montrent des changements importants. En présence de concentrations de KCl supérieures à 30 mM, on observe une réapparition progressive de la courbe de dénaturation thermique de l'actine-F. L'effet des liposomes de charge globale neutre sur le processus de dénaturation de l'actine semble donc inhibé par la présence de cations monovalents.

Le ΔH_{cal} de dénaturation de l'actine-F en présence de liposomes neutres augmente avec la concentration de KCl (fig.14). Il est important de noter que même à des concentrations élevées de KCl (150 mM), l'enthalpie calorimétrique de l'actine-F en présence de liposomes neutres reste inférieure de 900 Kj/mole pour le DMPC et de 1400 Kj/mole pour le mélange DMPC:DMPE (1:1), par rapport au ΔH_{cal} de l'actine-F seule (fig.14). Ces résultats suggèrent que les liposomes neutres ont un effet sur le processus de dénaturation de l'actine et que, cet effet est plus marqué en présence de liposomes composés de DMPC:DMPE (1:1), même à des concentrations élevées de KCl. Cet effet est toutefois faible.

La T_m de l'actine-F en présence de liposomes composés seulement de DMPC est plus basse que la T_m de l'actine-F seule en présence de KCl. On n'observe aucune modification de la T_m de l'actine en présence de liposomes composés de DMPC:DMPE (1:1) et de KCl (fig.13) Il est à noter que pour de faibles concentrations de KCl, la T_m de l'actine ne peut être mesurée

car on n'observe aucune transition. Ces résultats seront analysés plus en détail à la section discussion.

De plus, en présence d'une concentration de 150 mM de KCl, la T_m des liposomes de charge globale neutre, en présence d'actine-F, ne montre plus de changement significatif par rapport à la T_m des liposomes seuls (fig.15 et 16). Cependant, l'enthalpie des liposomes en présence de concentrations croissantes de KCl reste inférieure à celle des liposomes seuls (fig.17 et 18). Ces résultats suggèrent que les modifications du thermogramme des liposomes en présence d'actine, observées en absence de KCl, sont moindres en présence d'une grande concentration de KCl.

En résumé, les expériences effectuées par DSC ont montré que les liposomes neutres ont un effet sur le processus de dénaturation de l'actine. Cet effet pourrait être dû à une interaction entre l'actine et les lipides compte tenu que nous avons aussi observé des modifications au niveau du thermogramme des liposomes en présence d'actine. La présence de KCl inhibe partiellement l'effet observé sur les thermogrammes de transition de l'actine et des liposomes. Cependant, même à des concentrations élevées de KCl (150 mM), on observe toujours un effet mutuel de l'actine et des liposomes sur leur thermogramme de transition respectif. Les résultats suggèrent donc qu'il pourrait y avoir une faible interaction, de nature électrostatique, dans des conditions ioniques compatibles avec celles qui existent dans les cellules. De plus, nous avons montré que la substitution de la choline par l'éthanolamine ne change pas l'interaction.

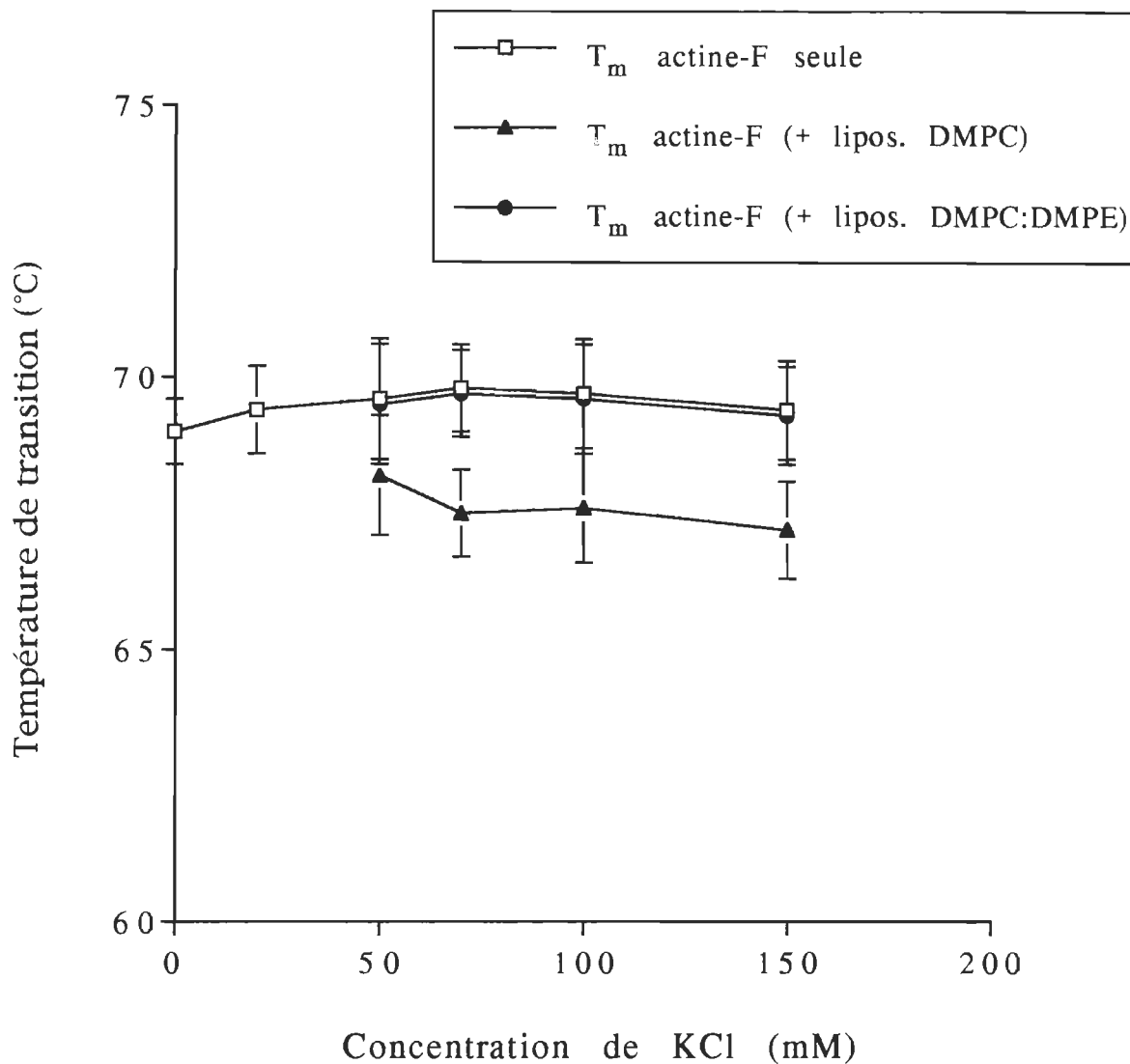


Figure 13 : Températures de transition de l'actine-F, seule ou en présence de liposomes composés seulement de DMPC ou de DMPC:DMPE (1:1), en fonction de la concentration de KCl.

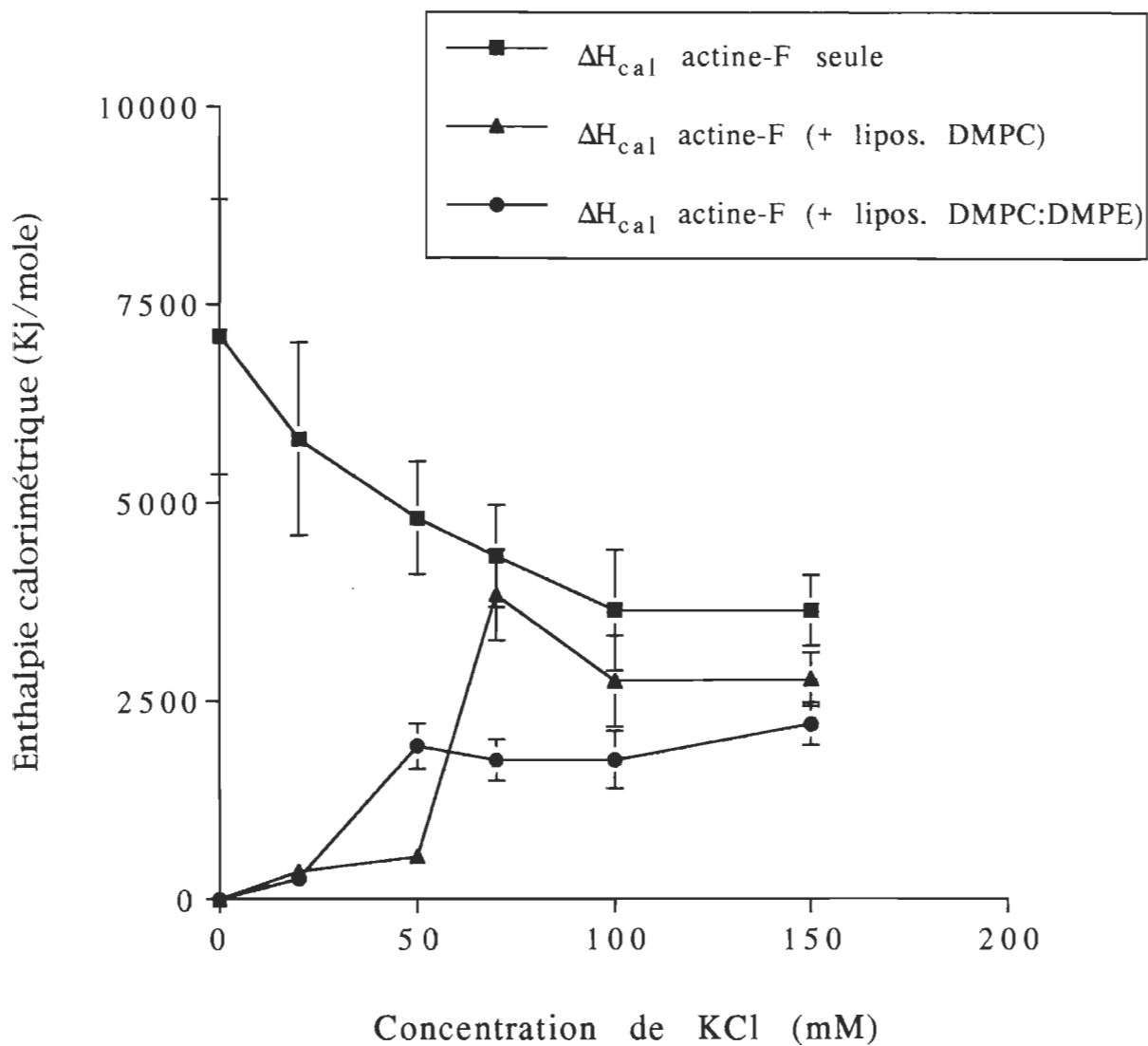


Figure 14 : Enthalpies calorimétriques de l'actine-F, seule ou en présence de liposomes composés seulement de DMPC ou de DMPC:DMPE (1:1), en fonction de la concentration de KCl.

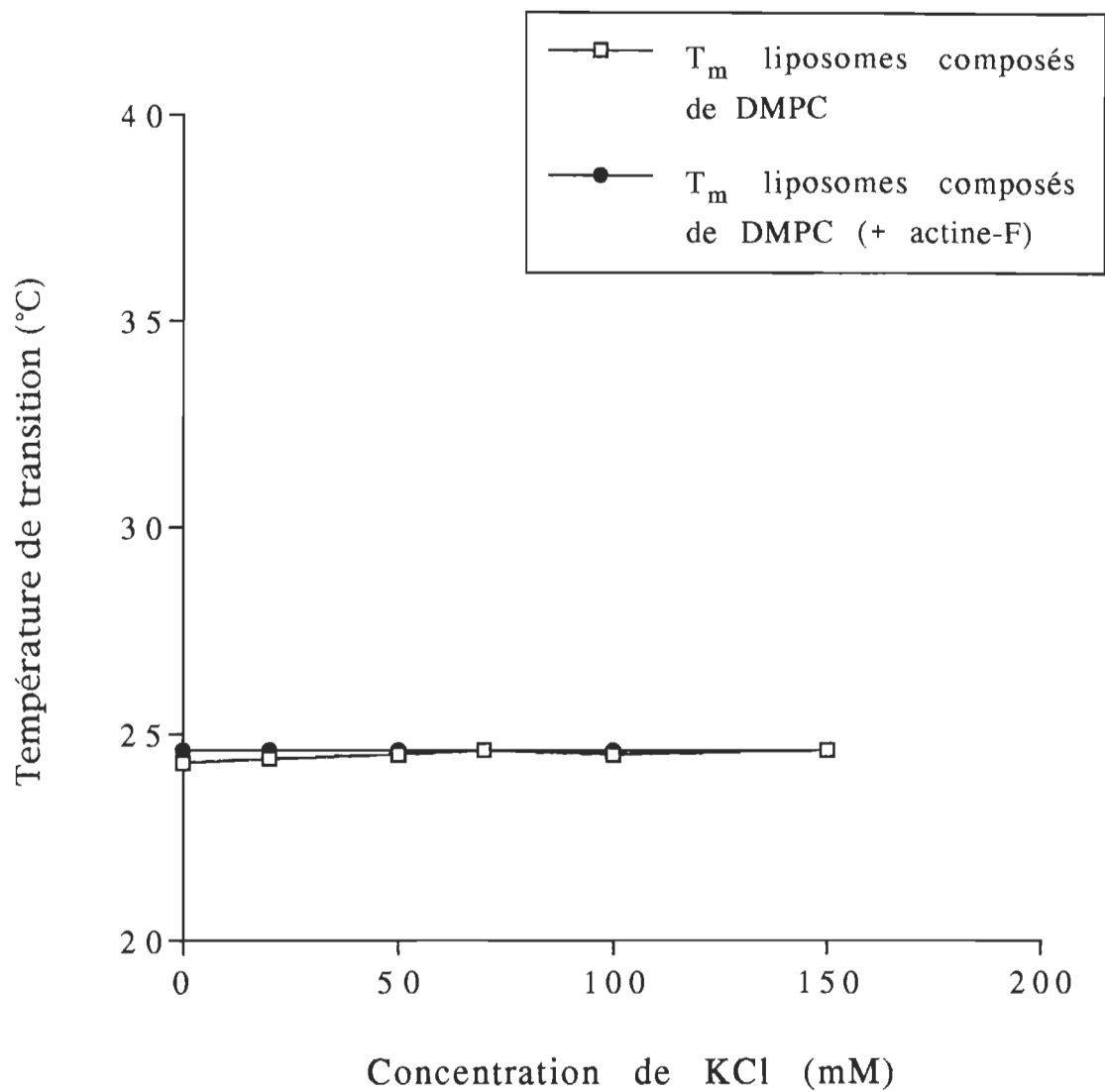


Figure 15 : Températures de transition de liposomes composés seulement de DMPC, seuls ou en présence d'actine-F, en fonction de la concentration de KCl.

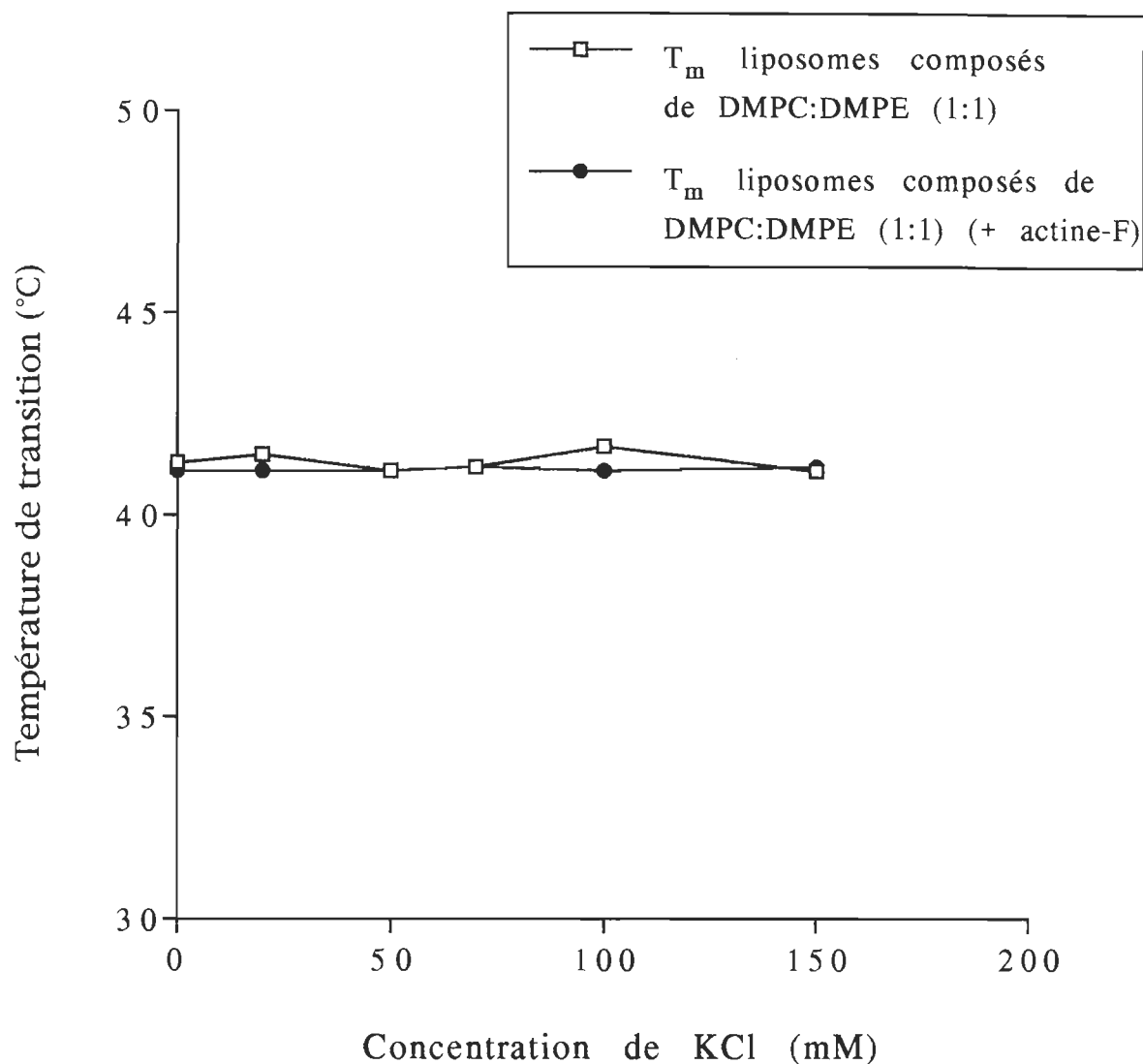


Figure 16 : Températures de transition de liposomes composés de DMPC:DMPE (1:1), seuls ou en présence d'actine-F, en fonction de la concentration de KCl.

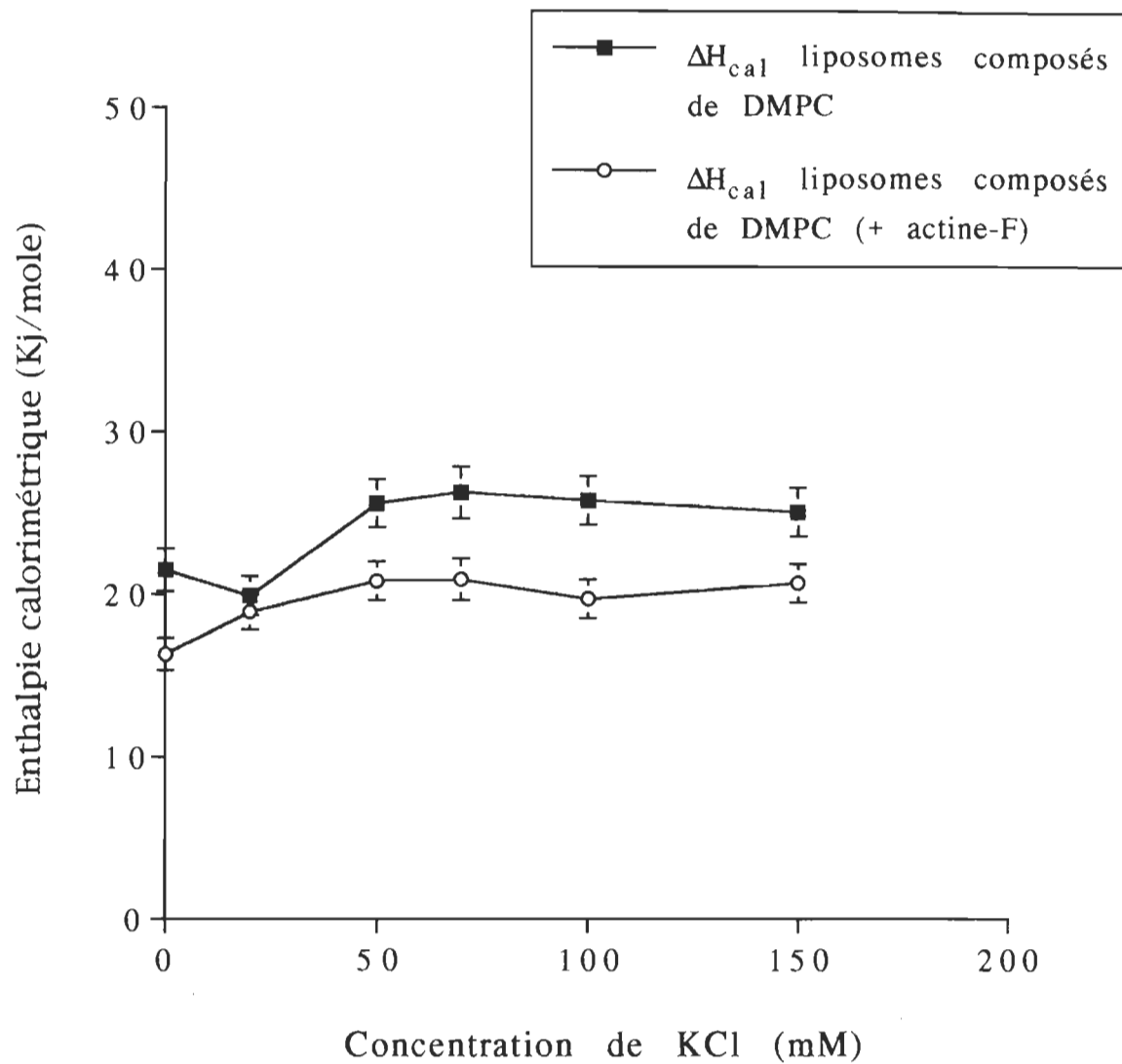


Figure 17 : Enthalpies calorimétriques de liposomes composés seulement de DMPC, seuls ou en présence d'actine-F, en fonction de la concentration de KCl.

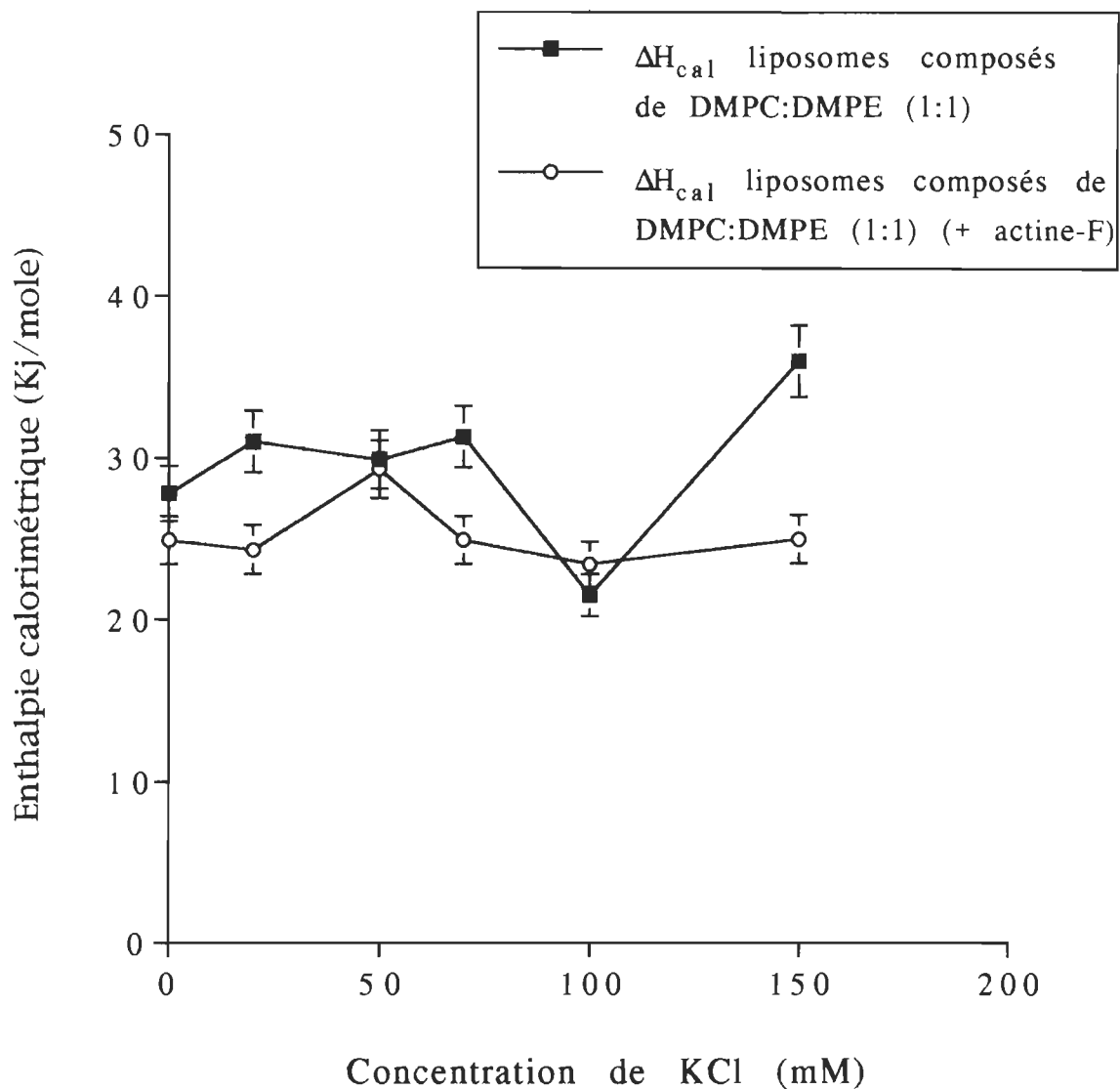


Figure 18 : Enthalpies calorimétriques de liposomes composés de DMPC:DMPE (1:1), seuls ou en présence d'actine-F, en fonction de la concentration de KCl.

3.1.2 - Étude de l'interaction actine-liposomes composés seulement de DMPC ou d'un mélange de DMPC:DMPE (1:1) par microscopie électronique.

i) En absence de cations monovalents.

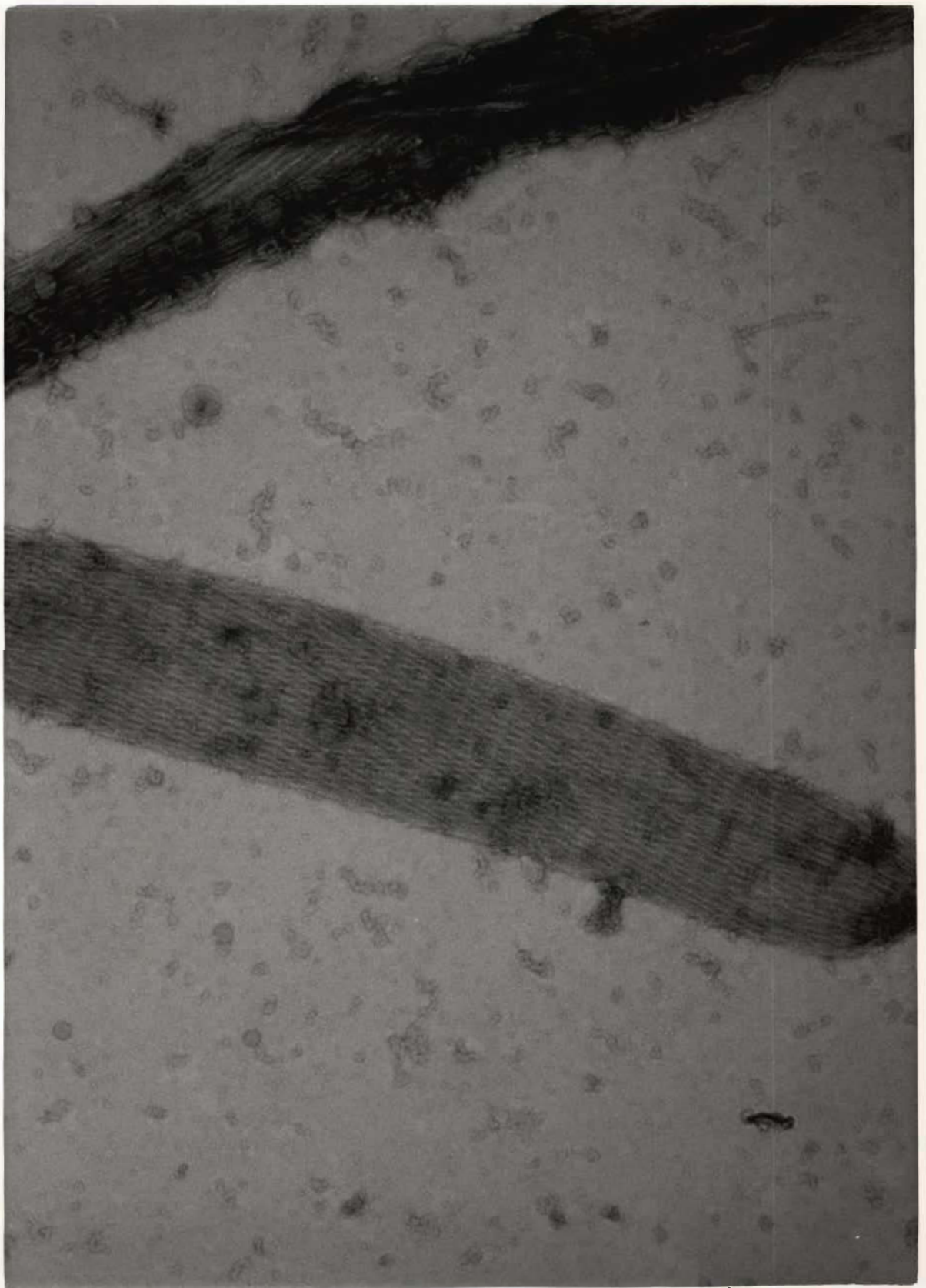
Les figures 19 et 20 représentent les résultats obtenus par microscopie électronique lorsqu'on mélange de l'actine-F avec des liposomes neutres en présence de 2 mM Mg^{2+} , dans les mêmes conditions qu'en calorimétrie. On observe la formation de structures d'actine hautement organisées à la surface des liposomes. Deux types de structures sont observés à la surface des liposomes:

1. Paracristaux d'actine: Ces structures sont formées de plusieurs rangées de filaments d'actine-F disposés de façon parallèle et qui recouvrent entièrement la surface des liposomes. On peut quelquefois observer la périodicité transversale des filaments d'actine, soit 37.5 nm, lorsque les filaments sont adjacents (fig.19).
2. L'arrangement en "filet": Ces structures sont formées de deux familles de filaments d'actine parallèles qui forment un angle. Les filaments d'actine s'entrecroisent de manière régulière à la surface des liposomes (fig.20).

Figure 19: (Page suivante) Coloration négative d'un liposome composé de DMPC:DMPE (1:1) en présence d'actine. Les filaments d'actine se disposent à la surface du liposome en formant une structure régulière appelée paracristaux. Les stries transversales représentent la périodicité des filaments d'actine qui est de 37.5 nm. Les filaments d'actine à l'extérieur du liposome s'orientent au hasard (147000x).



Figure 20: (Page suivante) Vue au microscope électronique d'une structure en "filet" formée par les filaments d'actine à la surface d'un liposome composé de DMPC. L'interaction actine-lipides entraîne la déformation du liposome. Le liposome prend alors une forme allongée (102000x).



Il est important de noter que seules les molécules d'actine à la surface des liposomes forment des structures paracrystallines ou en "filet", tandis que l'actine qui n'est pas en contact avec les liposomes est distribuée au hasard et les filaments sont désordonnés (fig.19). De plus, l'arrangement des filaments d'actine à la surface des liposomes cause fréquemment la déformation ou l'élongation de ceux-ci (fig.20).

Les résultats obtenus en microscopie électronique viennent appuyer les résultats obtenus par DSC, à savoir que l'actine-F interagit de façon directe avec les lipides de charge globale neutre. Cette interaction se traduit par la formation de structures organisées de filaments d'actine à la surface des liposomes.

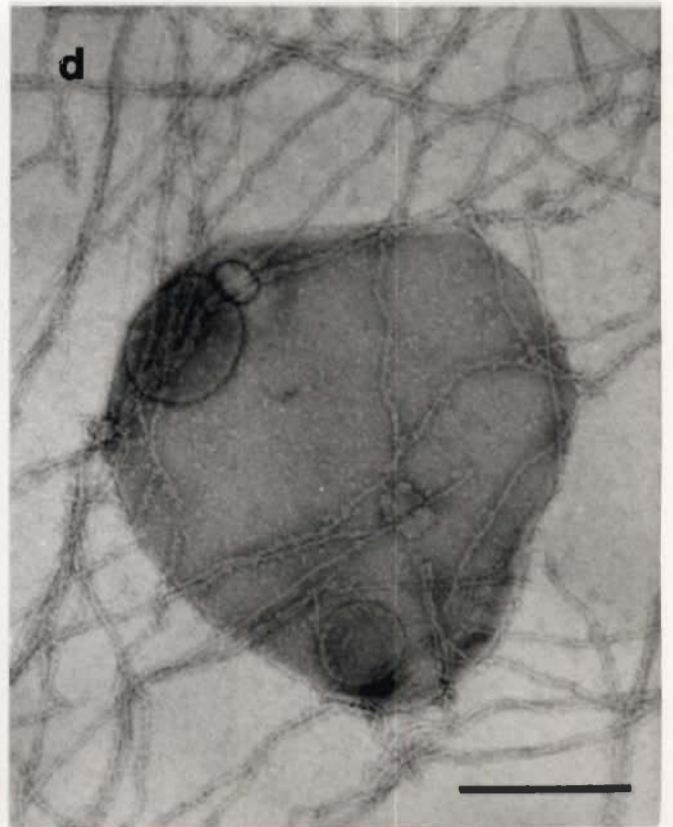
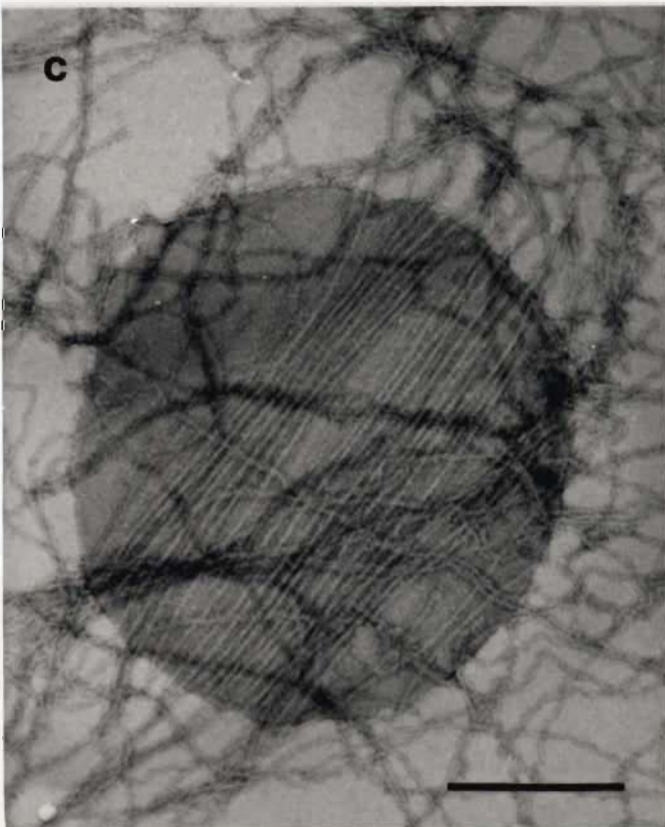
ii) Effet des cations monovalents sur l'interaction actine-liposomes neutres.

Les figures 21a, b, c et d montrent l'effet du KCl sur l'interaction actine-liposomes de charge globale neutre en microscopie électronique. On remarque sur les figures 21a et b qu'à de faibles concentrations de KCl (0 à 30 mM), il y a toujours formation de structures organisées d'actine-F à la surface des liposomes. Cependant, de plus hautes concentrations de KCl inhibent partiellement l'interaction actine-lipides. La figure 21c montre une préparation d'actine et de liposomes en présence de 70 mM KCl. On observe qu'une partie seulement du liposome est recouverte de filaments d'actine parallèles. Il n'y a plus d'arrangement d'actine à la surface des liposomes à des concentrations de KCl supérieures à 100 mM (fig.21d).

La figure 22 représente les coefficients d'interaction (C.I.) obtenus en fonction de la concentration de KCl. On remarque que l'interaction est très forte (C.I.>1.5) pour des concentrations de KCl plus faibles que 30 mM. La valeur du C.I. varie en sens contraire de la concentration de KCl pour atteindre la valeur 0 à des concentrations de KCl > 100 mM.

En résumé, la microscopie électronique confirme les résultats obtenus en calorimétrie différentielle à balayage à savoir que l'actine interagit de façon directe avec les liposomes neutres. Ces résultats sont conformes au modèle proposé qui suggère que l'actine se lie aux lipides en présence de cations divalents (Mg^{2+}). Cette interaction est de nature électrostatique puisqu'elle est inhibée par la présence de concentrations élevées de cations monovalents (KCl).

Figure 21: (Page suivante) Colorations négatives de solutions d'actine et de liposomes neutres composés de DMPC:DMPE (1:1) en présence d'une concentration croissante de KCl: a=0 mM, b=30 mM, c=70 mM et d=150 mM. On remarque que l'augmentation de la concentration de KCl inhibe partiellement la formation de structures organisées d'actine à la surface des liposomes jusqu'à une inhibition complète en présence de 150 mM de KCl. La barre représente 300 nm.



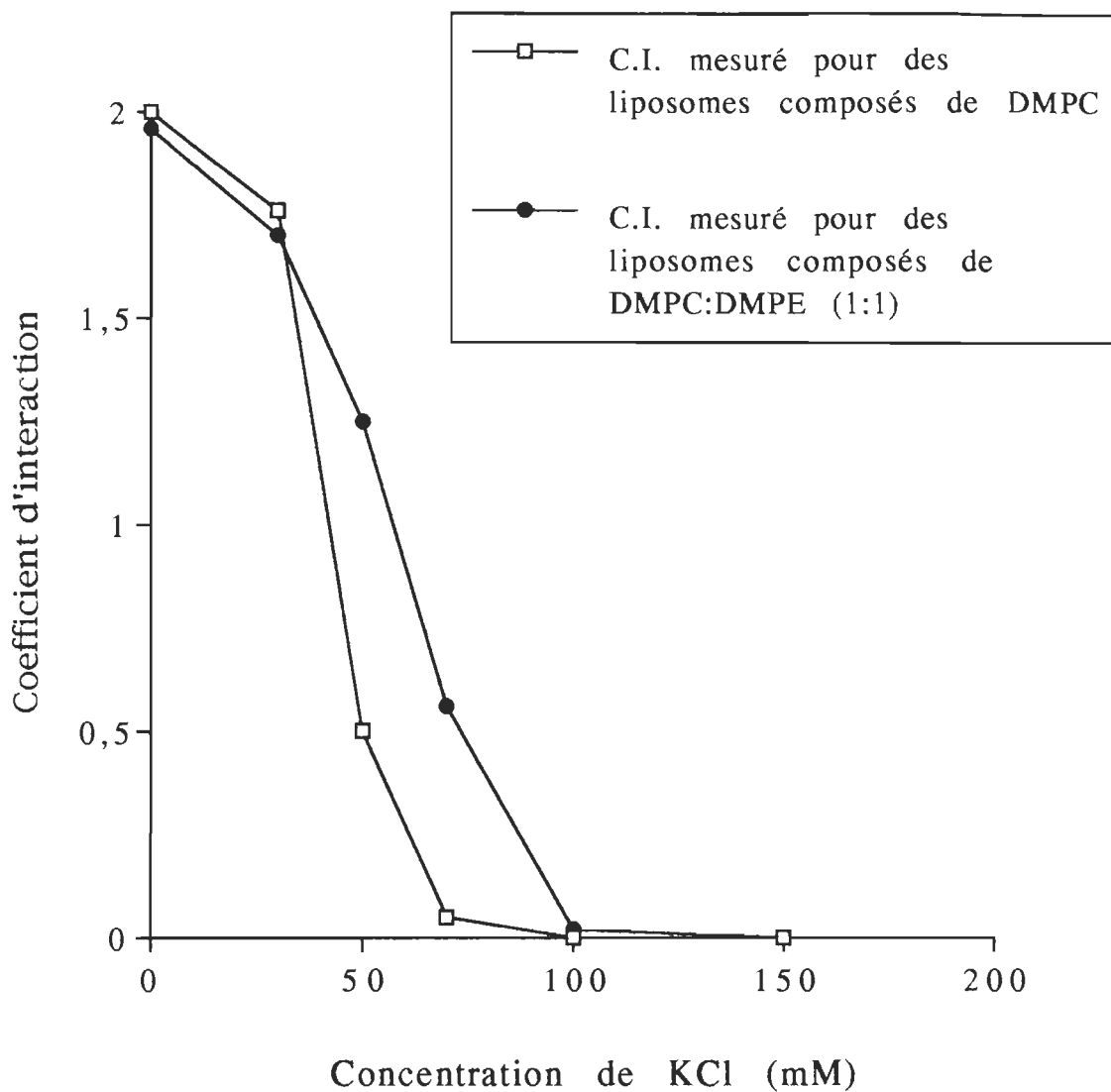


Figure 22 : Coefficient d'interaction, mesuré pour des liposomes composés de DMPC ou d'un mélange de DMPC:DMPE (1:1), en fonction de la concentration de KCl.

3.2 - Interaction de l'actine-F avec les liposomes composés d'un mélange de DMPC:DMPS (1:1) ou d'un mélange de DMPC:DMPG (1:1).

Les résultats obtenus avec les lipides chargés négativement, soit les liposomes composés d'un mélange de DMPC:DMPS (1:1) ou d'un mélange de DMPC:DMPG (1:1), sont très similaires et sont donc traités ensemble dans cette section.

3.2.1 - Étude de l'interaction actine-liposomes composés d'un mélange de DMPC:DMPS (1:1) ou d'un mélange de DMPC:DMPG (1:1) par DSC.

i) En absence de cations monovalents.

Les figures 23 et 24 représentent les thermogrammes d'actine-F seule, de liposomes seuls et du mélange actine-liposomes composés de DMPC:DMPS (1:1) ou de DMPC:DMPG (1:1). L'actine-F seule subit une transition en deux étapes: d'abord, il y a dénaturation thermique de l'actine-F suivie de l'agrégation de la protéine (voir section 3.1.1-i).

Les thermogrammes des liposomes seuls présentent une seule transition de phase avec des T_m de 37.3 °C pour le mélange DMPC:DMPS (1:1) (fig.23) et de 31.6 °C pour le mélange DMPC:DMPG (1:1) (fig.24). La transition de phase des liposomes composés de DMPC:DMPS (1:1) est large car il s'agit d'un mélange homogène de lipides dont la T_m prend une valeur intermédiaire entre la T_m du DMPC (24°C) et la T_m du DMPS (38°C). La transition de phase des liposomes composés de DMPC:DMPG (1:1) est plus étroite. Étant donné que le DMPC et le DMPG ont des T_m très voisines (24 et 23 °C respectivement), on devrait s'attendre à ce que la T_m du mélange soit autour de 23°C, ce qui n'est pas le cas. Puisque la T_m du mélange binaire

est de 31.6 °C, on en conclut qu'il y a formation d'un complexe entre les deux lipides conduisant à une structure plus stable que celle de chaque lipide seul. Les travaux de Epanand *et al.* (37) ont d'ailleurs démontré que les liposomes composés seulement de DMPG, incubés de 20 à 30 heures à de basses températures, peuvent former des phases plus stables. Ils observent une augmentation du ΔH_{cal} et de la température de transition, qui passe de 23 à 39.6 °C, des préparations de liposomes incubés à de basses températures.

Le thermogramme du mélange actine + liposomes présente des modifications importantes. En présence de liposomes, on observe un pic de dénaturation thermique de l'actine différent de celui de l'actine-F seule. Le pic exothermique, typique à l'actine-F et représentant le phénomène d'agrégation de l'actine qui suit la dénaturation, est absent (fig.23 et 24), ce qui indique un effet des lipides sur le mécanisme de dénaturation thermique de l'actine.

On peut conclure de ces résultats que les liposomes ont un effet sur la transition de phase de l'actine. De plus, étant donné que ce phénomène est différent de celui observé entre l'actine et les liposomes composés seulement de DMPC, on peut déduire que ces résultats sont dus aux molécules de DMPS ou de DMPG contenues dans les liposomes.

Figure 23: (Page suivante) Thermogrammes d'une solution d'actine seule (vert), de liposomes composés de DMPC:DMPS (1:1) (rouge) et du mélange actine-liposomes (bleu foncé). On observe une disparition complète du pic d'agrégation de l'actine (réaction exothermique) en présence de liposomes. Il y a donc un effet des liposomes anioniques (DMPS ou DMPG) sur la transition de phase de l'actine.

actine + lipos. PC:PS (1:1)

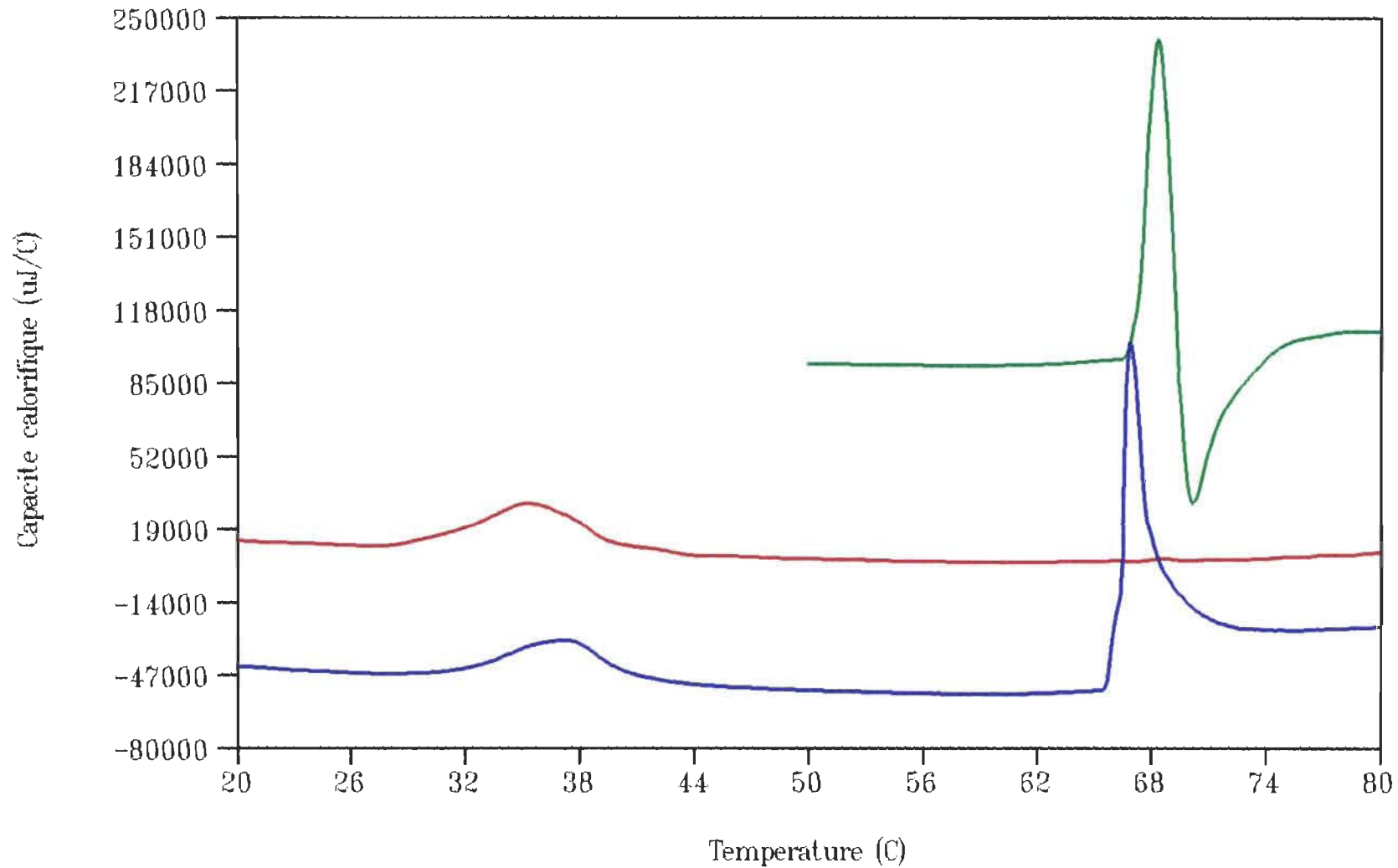
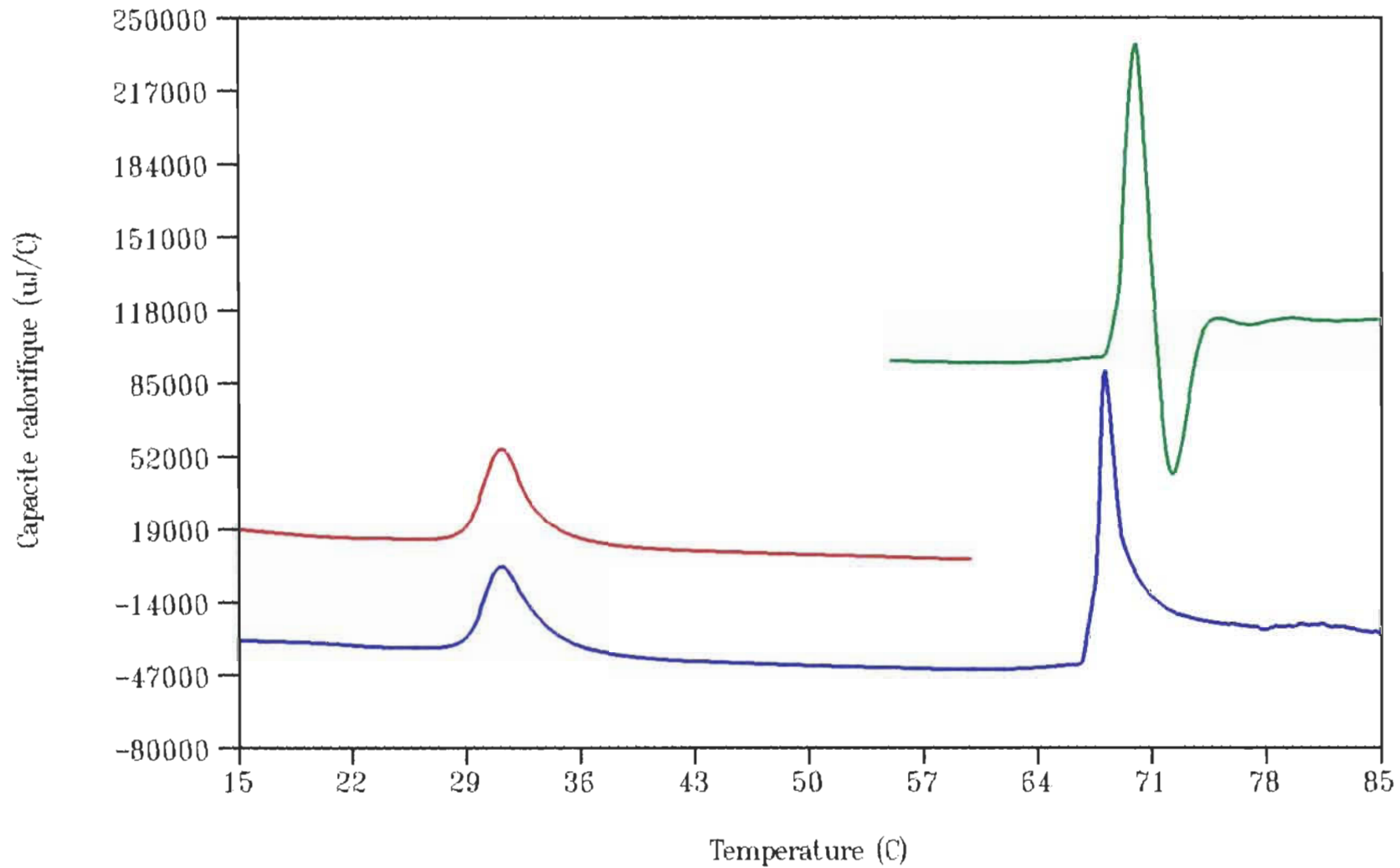


Figure 24: (Page suivante) Thermogrammes d'une solution d'actine seule (vert), de liposomes composés de DMPC:DMPG (1:1) (rouge) et du mélange actine-liposomes (bleu foncé). On observe une disparition complète du pic d'agrégation de l'actine en présence de liposomes, accompagnée d'une baisse marquée de la température de transition de l'actine.

actine + lipos. PC:PG (1:1)



Les tableaux V et VI résument les modifications des paramètres calorimétriques des liposomes, de l'actine et du mélange actine-liposomes. Les paramètres mesurés en calorimétrie, soit la T_m et le ΔH_{cal} , montrent des changements importants en ce qui concerne l'actine (tableau V). Ainsi, la T_m de l'actine seule passe de 69 °C à 66.8 °C en présence de liposomes composés d'un mélange de DMPC:DMPS (1:1) et de 69 °C à 67 °C en présence de liposomes composés de DMPC:DMPG (1:1). Le ΔH_{cal} de dénaturation de l'actine en présence de liposomes devient environ le double du ΔH_{cal} de dénaturation de l'actine-F seule. L'explication de ce résultat, pour le moins surprenant, sera donnée à la section discussion. On peut tout de même, à la lumière de ces résultats, affirmer que la présence de lipides anioniques entraîne une modification majeure du processus de dénaturation de l'actine.

Tableau V. Comparaison des paramètres calorimétriques de l'actine-F, seule, en présence de liposomes composés de DMPC:DMPS (1:1), ou d'un mélange de DMPC:DMPG (1:1).

	Transition principale	
	T_m (°C)	ΔH_{cal} (Kj/mole)
actine-F seule	69.0	6 600
actine-F + DMPC:DMPS (1:1)	66.8	13 840
actine-F + DMPC:DMPG (1:1)	67.0	11 450

Le tableau VI résume les variations de la température de transition et du ΔH_{cal} des liposomes composés de DMPC:DMPS (1:1) ou de DMPC:DMPG (1:1) en présence et en absence d'actine. La transition de phase des liposomes composés d'un mélange de DMPC:DMPG (1:1) est modifiée en présence d'actine (fig.24). On remarque que le pic de la transition est légèrement plus large, la valeur de $\Delta T_{1/2}$ passant de 2.6 °C, pour le liposome seul, à 3.4 °C pour le liposome en présence d'actine. L'enthalpie calorimétrique diminue en présence d'actine, passant de 32.6 KJ/mole pour le liposome seul à 25.9 KJ/mole pour le liposome en présence d'actine.

Les préparations de liposomes composés d'un mélange de DMPC:DMPS (1:1) se comportent différemment en présence d'actine. Ainsi, la T_m passe de 37.3 °C pour le liposome seul à 38.5 °C pour le liposome en présence d'actine. Par contre, le ΔH_{cal} ne diminue pas de façon significative (voir discussion). Le pic de transition des liposomes composés d'un mélange de DMPC:DMPS (1:1) est un peu plus étroit (fig.23), la valeur de $\Delta T_{1/2}$ passant de 6.9 °C, pour le liposome seul, à 6 °C pour le liposome en présence d'actine. Il semble donc que l'actine augmente le degré de coopérativité entre les molécules de lipides à l'intérieur de la bicouche des membranes. Ces résultats indiquent donc que l'actine a un effet sur la transition des liposomes. Cependant, cet effet dépend de la composition en phospholipides des liposomes.

Tableau VI Comparaison des paramètres calorimétriques des liposomes composés d'un mélange de DMPC:DMPS (1:1) ou de DMPC:DMPG (1:1), seuls ou en présence d'actine-F.

	Transition principale	
	T_m (°C)	ΔH_{cal} (Kj/mole)
DMPC:DMPS seul	37.3	23.1
DMPC:DMPS + actine-F	38.5	22.1
DMPC:DMPG seul	31.6	32.6
DMPC:DMPG + actine-F	31.5	25.9

Nous avons montré que les liposomes ont un effet sur l'actine. Cet effet se traduit par une disparition complète du pic d'agrégation de l'actine après sa dénaturation, et par une diminution marquée de la température de dénaturation thermique de l'actine. Par ailleurs, la transition de phase des liposomes est aussi affectée par la présence d'actine. La modification du thermogramme de transition des liposomes indique qu'il pourrait y avoir une interaction entre l'actine et les liposomes. Ces résultats sont complètement différents de ceux obtenus avec les liposomes composés seulement de DMPC, ce qui indique que le phénomène observé avec les liposomes

composés de DMPC:DMPS (1:1) ou de DMPC:DMPG (1:1) est dû aux molécules de DMPS ou de DMPG.

ii) Effet des cations monovalents sur l'interaction entre l'actine et les liposomes composés d'un mélange de DMPC:DMPS (1:1) ou de DMPC:DMPG (1:1).

Pour comprendre la nature du phénomène observé entre l'actine et les liposomes composés de DMPC:DMPS (1:1) ou de DMPC:DMPG (1:1), nous avons étudié l'effet du KCl en mesurant les transitions de phase de ces préparations en présence de quantités croissantes de cations monovalents. La figure 25 représente les thermogrammes du mélange actine + liposomes obtenus en présence de différentes concentrations de KCl.

Les cations monovalents ont un effet sur la dénaturation thermique de l'actine-F seule (pour plus de détails, vous référez à la section 3.1.1-ii, fig.13 et 14). Par ailleurs, la transition de phase des liposomes seuls est légèrement modifiée en présence de KCl. On observe toujours une seule transition principale dont la T_m diminue de façon nette avec l'augmentation de la concentration de KCl (fig.28 et 29). Le ΔH_{cal} des liposomes composés de DMPC:DMPS (1:1) augmente en présence de cations monovalents pour se stabiliser à environ 28 KJ/mole en présence de 20 à 30 mM de KCl (fig.30). Le ΔH_{cal} des liposomes composés de DMPC:DMPG (1:1) se comporte différemment puisqu'il diminue pour se stabiliser, lui aussi, à environ 28 KJ/mole en présence de 50 mM de KCl (fig.31).

Lorsqu'on met le mélange actine + liposomes en présence de concentrations accrues de KCl, on observe des changements mineurs du thermogramme de dénaturation de l'actine. Ainsi, le profil du pic de dénaturation de l'actine en présence de liposomes a toujours le même aspect, c'est-à-dire un pic de dénaturation étroit et absence du pic d'agrégation caractéristique à l'actine-F faiblement concentrée, pour toutes les concentrations de KCl expérimentées (fig.25).

En présence de liposomes, on observe que la température de dénaturation de l'actine augmente avec la concentration de KCl (fig.26). Par contre, le ΔH_{cal} de dénaturation de l'actine ne montre pas de variation par rapport au ΔH_{cal} de l'actine seule. À toutes les concentrations de KCl testées, on a donc un ΔH_{cal} de l'actine en présence de liposomes d'environ le double de celui de l'actine seule (fig.27). Le profil des transitions de phase (fig.25) ainsi que la T_m (fig.28 et 29) et l'enthalpie calorimétrique (fig.30 et 31) des liposomes, en présence d'actine, montrent peu de changements avec l'addition de concentrations croissantes de KCl.

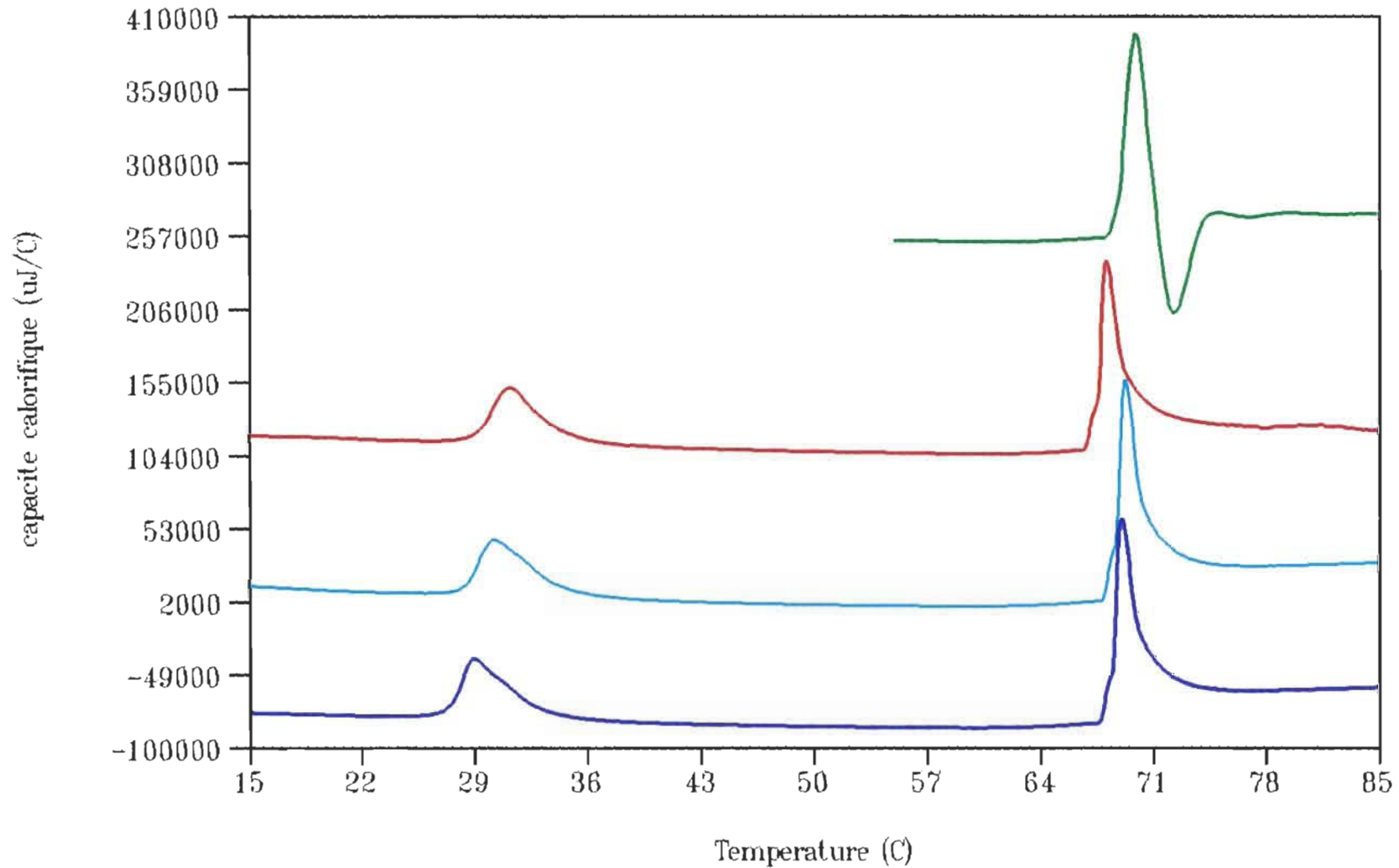
À partir de ces résultats, on peut donc conclure que le KCl n'influence pas l'effet des liposomes sur le processus de dénaturation de l'actine.

En résumé, les expériences effectuées par calorimétrie différentielle à balayage ont permis de montrer que les liposomes composés d'un mélange de DMPC:DMPS (1:1) ou de DMPC:DMPG (1:1) ont un effet sur l'actine. Cet effet se traduit par une disparition complète du pic d'agrégation de l'actine-F. Cet effet est différent de celui observé entre l'actine et les liposomes composés seulement de DMPC, ce qui signifie que le phénomène est dû aux molécules de DMPS ou de DMPG que contiennent les liposomes. La modification du thermogramme des liposomes est une indication qu'il pourrait y avoir une

interaction entre l'actine et les liposomes. L'étude du KCl a permis de démontrer que l'effet des liposomes sur le processus de dénaturation de l'actine n'est pas influencé par la présence de cations monovalents. Il semble donc que ce phénomène ne soit pas de nature électrostatique (voir discussion).

Figure 25: (Page suivante) Thermogrammes du mélange actine-liposomes composés de DMPC:DMPG (1:1) en présence d'une concentration croissante de KCl: 0 mM (rouge), 50 mM (bleu) et 150 mM (bleu foncé). L'actine seule servant de contrôle est en vert. On voit que le KCl n'inhibe pas l'effet des liposomes sur le processus de dénaturation de l'actine.

actine + lipos. PC:PG (1:1)



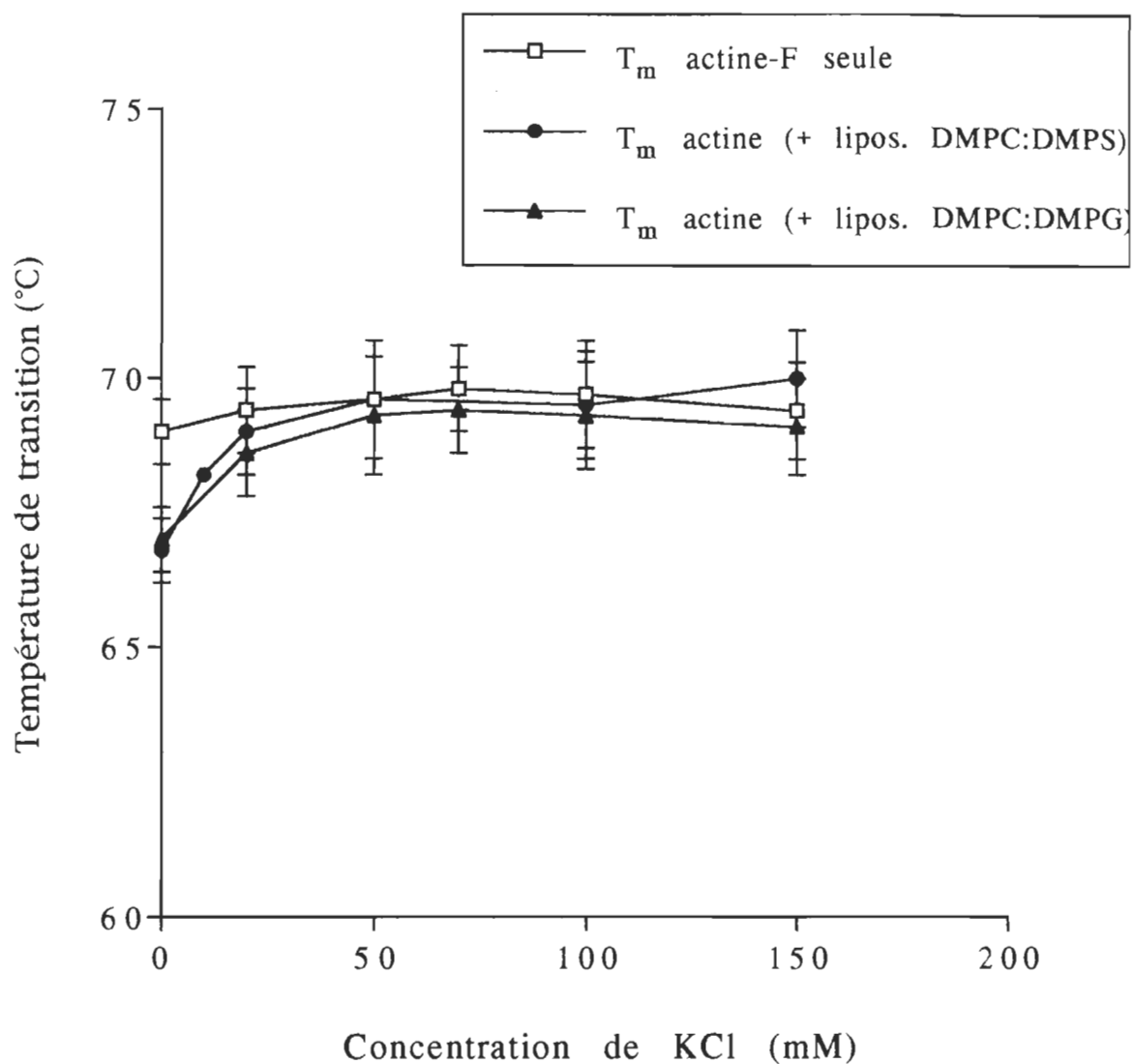


Figure 26 : Températures de transition de l'actine, seule ou en présence de liposomes composés de DMPC:DMPS (1:1) ou de DMPC:DMPG (1:1), en fonction de la concentration de KCl.

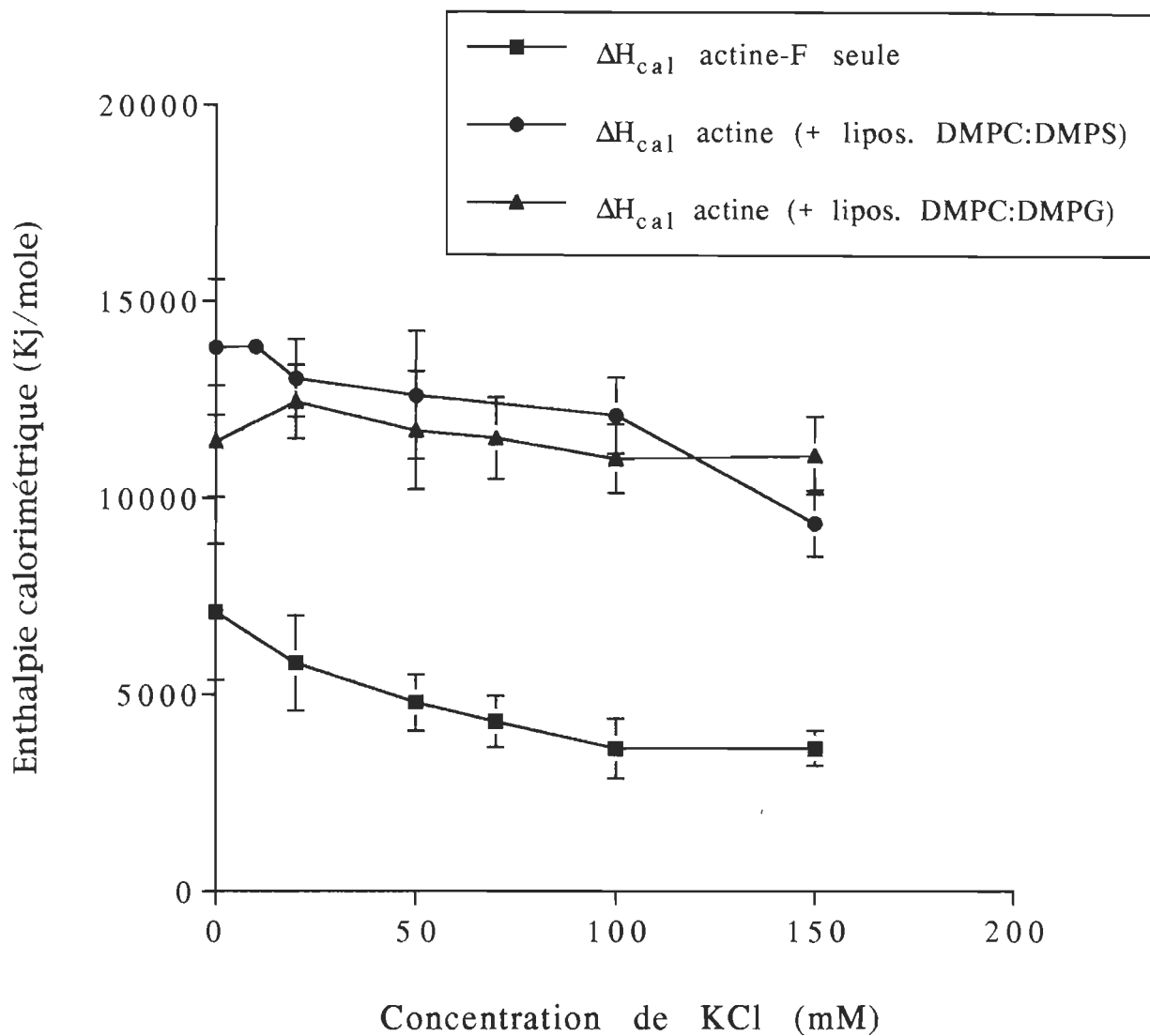


Figure 27 : Enthalpies calorimétriques de l'actine, seule ou en présence de liposomes composés de DMPC:DMPS (1:1) ou de DMPC:DMPG (1:1), en fonction de la concentration de KCl.

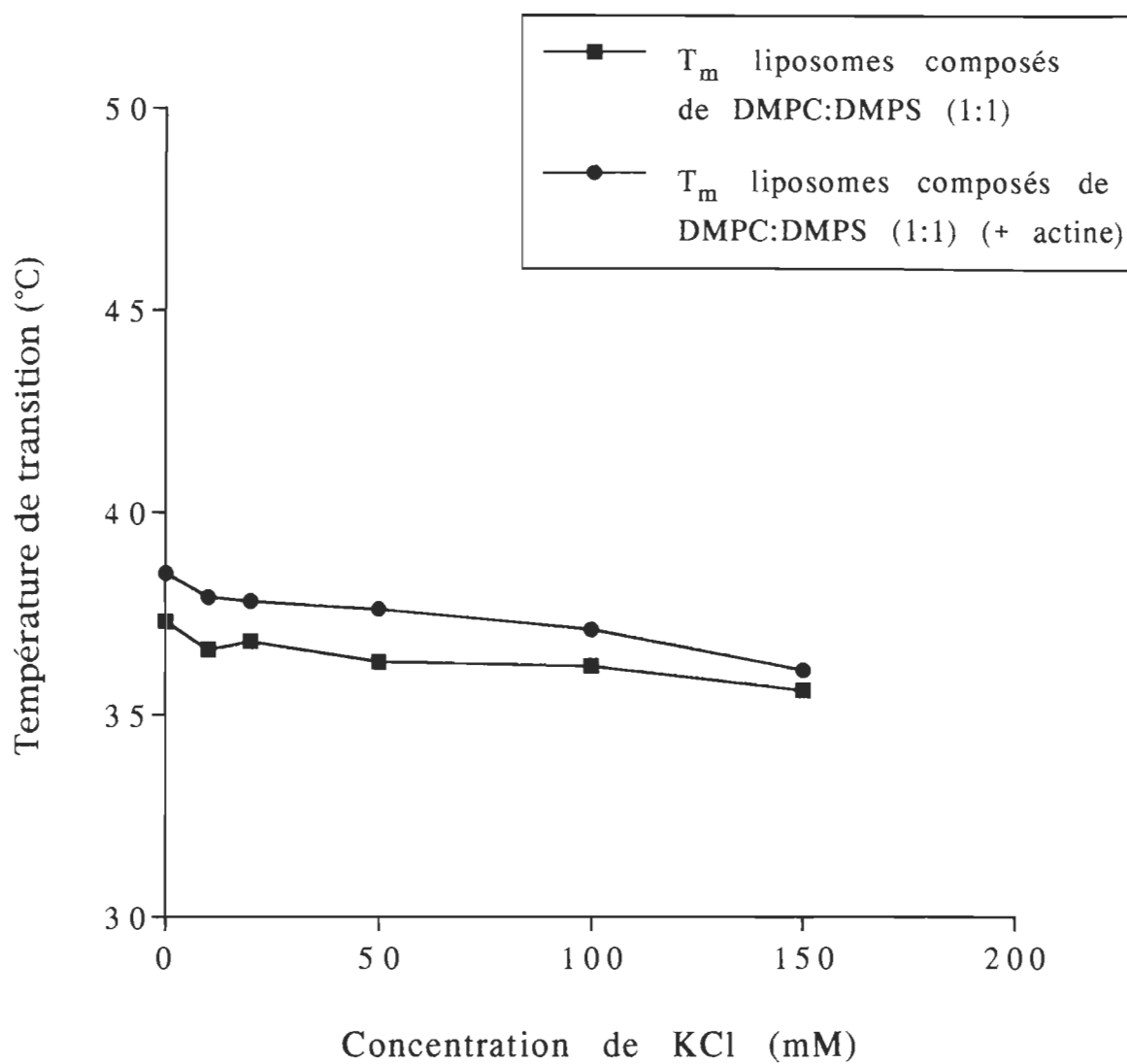


Figure 28 : Températures de transition de liposomes composés de DMPC:DMPS (1:1), seuls ou en présence d'actine, en fonction de la concentration de KCl.

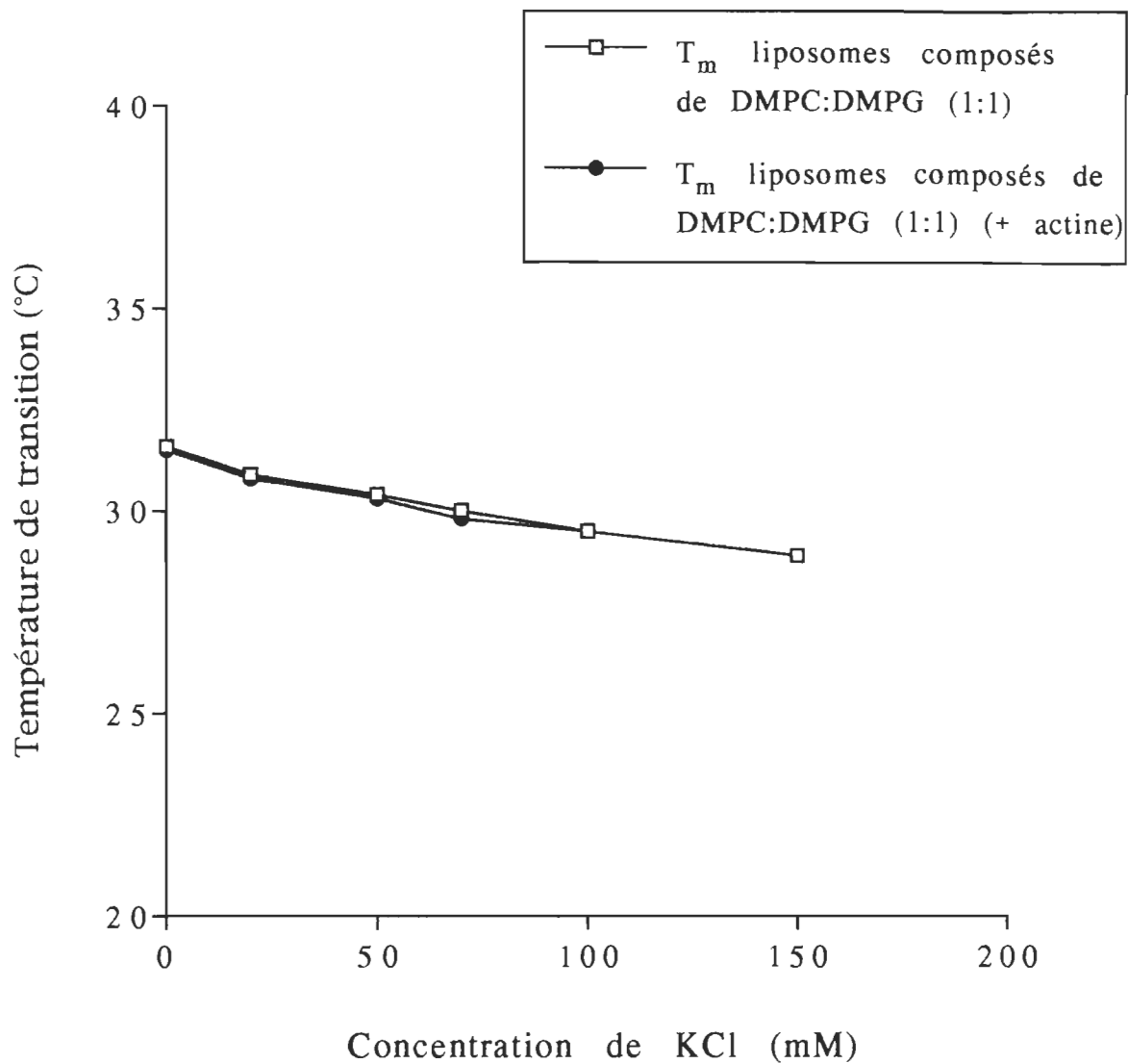


Figure 29 : Températures de transition de liposomes composés de DMPC:DMPG (1:1), seuls ou en présence d'actine, en fonction de la concentration de KCl.

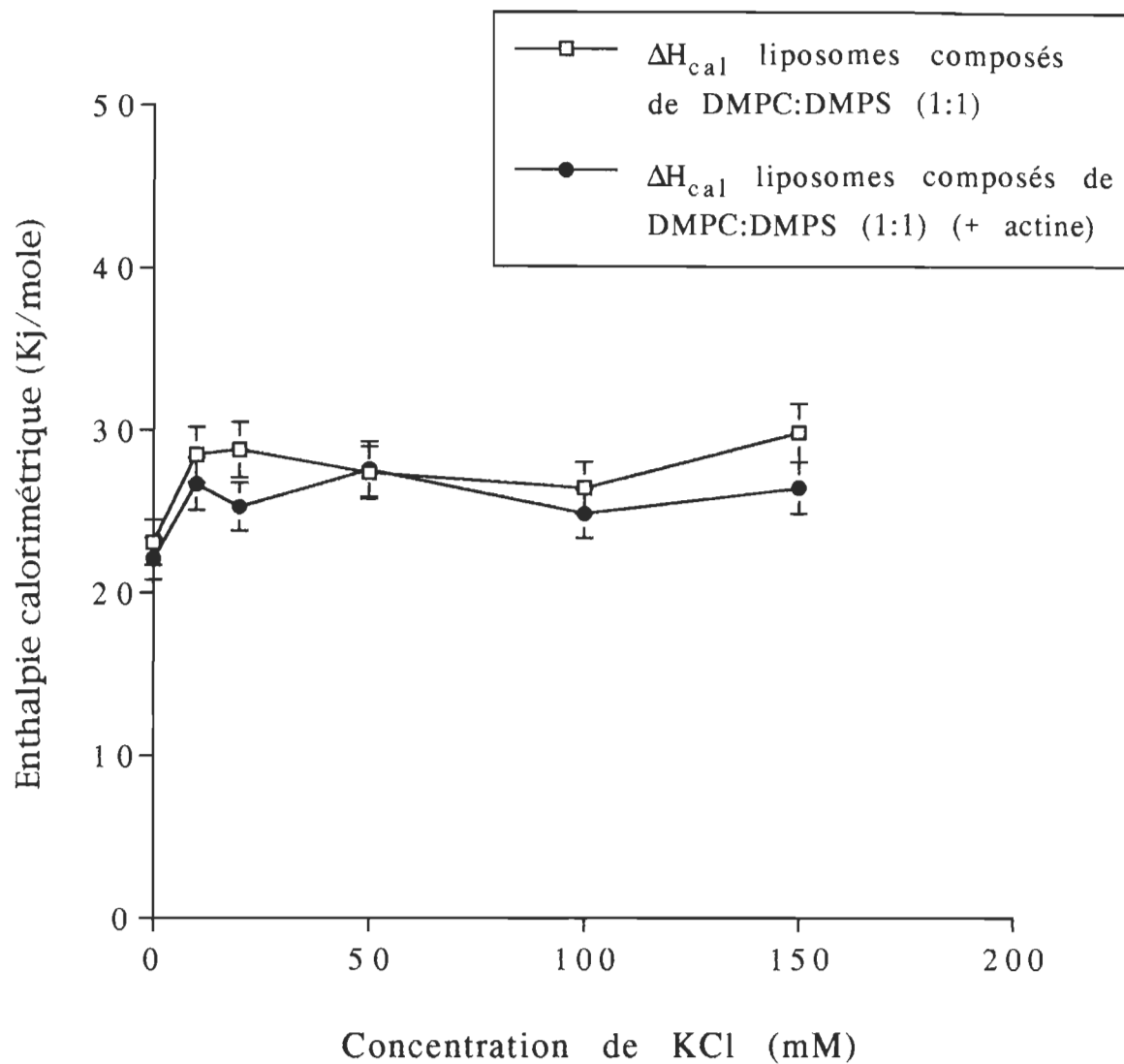


Figure 30 : Enthalpies calorimétriques de liposomes composés de DMPC:DMPS (1:1), seuls ou en présence d'actine, en fonction de la concentration de KCl.

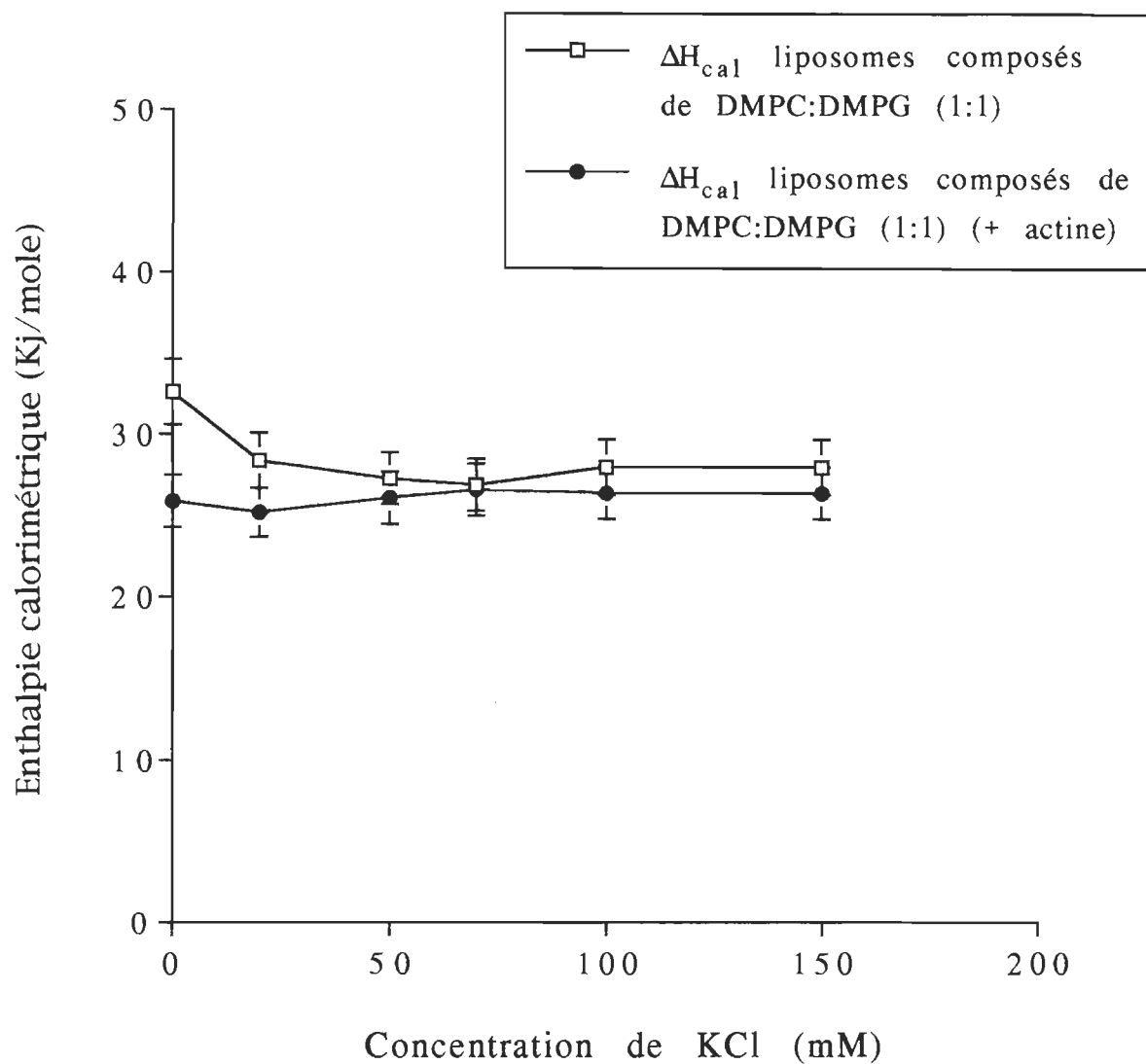


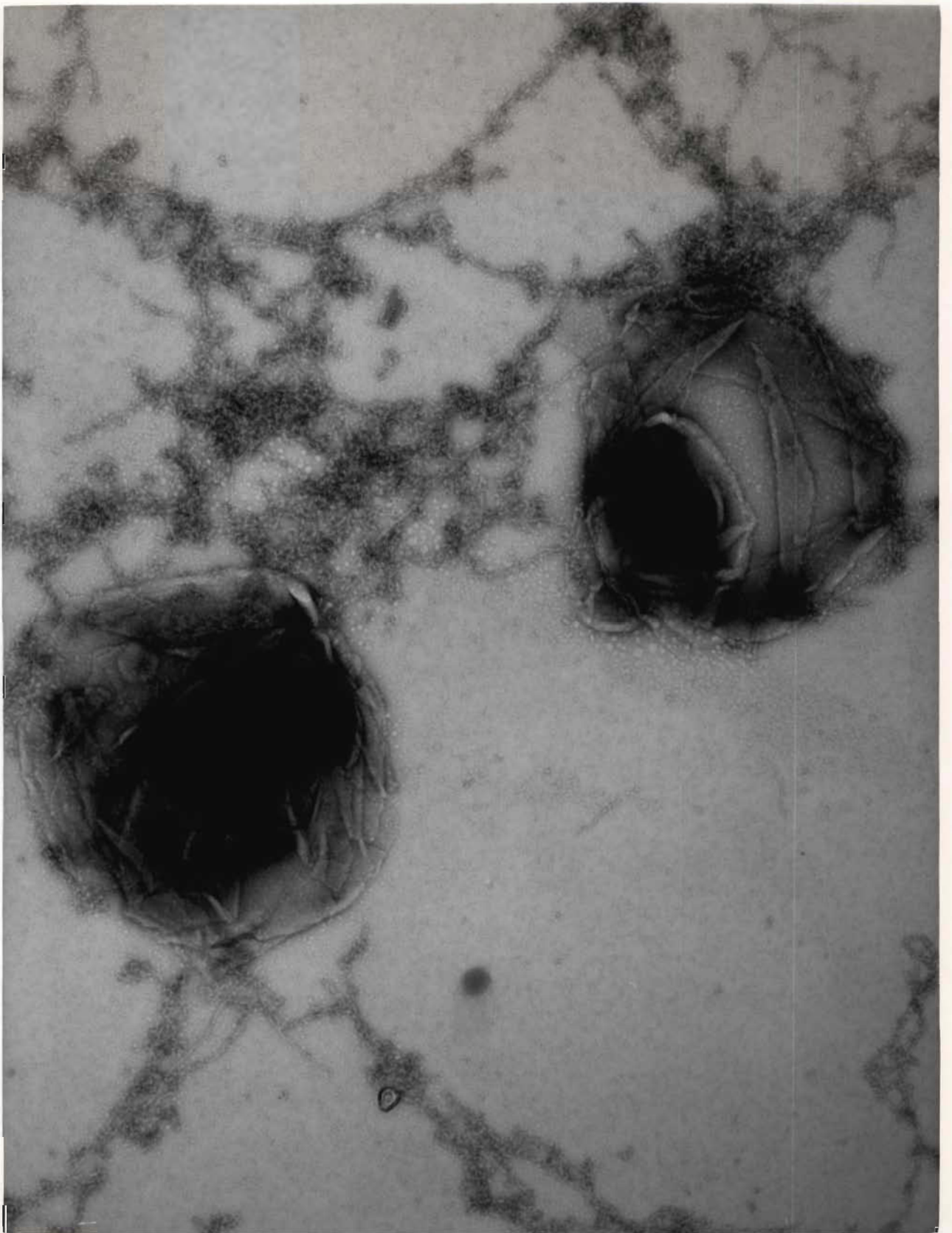
Figure 31 : Enthalpies calorimétriques de liposomes composés de DMPC:DMPG (1:1), seuls ou en présence d'actine, en fonction de la concentration de KCl.

3.2.2 - Étude de l'interaction actine-liposomes composés d'un mélange de DMPC:DMPS (1:1) ou de DMPC:DMPG (1:1) par microscopie électronique.

i) En absence de cations monovalents.

L'examen des mélanges actine-liposomes composés de DMPC:DMPS (1:1) ou de DMPC:DMPG (1:1), préparés dans les mêmes conditions que pour la calorimétrie, a révélé que l'actine se trouve sous forme d'amas désorganisés (fig.32). On n'observe pas la formation de filaments d'actine normaux, ni de structures paracrystallines ou en filet. La figure 32 montre que ces amas d'actine ne se retrouvent pas nécessairement à la surface des liposomes ou en contact avec ceux-ci. Ces amas d'actine correspondent probablement à de l'actine dépolymérisée (actine-G) ou partiellement dépolymérisée (court polymère d'actine). Il y aurait donc coexistence des deux formes d'actine, G et F, qui formeraient ces amas d'actine désorganisés, observés au microscope électronique. Cette interprétation des résultats sera débattue à la section discussion. Ces résultats sont donc très différents de ceux obtenus avec les préparations d'actine-liposomes composés seulement de DMPC puisqu'il n'y a pas formation de structures organisées (paracrystaux ou arrangement en "filet") à la surface des liposomes. La formation d'amas désorganisés d'actine en présence de liposomes, composés de DMPC:DMPS (1:1) ou de DMPC:DMPG (1:1), est donc due à la présence de molécules de DMPS ou de DMPG dans la bicouche membranaire.

Figure 32: (Page suivante) Coloration négative de liposomes composés de DMPC:DMPG (1:1) en présence d'actine. On observe la présence d'amas d'actine qui correspondent probablement à de l'actine dépolymérisée ou partiellement dépolymérisée (67000x).



Il est important de noter que la microscopie électronique ne permet pas de montrer qu'il y a une interaction directe entre l'actine et les liposomes. L'hypothèse d'une interaction possible, suggérée par les résultats obtenus par DSC, n'est donc pas supportée par la microscopie électronique. Par conséquent, il y a un effet des liposomes se traduisant par la formation d'agrégats d'actine, mais il est peu probable qu'il y ait une interaction directe entre l'actine et les liposomes conduisant à une dépolymérisation de la protéine.

ii) Effet des cations monovalents sur l'interaction entre l'actine et les liposomes composés d'un mélange de DMPC:DMPS (1:1) ou de DMPC:DMPG (1:1).

Les résultats obtenus par DSC ont montré que les cations monovalents n'avaient aucune influence sur la transition de phase de l'actine en présence de liposomes de charge globale négative. Ces résultats sont partiellement confirmés par la microscopie électronique qui montre que la présence de concentrations élevées ou faibles de KCl affecte légèrement l'organisation de l'actine. Ainsi, on observe toujours la formation d'amas désorganisés d'actine à toutes les concentrations de KCl testées (fig.33). Cependant, on observe aussi la présence de beaucoup plus de filaments qui semblent normaux, dans le milieu et à la surface des liposomes en présence de KCl. Le coefficient d'interaction est évidemment 0 pour toutes les concentrations de KCl.

Figure 33: (Page suivante) Deux liposomes adjacents composés de DMPC:DMPG (1:1) en présence d'actine et de 100 mM KCl. Il y a toujours formation d'amas désorganisés d'actine. Cependant, ces amas sont moins nombreux et on observe plus de filaments d'actine normaux dans le milieu et à la surface des liposomes (101000x).



En résumé, les résultats obtenus par DSC et par microscopie électronique ont permis de mettre en évidence un effet des liposomes sur l'actine. Contrairement aux résultats obtenus avec les liposomes composés seulement de DMPC, cet effet ne conduit pas à la formation de paracristaux d'actine à la surface des liposomes mais, plutôt, à une désorganisation des filaments d'actine regroupés en amas (forme dépolymérisée ou partiellement dépolymérisée de l'actine). À la lumière des résultats obtenus jusqu'ici avec les liposomes neutres et les liposomes anioniques, on peut conclure que la nature de la tête polaire des phospholipides influence l'interaction entre l'actine et les lipides membranaires.

3.3 - Interaction de l'actine-F avec les liposomes composés d'un mélange de DMPC:DMPA (1:1).

Les liposomes composés d'un mélange de DMPC:DMPA (1:1) sont aussi chargés négativement, mais les résultats obtenus avec ces liposomes sont quelques peu différents de ceux obtenus jusqu'ici avec les liposomes composés de DMPC:DMPS (1:1) ou de DMPC:DMPG (1:1) (voir section 3.2). Ils sont donc traités dans une section à part.

3.3.1 - Étude de l'interaction entre l'actine-F et les liposomes composés d'un mélange de DMPC:DMPA (1:1) par DSC.

i) En absence de cations monovalents.

La figure 34 représente les thermogrammes d'actine seule, de liposomes seuls et d'un mélange actine + liposomes composés de DMPC:DMPA (1:1). La dénaturation de l'actine-F seule a déjà été décrit à la section 3.1.1-i.

Le thermogramme des liposomes seuls présente une transition très étendue avec un épaulement qui n'est pas très bien défini. Le pic a une température de transition (T_{m1}) se situant à 47 °C. L'épaulement se situe à température (T_{m2}) d'environ 53.4 °C. Puisque nous sommes en présence d'un mélange de lipides dont les T_m sont différentes, il y a probablement formation de microdomaines de lipides à l'intérieur de la bicouche membranaire due à la présence de cations divalents (voir discussion).

Le thermogramme du mélange actine + liposomes présente des modifications importantes. Ainsi, on remarque qu'il y a disparition presque complète du pic de dénaturation de l'actine-F en présence de liposomes (fig.34). Cette disparition partielle du pic de dénaturation de l'actine-F indique que les liposomes composés de DMPC:DMPA (1:1) ont un effet sur le processus de dénaturation de l'actine.

Les tableaux VII et VIII résument les paramètres calorimétriques des liposomes, de l'actine et du mélange actine-liposomes. La T_m de l'actine-F diminue légèrement, de façon non significative compte tenu de l'écart type, passant de 69 à 67.8 °C en présence de liposomes. L'enthalpie calorimétrique diminue de façon très marquée, passant de 6600 Kj/mole pour l'actine-F seule à environ 230 Kj/mole en présence de liposomes (tableau VII).

Figure 34: (Page suivante) Thermogrammes d'une solution d'actine seule (vert), de liposomes composés de DMPC:DMPA (1:1) (rouge) et du mélange actine-liposomes (bleu foncé). On observe qu'il y a une disparition presque complète du pic de dénaturation de l'actine en présence de liposomes.

actine + lipos. PC:PA (1:1)

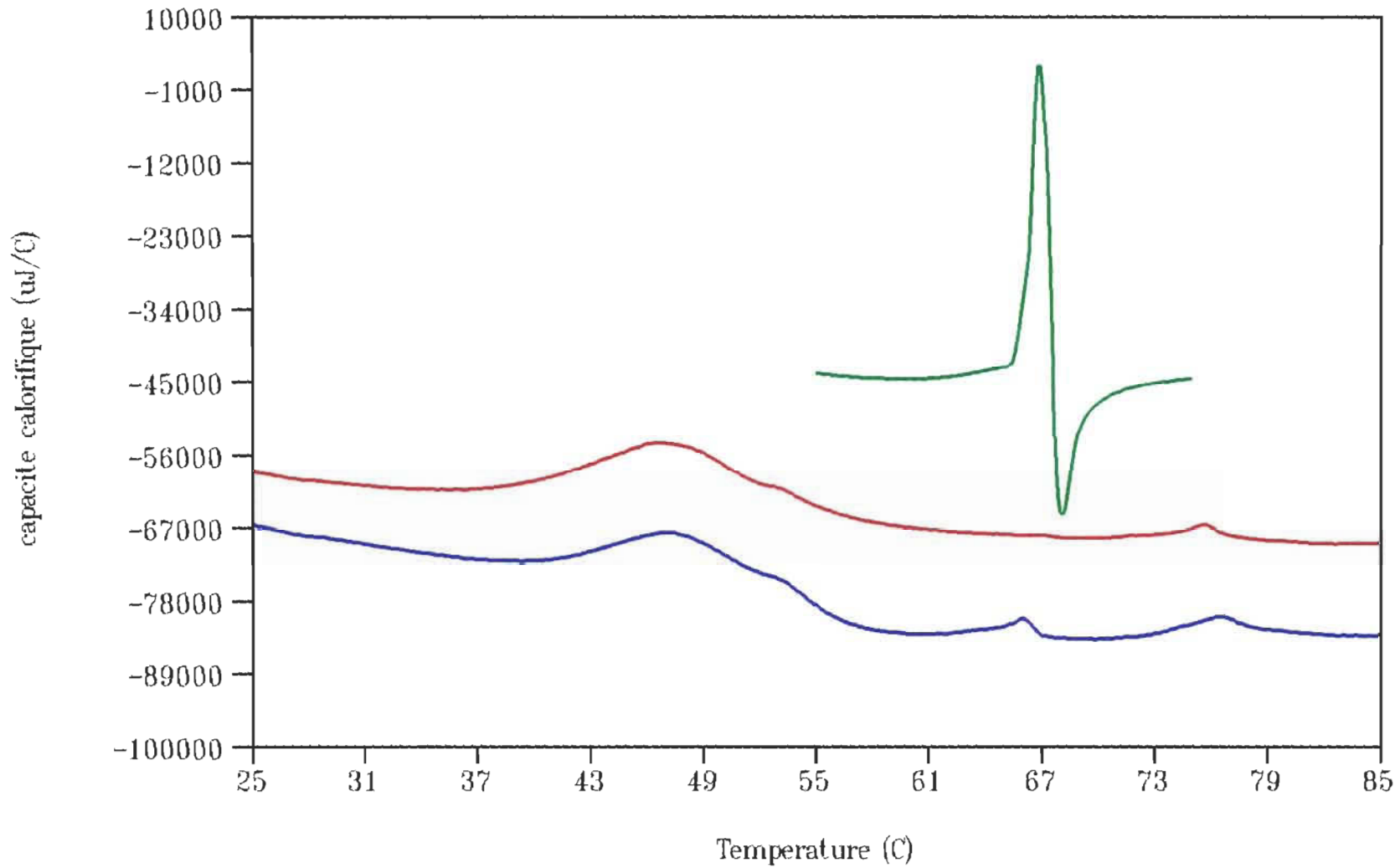


Tableau VII. Comparaison des paramètres calorimétriques de l'actine-F, seule ou en présence de liposomes composés d'un mélange de DMPC:DMPA (1:1).

	Transition principale	
	T_m (°C)	ΔH_{cal} (Kj/mole)
actine-F seule	69.0	6 600
actine-F + DMPC:DMPA (1:1)	67.8	2 30

La transition de phase des liposomes est peu modifiée en présence d'actine. Ainsi, le thermogramme montre une courbe étendue possédant un pic avec un épaulement tout comme le thermogramme des liposomes seuls. Les paramètres calorimétriques mesurés montrent peu de variations (tableau VIII). La T_{m_1} des liposomes augmente légèrement alors que la T_{m_2} ne varie pas en présence d'actine. On observe une faible augmentation de l'enthalpie calorimétrique qui est non significative compte tenu de l'écart type (voir discussion).

Tableau VIII. Comparaison des paramètres calorimétriques des liposomes composés d'un mélange de DMPC:DMPA (1:1), seuls ou en présence d'actine-F.

	Transition principale		
	T_{m1} (°C)	T_{m2} (°C)	ΔH_{cal} (Kj/mole)
DMPC:DMPA seul	47.0	53.4	11.6
DMPC:DMPA + actine-F	47.8	53.3	12.8

Les résultats obtenus en DSC montrent que les liposomes composés d'un mélange de DMPC:DMPA (1:1) ont un effet sur le processus de dénaturation de l'actine. Cet effet se traduit par une disparition partielle du pic de dénaturation de l'actine. Par ailleurs, la modification du thermogramme des liposomes (augmentation de la T_{m1}) en présence d'actine est une indication qu'il pourrait y avoir une interaction entre l'actine et les liposomes.

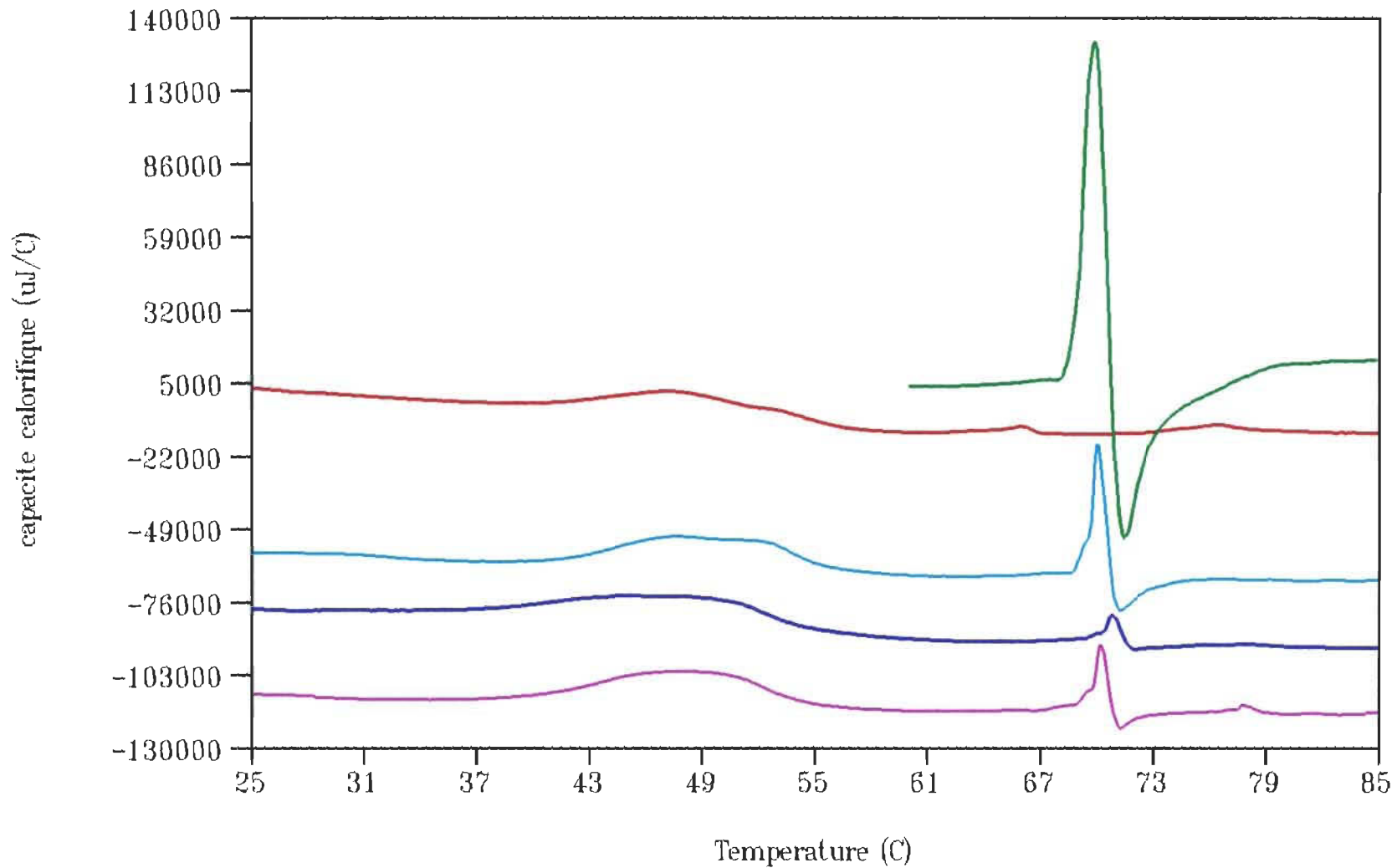
ii) Effet des cations monovalents sur l'interaction entre l'actine et les liposomes composés d'un mélange de DMPC:DMPA (1:1).

L'effet des cations monovalents a été étudié par calorimétrie pour vérifier la nature du phénomène observé entre l'actine et les liposomes composés de DMPC:DMPA (1:1). La figure 35 représente les thermogrammes du mélange actine + liposomes obtenus par DSC en présence de différentes concentrations de KCl. L'effet du KCl sur l'actine-F seule a déjà été décrit à la section 3.1.1-ii, fig.13 et 14.

La transition de phase des liposomes est modifiée en présence de KCl. Le thermogramme des liposomes seuls montre un seul pic relativement étroit dont la T_m ne varie pas par rapport au pic de transition (T_{m1}) des liposomes seuls en absence de KCl (non montré). La présence de cations monovalents empêche probablement la formation de microdomaines de lipides, ce qui a pour effet de rendre le mélange de lipides plus homogène.

Figure 35: (Page suivante) Thermogrammes du mélange actine-liposomes composés de DMPC:DMPA (1:1) en présence d'une concentration croissante de KCl: 0 mM (rouge), 20 mM (bleu), 70 mM (bleu foncé) et 150 mM (mauve). L'actine seule servant de contrôle est en vert. En présence de KCl, on observe une apparition, incomplète, du pic de dénaturation de l'actine. Noter bien ici que les pics de transition des liposomes ont un aspect plutôt aplati car l'échelle utilisée est grande et différente de celle de la figure 34.

actine + lipos. PC:PA (1:1)



Les thermogrammes des mélanges actine + liposomes obtenus en présence de concentrations accrues de cations monovalents montrent quelques modifications (fig.35). En présence de faibles concentrations de KCl (20 mM), on observe une apparition, incomplète, du pic de dénaturation de l'actine-F en présence de liposomes. L'utilisation de plus grandes concentrations de KCl a le même effet mais la réapparition du pic semble encore plus faible. Il semble donc que les cations monovalents influencent peu l'effet des liposomes sur le processus de dénaturation de l'actine.

La figure 36 représente la variation de la température de dénaturation de l'actine-F en fonction de la concentration de KCl. On remarque qu'il n'y a pas de différence significative entre la T_m de l'actine-F en présence de liposomes par rapport à la T_m de l'actine-F seule, en présence de concentrations accrues de KCl. D'autre part, la figure 37 représente l'enthalpie calorimétrique de dénaturation de l'actine, seule et en présence de liposomes, en fonction de la concentration de cations monovalents. On remarque que l'enthalpie calorimétrique de dénaturation de l'actine en présence de liposomes est toujours inférieure, d'au moins 3000 Kj/mole, à l'enthalpie de dénaturation de l'actine-F seule, à toutes les concentrations de KCl expérimentées.

Contrairement à la transition des liposomes seuls, le thermogramme des liposomes composés de DMPC:DMPA (1:1) en présence d'actine-F présente une transition avec un épaulement à toutes les concentrations de KCl expérimentées (fig.35). Il semble donc que la présence d'actine favorise la formation de microdomaines de lipides.

Les résultats obtenus en calorimétrie différentielle à balayage ont démontré que les liposomes composés de DMPC:DMPA (1:1) ont un effet sur le processus de dénaturation thermique de l'actine. Cet effet est partiel puisque la disparition du pic de dénaturation thermique de l'actine-F n'est pas complète. On observe donc un comportement similaire par DSC à celui obtenu en présence de liposomes composés seulement de DMPC. Ainsi, cet effet pourrait être dû aux molécules de DMPC contenues dans les liposomes composés de DMPC:DMPA (1:1). Les études effectuées avec des concentrations croissantes de KCl ont montré très peu d'effets des cations monovalents sur le phénomène observé entre l'actine et les liposomes composés d'un mélange de DMPC:DMPA (1:1).

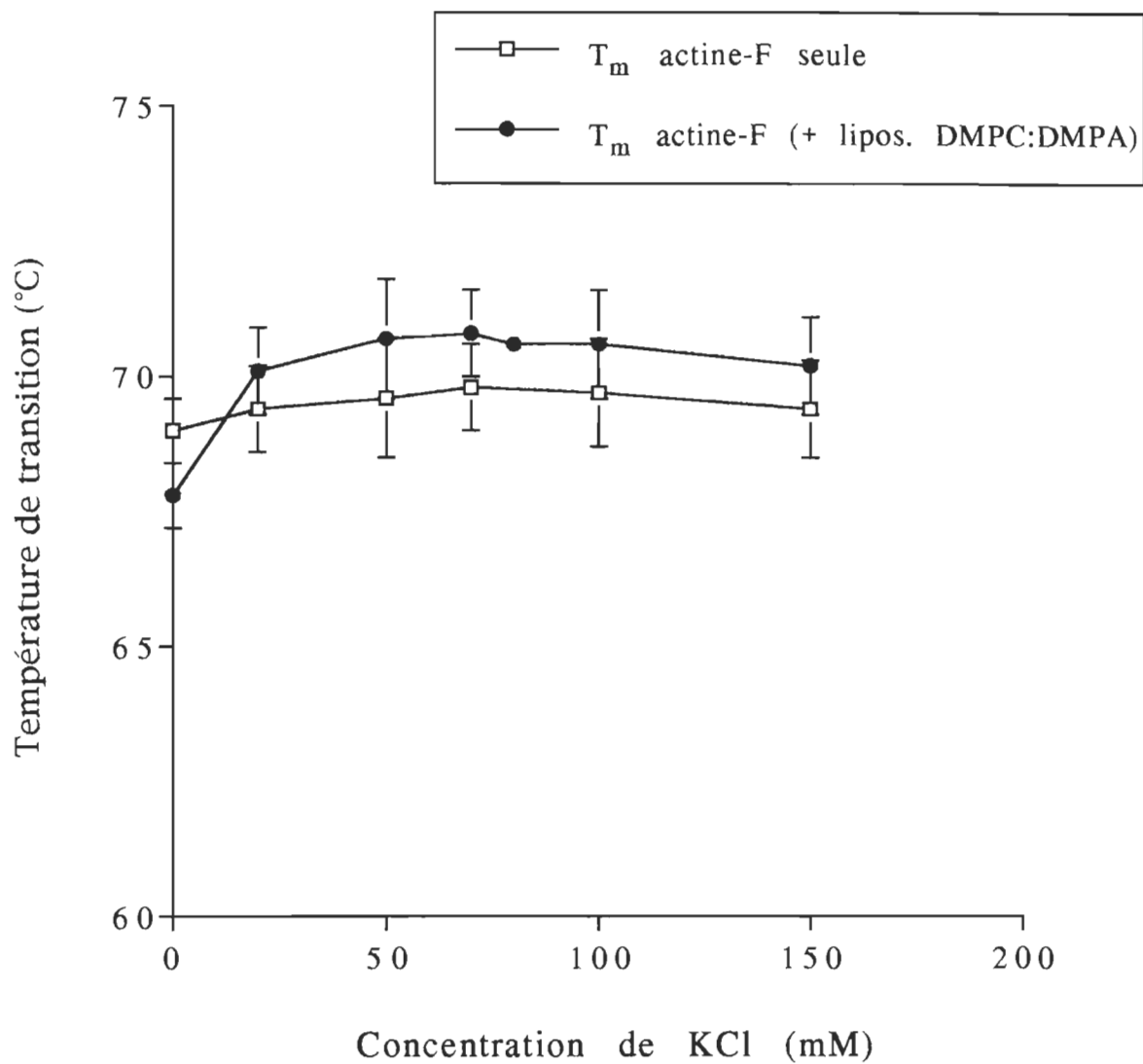


Figure 36 : Températures de transition de l'actine-F, seule ou en présence de liposomes composés de DMPC:DMPA (1:1), en fonction de la concentration de KCl.

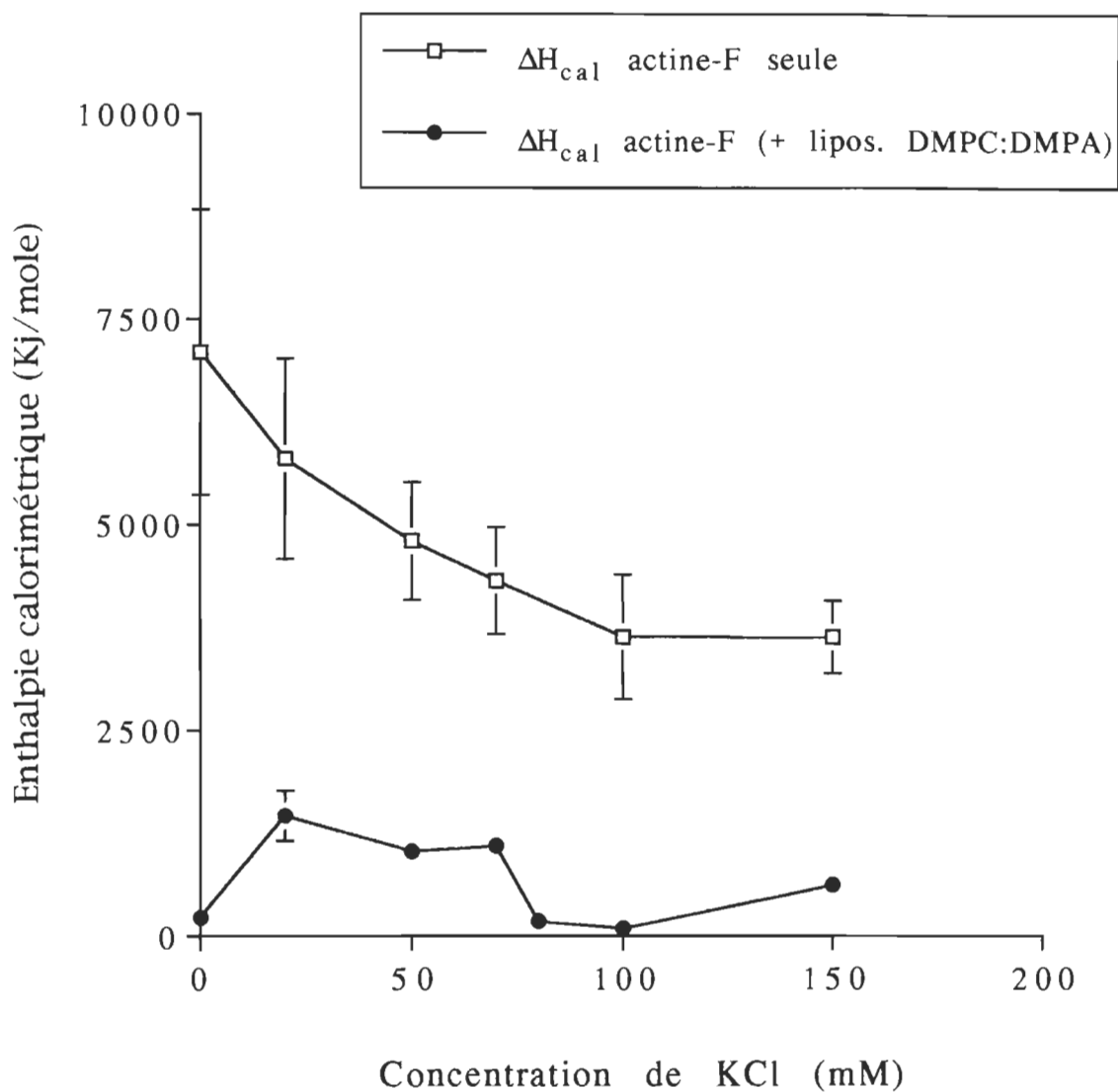


Figure 37 : Enthalpies calorimétriques de l'actine-F, seule ou en présence de liposomes composés de DMPC:DMPA (1:1), en fonction de la concentration de KCl.

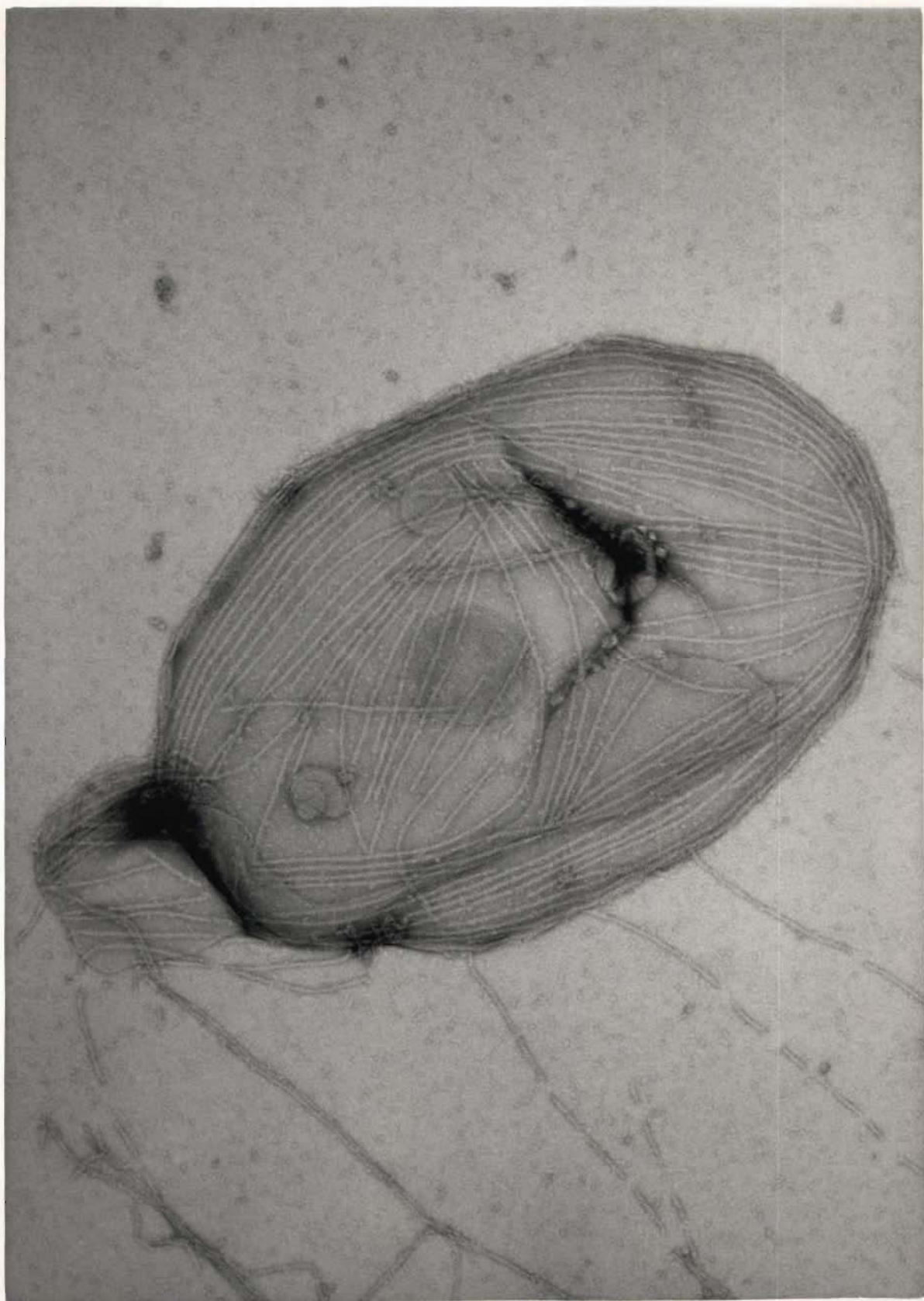
3.3.2 - Étude de l'interaction entre l'actine-F et les liposomes composés d'un mélange de DMPC:DMPA (1:1) par microscopie électronique.

i) En absence de cations monovalents.

Lorsqu'on mélange de l'actine-F avec des liposomes composés d'un mélange de DMPC:DMPA (1:1), dans les mêmes conditions qu'en calorimétrie, on observe la formation de structures d'actine-F à la surface des liposomes en microscopie électronique (fig.38). On remarque que ces structures sont formées de filaments d'actine, parfois parallèles, ne couvrant pas entièrement la surface des liposomes. Il y a donc interaction entre l'actine et les liposomes. Cependant, cette interaction ne conduit pas à la formation de structures ordonnées, paracrystaux ou arrangement en "filet", à la surface des liposomes.

Pour quantifier l'interaction, le coefficient d'interaction a été mesuré. Sa valeur est d'environ 1.0, ce qui indique une interaction partielle entre l'actine et les liposomes. La microscopie électronique montre donc que l'interaction de l'actine-F avec les liposomes est partielle et se traduit par la formation de structures semblables à celles obtenues avec les liposomes composés seulement de DMPC. Cependant, ces structures sont beaucoup moins organisées que celles observées à la surface des liposomes composés de DMPC.

Figure 38: (Page suivante) Coloration négative d'un liposome composé de DMPC:DMPA (1:1) en présence d'actine. Les filaments d'actine forment une structure non ordonnée à la surface du liposome. Il y a donc une interaction entre l'actine et les liposomes (103000x).



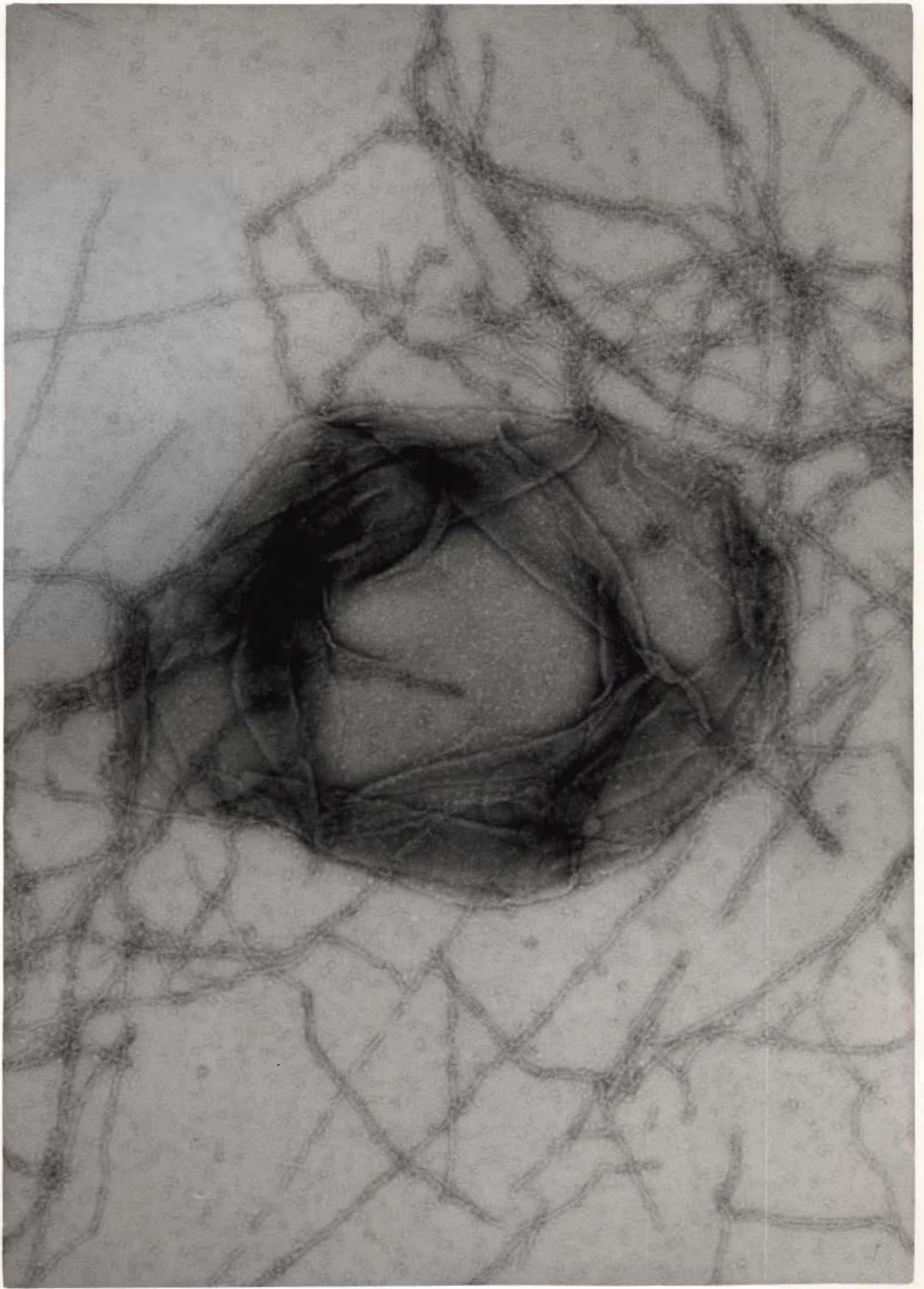
ii) Effet des cations monovalents sur l'interaction entre l'actine et les liposomes composés d'un mélange de DMPC:DMPA (1:1).

Pour appuyer l'hypothèse qui suggère que l'interaction entre l'actine et les liposomes composés de DMPC:DMPA (1:1) est semblable à l'interaction entre l'actine et les liposomes composés seulement de DMPC, l'effet des cations monovalents a été étudié par microscopie électronique. Les résultats montrent que l'addition de faibles concentrations de KCl inhibe complètement cette interaction (fig.39). On observe qu'il n'y a plus d'arrangement parallèle des filaments d'actine à la surface des liposomes mais que l'actine-F est plutôt distribuée au hasard dans le milieu, passant parfois sur la surface d'un liposome. La valeur du coefficient d'interaction est 0 à toutes les concentrations de KCl étudiées.

Ces résultats montrent donc que l'effet du KCl observé ici est le même que celui observé entre l'actine et les liposomes composés seulement de DMPC. Cependant, il y a inhibition de l'interaction actine-liposomes composés de DMPC:DMPA (1:1) par de plus faibles concentrations de KCl que celles nécessaires pour inhiber l'interaction actine-liposomes composés de DMPC. D'autre part, ces résultats ne sont pas tout à fait en accord avec ceux obtenus par DSC qui montraient un très faible effet inhibiteur du KCl sur l'interaction entre l'actine et les liposomes composés d'un mélange de DMPC:DMPA (1:1).

La microscopie électronique vient donc confirmer les résultats obtenus par calorimétrie, à savoir que l'actine-F interagit de façon directe avec les liposomes composés d'un mélange de DMPC:DMPA (1:1). Cette interaction se traduit par la formation de structures non ordonnées de filaments d'actine à la surface des liposomes. Cependant, contrairement aux résultats obtenus par DSC, l'addition de faibles quantités de cations monovalents inhibe complètement l'interaction observée par microscopie électronique.

Figure 39: (Page suivante) Vue au microscope électronique d'un liposome composé de DMPC:DMPA (1:1) en présence d'actine et de 30 mM de KCl. On observe que les filaments se disposent au hasard dans le milieu, passant parfois sur la surface du liposome. Il n'y a donc plus d'interaction en présence de faibles concentrations de KCl (103000x).



3.4 - Interaction de l'actine-F avec les liposomes non-chargés composés seulement de DGDG.

3.4.1 - Étude par DSC de l'interaction entre l'actine-F et les liposomes non-chargés composés seulement de DGDG.

La figure 40 représente les thermogrammes d'actine seule, de liposomes seuls composés seulement de DGDG et d'un mélange actine + liposomes.

Les liposomes composés seulement de DGDG ne montrent pas de transition de phase en calorimétrie, du moins à l'intérieur de l'intervalle de températures balayées par l'appareil, soit de 0 à 100°C. On ne peut donc rien conclure quant à l'organisation des molécules de DGDG à l'intérieur de la bicouche en absence ou en présence d'actine-F.

Lorsqu'on mélange de l'actine-F avec des liposomes composés seulement de DGDG, on observe des changements importants du thermogramme de dénaturation de l'actine-F. Ainsi, la dénaturation thermique de la protéine est suivie de l'agrégation caractéristique à l'actine-F faiblement concentrée. Cependant, on remarque que le pic de dénaturation de l'actine-F est légèrement plus large que celui de l'actine-F seule. Il semble donc que la protéine se dénature avec une plus faible coopérativité. De plus, on observe une diminution significative de la T_m de l'actine-F qui passe de 69 à 65.1 °C en présence de liposomes. Le ΔH_{cal} de dénaturation augmente de 6600 Kj/mole pour l'actine-F seule à environ 9250 Kj/mole pour l'actine-F en présence de liposomes composés seulement de DGDG (tableau IX). Ces résultats montrent que les liposomes composés seulement de DGDG ont un effet sur le processus de dénaturation thermique de l'actine.

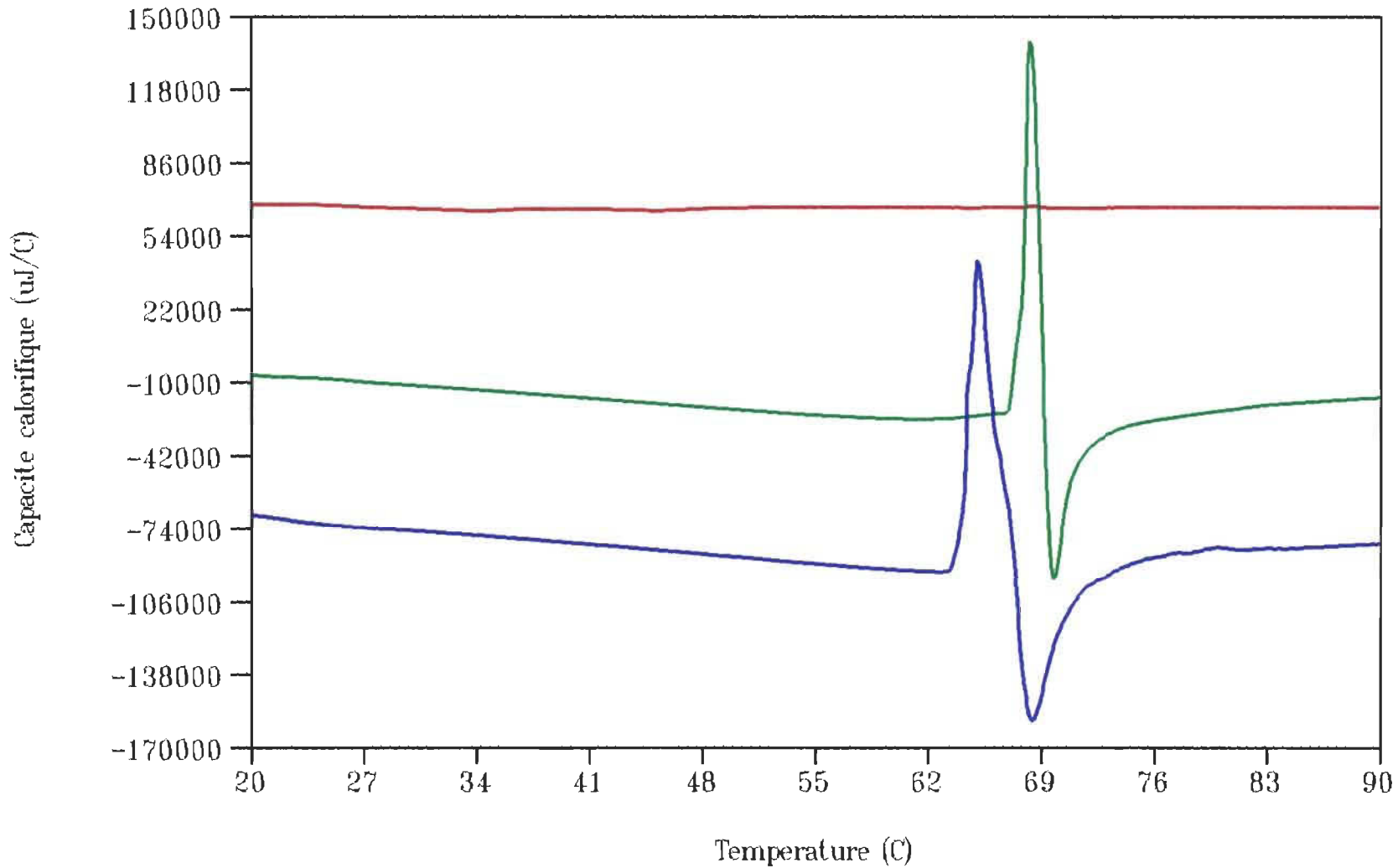
Tableau IX. Comparaison des paramètres calorimétriques de l'actine-F, seule ou en présence de liposomes non-chargés composés seulement de DGDG.

	Transition principale	
	T_m (°C)	ΔH_{cal} (Kj/mole)
actine-F seule	69.0	6600
actine-F + DGDG	65.1	9250

Les expériences effectuées en calorimétrie avec un lipide non-chargé, soit le DGDG, avaient pour objet de vérifier si l'actine-F pouvait interagir de façon directe avec des liposomes ne présentant aucune charge. La baisse significative de la T_m et l'augmentation du ΔH_{cal} sont des indications que les liposomes non-chargés ont un effet sur la dénaturation de l'actine. Cet effet ne peut être électrostatique compte tenu que le DGDG est un lipide non-chargé.

Figure 40: (Page suivante) Thermogrammes d'une solution d'actine seule (vert), de liposomes composés de DGDG (rouge) et du mélange actine-liposomes (bleu foncé). On observe une baisse marquée de la T_m et une augmentation de la largeur du pic de dénaturation de l'actine. Le DGDG a donc un effet non électrostatique sur la dénaturation thermique de l'actine.

actine + liposomes de DGDG



3.4.2 - Étude par microscopie électronique de l'interaction entre l'actine-F et les liposomes non-chargés composés seulement de DGDG.

Les liposomes composés de DGDG forment des agrégats en présence de cations divalents (143). Ces agrégats sont formés de vésicules lipidiques collées les unes aux autres sans qu'il y ait fusion. Ce sont ces structures que l'on observe en microscopie électronique.

Lorsqu'on examine des préparations d'actine et de liposomes composés seulement de DGDG, dans les mêmes conditions qu'en calorimétrie, on observe que les filaments d'actine semblent se disposer surtout à la périphérie des liposomes (fig.41). Cette disposition particulière des filaments d'actine ne permet pas d'affirmer qu'il y a une interaction entre l'actine et les liposomes. L'addition de 100 mM KCl n'a pas d'effet sur la disposition des filaments d'actine autour des liposomes (fig.42).

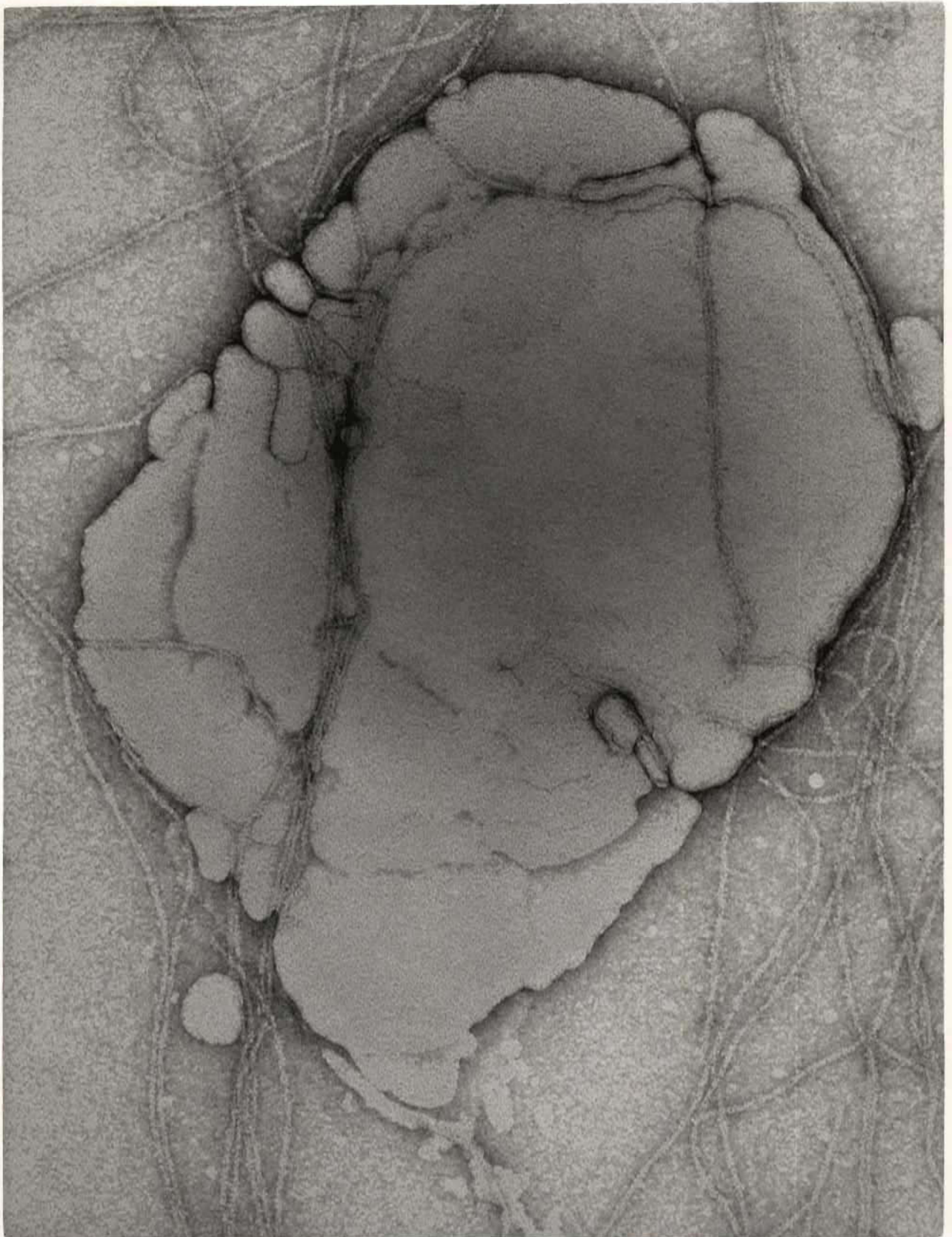
Il est à noter qu'il n'y a aucune formation de paracristsaux d'actine à la surface des liposomes. Ces résultats sont donc très différents de ceux obtenus avec les liposomes composés seulement de DMPC. Par ailleurs, les filaments d'actine observés en contact de liposomes non-chargés sont semblables aux filaments d'actine seule.

La microscopie électronique ne montre pas de façon convaincante qu'il y a une interaction entre l'actine et le DGDG. La variation des paramètres calorimétriques (T_m et ΔH_{cal}) de l'actine-F (tableau IX) est probablement due à un effet du DGDG sur le processus de dénaturation thermique de la protéine (voir discussion).

Figure 41: (Page suivante) Coloration négative d'un liposome composé de DGDG en présence d'actine. Les filaments d'actine semblent en contact sur la "périphérie" du liposome. Cette disposition particulière des filaments ne permet pas d'affirmer qu'il y a une interaction entre l'actine et le DGDG (154000x).



Figure 42: (Page suivante) Coloration négative d'un liposome composé de DGDG en présence d'actine et de 100 mM de KCl. On remarque que les filaments d'actine se disposent principalement en "périphérie" du liposome. L'addition de KCl n'a donc pas d'effet sur la disposition particulière des filaments d'actine autour du DGDG (154000x).



3.5- Résumé des résultats.

Les résultats ont montré que la nature de la tête polaire des lipides influence l'interaction directe actine-lipides. Ainsi, nous avons confirmé qu'il y a une interaction directe entre l'actine et les lipides neutres. Cette interaction est de nature électrostatique car il y a inhibition par le KCl. Nous avons aussi démontré que les lipides anioniques, DMPS et DMPG, ont un effet sur la dénaturation thermique de l'actine. L'actine se trouve probablement sous forme dépolymérisée ou partiellement dépolymérisée en présence de ces lipides. Les différentes hypothèses pour expliquer ce résultat seront décrites et discutées à la prochaine section. Par ailleurs, nous avons montré que l'actine forme des structures non organisées à la surface des liposomes composés de DMPC:DMPA (1:1). Ce résultat est probablement dû aux molécules de DMPC qui constituent les liposomes. Les contradictions entre les deux techniques quant à l'effet du KCl sur l'interaction seront discutées plus en détail à la prochaine section. Enfin, nous avons montré que le DGDG a un effet sur la dénaturation thermique de l'actine. Cependant, cet effet du lipide n'est pas dû à une interaction directe entre l'actine et le DGDG.

4. DISCUSSION

Les interactions entre le cytosquelette, en particulier l'actine, et les membranes naturelles ont fait l'objet de nombreuses études. Il est généralement admis dans la littérature que l'actine est ancrée à la membrane via des protéines transmembranaires. Peu d'études se sont intéressées à la liaison de l'actine aux lipides membranaires. Plusieurs études ont été effectuées sur l'interaction entre la tubuline et les liposomes et sur l'interaction entre les filaments intermédiaires et les lipides membranaires. Les seules études de l'interaction directe actine-lipides ont été effectuées dans notre laboratoire et ont montré que l'actine interagit de façon directe avec les liposomes chargés positivement et les lipides neutres. Dans ce projet de recherche, nous avons montré que l'actine interagit de façon directe avec les lipides membranaires et que cette interaction est influencée par la nature de la tête polaire des phospholipides.

4.1- Critique des techniques utilisées.

4.1.1- Méthode de préparation des liposomes.

La technique de congélation-décongélation (4) utilisée pour préparer les liposomes est reproductible en ce sens que les liposomes préparés dans des conditions spécifiques sont très semblables d'une préparation à une autre. Les liposomes obtenus à l'aide de cette technique sont pour la plupart unilamellaires sauf les liposomes composés de lipides neutres (DMPC et DMPE) qui sont plurilamellaires. La technique d'ultrafiltration, permettant d'obtenir des liposomes unilamellaires a été utilisée pour pallier à cette difficulté (53, 107).

Cependant, la technique de congélation-décongélation comporte un inconvénient, à savoir que la taille des liposomes d'une même préparation est variable. En effet, la taille de nos populations de liposomes varie de 0.2 à 1.0 μm . L'actine et les liposomes n'ayant pas une flexibilité infinie, l'actine aura tendance à interagir préférentiellement avec les liposomes plus gros (125). Cette affirmation est basée sur des observations directes au microscope électronique.

Par ailleurs, les préparations de liposomes composés seulement de DMPC ou d'un mélange de DMPC:DMPE (1:1) sont passées sur un filtre de polycarbonate de 800 nm de diamètre. Le choix d'une taille de 800 nm de diamètre est logique puisqu'elle nous permet d'obtenir des liposomes dont le diamètre se situe entre 0.2 et 1.0 μm . Il est donc relativement difficile d'obtenir de gros liposomes unilamellaires et de taille uniforme, et de pouvoir les comparer d'une préparation à une autre. La technique de congélation-décongélation a été utilisée puisqu'elle est simple et requiert peu de manipulations.

4.1.2- Calorimétrie différentielle à balayage (DSC).

La calorimétrie différentielle à balayage est une très bonne technique pour étudier les interactions entre les protéines et les lipides membranaires. La DSC est une méthode indirecte pour mesurer les interactions protéines-lipides (voir section 3). Cette technique permet de mesurer des effets des lipides sur le processus de dénaturation thermique de l'actine. Cependant, elle ne montre pas s'il y a une interaction directe entre la protéine et les lipides. Une modification du thermogramme de la protéine peut résulter d'un effet indirect des lipides. Une interaction directe doit donc être appuyée par une autre technique complémentaire qui est, dans la présente étude, la microscopie électronique.

Toutes les expériences ont été effectuées un minimum de deux à cinq fois par DSC pour s'assurer de la reproductibilité des résultats. L'écart type pour l'actine seule a pu être évalué étant donné qu'à chaque expérience effectuée en DSC, une des trois cuvettes contenait toujours l'actine seule utilisée comme contrôle. L'écart type a donc été calculé globalement à partir de l'ensemble de toutes les préparations d'actine. Pour chacune des conditions ioniques, c'est-à-dire la concentration de KCl et de MgCl₂ utilisée, une valeur moyenne de la T_m et du ΔH_{cal} a été calculée. L'écart type a donc été évalué sur chacune de ces moyennes (tableau X).

Tableau X. Écarts type calculés sur la valeur moyenne de la T_m et du ΔH_{cal} de l'actine seule, en présence de différentes concentrations de KCl.

Concentration de KCl (mM)	Taille de l'échantillon	T _m (°C)	ΔH _{cal} (Kj/mole)
0	16	69,0 ± 0,6	7100 ± 1730
20	14	69,4 ± 0,8	5800 ± 1210
50	15	69,6 ± 1,1	4800 ± 710
70	12	69,8 ± 0,8	4320 ± 650
100	14	69,7 ± 1,0	3640 ± 760
150	13	69,4 ± 0,9	3640 ± 440

On remarque sur le tableau X que la taille de l'échantillon varie selon les conditions ioniques. Cette variation est due au fait que les différentes séries d'expériences n'ont pas toujours été effectuées exactement dans les mêmes conditions ioniques retrouvées dans le tableau X. On observe aussi que l'écart type calculé sur les valeurs moyennes de ΔH_{cal} est généralement élevé. Ces résultats s'expliquent principalement par deux raisons:

1. D'abord, l'enthalpie calorimétrique de transition de l'actine varie considérablement d'une préparation d'actine à une autre. Pigeon (107) a d'ailleurs démontré que le pourcentage d'erreur sur le calcul du ΔH_{cal} augmente avec l'utilisation de différentes préparations de liposomes. Les préparations d'actine semblent donc se comporter de la même façon que les préparations de liposomes de Pigeon, à savoir qu'il y a une grande variation de l'enthalpie calorimétrique si on utilise différentes préparations d'actine. Pour diminuer cette cause d'erreur, nous avons utilisé une même préparation d'actine pour une série d'expériences.
2. Les calculs d'enthalpie s'effectuent à l'aide d'un logiciel fourni avec le DSC. Cependant, l'expérimentateur doit déterminer subjectivement les températures de début et de fin de transition, soit T_i et T_f . L'enthalpie calorimétrique peut donc varier en fonction de la température initiale ou finale choisie par l'expérimentateur.

Il aurait été préférable de calculer les écarts type de façon individuelle pour chacune des préparations d'actine. Cependant, ces manipulations auraient été beaucoup trop longues et auraient demandé une quantité considérable d'actine.

Les écarts type pour la transition des liposomes (T_m et ΔH_{cal}) ont été calculé à partir d'échantillons provenant d'une même préparation de liposomes. L'écart type relatif est évalué à 0.2% pour la température de transition et 6% pour l'enthalpie calorimétrique. Pour diminuer les causes d'erreurs sur le calcul de la T_m et du ΔH_{cal} , nous avons utilisé une même préparation de liposomes pour une série d'expériences.

4.1.3- Microscopie électronique.

La microscopie électronique est une technique complémentaire au DSC qui permet de visualiser l'interaction entre l'actine et les liposomes. Contrairement à la technique de DSC, la microscopie électronique nécessite d'ajouter un colorant, l'acétate d'uranyl, à l'échantillon pour pouvoir visualiser l'interaction.

L'acétate d'uranyl étant un sel, on peut se demander si ce colorant n'influence pas d'une manière ou d'une autre sur l'interaction actine-lipides. Par exemple, de faibles interactions électrostatiques pourraient fort bien être dissociées par l'ajout d'acétate d'uranyl. De plus, l'étape de la coloration où on enlève le surplus de solution ou de colorant sur la grille pourrait provoquer un courant assez fort pour dissocier l'actine des liposomes. Ces deux phénomènes peuvent expliquer certains résultats. Ainsi, la concentration de cations monovalents nécessaire pour inhiber l'interaction actine-liposomes neutres, observée par microscopie électronique, est inférieure à la concentration de KCl nécessaire pour inhiber la même interaction obtenue par DSC. D'autre part, l'interaction actine-liposomes composés d'un mélange de DMPC:DMPA (1:1) est inhibée complètement en présence de KCl en microscopie électronique contrairement aux résultats obtenus en DSC. L'acétate d'uranyl pourrait donc être la cause des différences

observées entre la microscopie électronique et la calorimétrie différentielle à balayage quant à certains résultats.

Par ailleurs, le coefficient d'interaction (C.I.) permet de quantifier l'interaction actine-lipides. Cependant, la mesure du C.I. laisse place à beaucoup de subjectivité quant aux choix des liposomes et des grilles à observer. Pour être plus objectif, les grilles sont préalablement mélangées par une tierce personne. Ainsi, lors de l'observation des grilles, on ne peut savoir lequel des mélanges actine-liposomes on regarde, ni les conditions ioniques. Ceci évite de deviner à l'avance les résultats qu'on devrait obtenir.

4.2- Analyse des résultats.

4.2.1 - Analyse des résultats obtenus avec les lipides neutres (DMPC et DMPE).

Nos résultats obtenus avec les lipides neutres (DMPC ou DMPE) sont conformes au modèle proposé par Pigeon (107) et Gicquaud (45) (section 1.5.1). L'interaction directe de l'actine avec les lipides neutres est de nature électrostatique, nécessitant la présence de cations divalents. En microscopie électronique, la formation de paracristaux et l'organisation en "filet" de l'actine à la surface des liposomes ne sont pas le fruit d'une adsorption non spécifique de l'actine sur les lipides. Si c'était le cas, on observerait une déposition au hasard des filaments sur la surface des liposomes, sans organisation particulière.

Par ailleurs, l'effet le plus important observé lors de l'interaction actine-lipides neutres est la disparition complète du pic de dénaturation de l'actine. La disparition du pic de dénaturation n'est pas due à une stabilisation de l'actine, puisque ceci résulterait en une augmentation de sa

température de transition, ce qui n'a pas été détecté lors de balayage allant jusqu'à 100°C. En fait, la disparition du pic de dénaturation de l'actine peut s'expliquer de deux façons:

1. La dénaturation de l'actine se fait en deux étapes. D'abord, il y a une dénaturation de la protéine, représentée par le pic endothermique. Cette dénaturation est suivie de l'agrégation de la protéine (pic exothermique). La dénaturation est un phénomène à commande cinétique (généralement d'ordre 1) qui sera gouverné quant au tracé obtenu par la vitesse de balayage des températures (fixe dans la présente étude) et par l'énergie d'activation du processus (69). L'agrégation, aussi à commande cinétique, dépend d'interactions intermoléculaires et dépendra de la concentration d'actine. Ainsi, plus la concentration d'actine est élevée, plus le phénomène d'agrégation devrait suivre rapidement la dénaturation. Dans le cas qui nous concerne, la formation de paracristaux d'actine à la surface des liposomes entraîne une augmentation de la concentration locale d'actine. Cette situation favorise donc une agrégation rapide de l'actine. Dans ces conditions, la dénaturation et l'agrégation de l'actine se déroulent pratiquement à la même température de sorte que, le pic négatif annule le pic positif et le signal de l'actine disparaît purement et simplement. Les travaux de Gagné (42) ont d'ailleurs démontré que l'enthalpie molaire "apparente" de dénaturation de l'actine diminue lorsque sa concentration croît. Cet effet de concentration s'explique aisément par l'hypothèse de la simultanéité des pics.
2. La formation de paracristaux d'actine à la surface des liposomes indique que l'actine subit un changement de conformation ou d'organisation. Les stries transversales à la surface des liposomes, facilement visibles sur les micrographies (fig.19), représentent le pas de l'hélice des

filaments d'actine. La présence de ces stries indique qu'il y a probablement des interactions latérales périodiques entre les filaments. Ces filaments sont donc plus droits et plus rigides. Il est possible que ce changement d'organisation se traduise par un changement du ΔH_{cal} . D'ailleurs, le thermogramme de dénaturation de paracristsaux d'actine se traduit par un pic très étendu et plat (42).

Par ailleurs, d'autres résultats peuvent s'expliquer par l'hypothèse de superposition des pics. Ainsi, l'effet du KCl sur la dénaturation thermique de l'actine seule se traduit par une diminution marquée de l'enthalpie calorimétrique (fig.14). Cette diminution du ΔH_{cal} est accompagnée d'une augmentation de la T_m (fig.13). L'augmentation de la T_m entraîne donc une superposition "partielle" de la dénaturation et de l'agrégation. Le résultat est une diminution du ΔH_{cal} de dénaturation de l'actine seule.

D'autre part, il a été démontré que le KCl inhibe l'interaction actine-liposomes neutres (fig.12 et 14). Cette inhibition se traduit par une augmentation du ΔH_{cal} de l'actine en présence de liposomes. La microscopie électronique montre que le KCl empêche la formation de paracristsaux à la surface des liposomes et, par conséquent, il n'y a plus d'augmentation de la concentration locale d'actine. Par le fait même, la dénaturation et l'agrégation ne se font plus à la même température, d'où une augmentation continue du ΔH_{cal} en présence de concentrations croissantes de KCl (fig.14).

De plus, les résultats obtenus par DSC suggèrent que les liposomes composés de DMPC:DMPE (1:1) interagissent plus fortement avec l'actine que les liposomes composés seulement de DMPC, en présence d'une grande concentration de KCl (fig.14). En appliquant l'hypothèse de la simultanéité des pics, on s'aperçoit que cette "différence" entre la choline et

l'éthanolamine n'est qu'apparente. En effet, la figure 13 montre que la T_m de l'actine en présence de liposomes composés de DMPC est inférieure à la T_m de l'actine seule, en présence de fortes concentrations de KCl. Ceci implique donc une moins grande superposition du pic positif et négatif et, par conséquent, un plus grand ΔH_{cal} "apparent" de dénaturation de l'actine en présence de liposomes composés seulement de DMPC.

Par ailleurs, l'organisation moléculaire des lipides composant la bicouche phospholipidique est faiblement affectée en présence d'actine. Dans le cas de l'interaction directe actine-lipides neutres, on observe une légère baisse du ΔH_{cal} des liposomes. Ces résultats ne correspondent à aucune des catégories proposées par Papahadjopoulos *et al.* (100). On peut cependant suggérer que ces effets soient dus à une interaction de type 1 et 2 de la classification de Papahadjopoulos. En effet, l'interaction directe actine-lipides neutres est une interaction de surface, de nature électrostatique (type 1), mais il y aurait en plus une très faible incorporation de la protéine à l'intérieur de la bicouche membranaire. L'incorporation de l'actine dans la bicouche serait cependant trop faible pour induire un changement drastique de la température de transition de phase des lipides mais expliquerait la légère baisse de l'enthalpie calorimétrique de transition.

Ceci est conforme aux travaux de Grimard *et al.* (46) réalisés en monocouche qui montrent que, pour de faibles tensions de surface, l'actine peut s'intercaler à l'intérieur de la bicouche membranaire. Cette intercalation de l'actine est facilitée par des interactions électrostatiques. De plus, les travaux de St-Onge et Gicquaud (127) et ceux de Okimasu *et al.* (92, 93, 137, 138) réalisés à la température de transition des lipides, suggèrent une association hydrophobe et électrostatique entre l'actine et les liposomes (interaction du groupe 2 selon Papahadjopoulos *et al.*, 1975 (100)).

Par ailleurs, nous avons confirmé le fait que la présence de grandes concentrations de KCl inhibe l'interaction actine-lipides neutres. Pour expliquer cette inhibition par le KCl, Gicquaud (45) a suggéré qu'il y ait une compétition entre les cations K^+ et Mg^{2+} pour le site anionique du groupement phosphate des phospholipides neutres. À première vue, cette hypothèse semble plausible puisque le K^+ n'a pas la propriété de former un pont entre deux molécules de phospholipides. Il neutralise une seule charge négative. Ainsi, lorsque le K^+ occupe tous les sites négatifs des phospholipides, les charges positives ne sont pas repoussées vers l'extérieur du plan de la membrane et ne peuvent donc pas interagir avec les charges négatives de l'actine conformément au modèle proposé par Pigeon (107) et Gicquaud (45) (section 1.5.1).

Cependant, cette hypothèse suggérant une compétition possible entre le K^+ et le Mg^{2+} pour le site anionique des phospholipides soulève certaines questions. Ainsi, lorsque tous les sites anioniques sont occupés par le K^+ , la membrane est tout de même chargée positivement. Il pourrait donc y avoir une interaction directe entre l'actine et les lipides neutres sans que les charges positives des phospholipides soient repoussées vers l'extérieur du plan de la membrane, ce qui irait à l'encontre du modèle proposé.

Pour expliquer de façon plus complète l'inhibition de l'interaction actine-lipides neutres par le KCl, nous suggérons ici une seconde hypothèse. Cette hypothèse tient compte du fait que tous les sels utilisés au cours de ce projet, soit le $CaCl_2$, $MgCl_2$ et le KCl, sont des chlorures. Ainsi, le chlore étant un ion chargé négativement, l'inhibition de l'interaction directe actine-lipides neutres par le KCl serait due à une neutralisation des charges positives des phospholipides par les ions Cl^- , plutôt qu'à une compétition entre le K^+ et le Mg^{2+} pour le site anioniques des lipides. Par conséquent, l'ajout de grandes

concentrations de KCl provoque une augmentation des charges négatives (Cl^-) à la surface de la membrane ce qui empêche l'interaction avec les charges négatives de l'actine. Par ailleurs, le MgCl_2 étant aussi sous forme de chlorure, on peut se demander si l'utilisation de grandes concentrations de MgCl_2 aurait le même effet que le KCl sur l'interaction directe actine-lipides neutres.

On peut trouver une réponse à cette question dans les travaux de St-Onge (125). En effet, St-Onge a démontré que l'utilisation de grandes concentrations de MgCl_2 (>20 mM) inhibe l'interaction actine-lipides neutres. St-Onge explique ce résultat en proposant qu'il y ait une saturation des sites négatifs de l'actine et des liposomes par les ions divalents. La saturation des sites de l'actine entraîne la formation de paracristaux d'actine qui ne peuvent pas réagir avec les liposomes. Cette hypothèse proposée par St-Onge n'empêche pas le fait que les ions Cl^- pourraient aussi neutraliser les charges positives des phospholipides neutres.

4.2.2 - Analyse des résultats obtenus avec les lipides anioniques (DMPS et DMPG).

Les résultats obtenus avec les lipides anioniques (DMPS et DMPG) sont originaux en ce sens que personne n'a encore fait d'études systématiques par DSC et microscopie électronique avec des lipides chargés négativement. Les résultats obtenus en microscopie électronique montrent que ces lipides ont un effet sur l'organisation de l'actine. On observe des amas d'actine désorganisés qui sont de l'actine soit dépolymérisée, soit dénaturée.

Ceci est confirmé par DSC. En effet, on peut remarquer sur les thermogrammes d'actine en présence de lipides anioniques (fig.23 et 24) que la capacité calorifique (C_p) de la protéine

après sa dénaturation est plus élevée que la capacité calorifique de la protéine avant sa dénaturation (protéine native). Cette déviation positive du ΔC_p est une des caractéristiques de la dénaturation thermique des protéines monomériques (29).

En tenant compte de cette affirmation, on peut dire que les amas d'actine observés au microscope électronique correspondent à de l'actine dépolymérisée, et non pas à de l'actine dénaturée. De plus, si l'actine était dénaturée lors de l'incubation à température ambiante avec les lipides anioniques, comment pourrait-on mesurer un pic de dénaturation thermique de l'actine par DSC? Une actine dénaturée de façon complète donne un thermogramme plat. La présence de ce pic de dénaturation suggère donc que l'actine ne soit pas dénaturée par les lipides anioniques.

La disparition complète du pic d'agrégation observée par DSC correspond davantage à la dénaturation thermique de l'actine monomérique (actine-G) qui n'est pas accompagnée d'une agrégation après sa dénaturation. De plus, le ΔH_{cal} de dénaturation de l'actine-G est plus élevé que celui de l'actine-F, ce qui correspond à nos résultats. L'augmentation drastique du ΔH_{cal} de dénaturation de l'actine en présence de liposomes s'explique aisément par la théorie de superposition des pics décrite à la section 4.2.1. Ainsi, l'absence du pic d'agrégation n'entraîne pas un effet d'annulation sur le pic de dénaturation. On observe alors une augmentation "apparente" du ΔH_{cal} de dénaturation de l'actine.

Cependant, la température de dénaturation de l'actine-G est de 60 °C, alors que nous avons observé une température de dénaturation d'environ 67 °C en présence de liposomes. Il est donc probable que l'actine ne soit pas toute sous forme monomérique en présence de lipides anioniques (DMPS et DMPG). L'actine serait donc en partie sous forme dépolymérisée

(actine-G), en partie sous forme polymérisée (actine-F). Les amas observés au microscope électronique seraient un mélange d'actine-G et de courts filaments d'actine-F (fig.32).

En admettant que les amas d'actine désorganisés observés en microscopie électronique correspondent à un mélange d'actine-G et F, on peut se demander comment les lipides anioniques peuvent agir sur l'organisation de l'actine et provoquer sa dépolymérisation.

L'hypothèse la plus plausible implique un effet indirect de ces phospholipides sur l'actine. Il y aurait captation des cations divalents par les charges négatives des phospholipides, ce qui provoquerait une diminution des cations libres dans le milieu et, par conséquent, une dépolymérisation de l'actine. Ici, le terme dépolymérisation de l'actine est employé mais on peut se demander s'il y a vraiment une dépolymérisation ou s'il y a une inhibition de la formation des filaments. Les deux phénomènes se produisent probablement en même temps. Ainsi, lorsqu'on ajoute le Mg^{2+} au mélange actine-liposomes, il y aurait une certaine quantité d'actine qui polymériserait alors que la balance d'actine resterait sous forme monomérique. Il est difficile, voire impossible, de dire lequel de l'actine ou des liposomes captera le Mg^{2+} en premier sans connaître les constantes d'affinité de l'actine et des liposomes pour le Mg^{2+} , dans nos conditions ioniques. Quoi qu'il en soit, le résultat final est que l'actine se trouve sous forme dépolymérisée (actine-G) ou partiellement polymérisée (courts filaments d'actine) en présence de liposomes.

D'ailleurs, les résultats des travaux de Yamamoto *et al.* (149) vont dans ce sens. En effet, ces travaux réalisés par spectrophotométrie (mesure de l'absorbance de l'actine à 232 nm) ont montré que la présence de faible quantité de PS inhibe la polymérisation de l'actine de 86%. Les résultats obtenus par

le groupe de Yamamoto viennent donc appuyer cette hypothèse à savoir que la présence de phosphatidylsérine pourrait avoir un effet indirect sur la polymérisation de l'actine.

Selon notre hypothèse, la majorité des cations divalents seraient captés par les charges négatives des lipides. Ainsi, il n'y aurait plus assez de cations libres dans le milieu pour faire polymériser l'actine. La question qui se pose est la suivante: Quel est le pourcentage de cations divalents captés par les charges négatives des phospholipides?

Pour répondre à cette question, il faut calculer le rapport lipides/cations divalents. La quantité de lipides utilisés dans les expériences est d'environ 6.8 mM alors que la quantité totale de cations divalents est de 2.2 mM. Le rapport lipides/cations divalents est donc de 3.1. Cependant, il ne faut pas oublier que les liposomes utilisés sont composés d'un mélange de lipides (DMPC + DMPS ou DMPG). La quantité réelle de lipides anioniques est donc d'environ 3.4 mM et le rapport lipides/cations divalents prend alors une valeur de 1.5. À première vue, ce résultat indique qu'il y aurait amplement de lipides pour capter la majorité des cations divalents.

Les travaux de Herbette *et al.* (52) ont montré un ratio de une mole de Ca^{2+} par 10 moles de phospholipides. Ces résultats suggèrent que la quantité de lipides utilisés dans nos expériences soit insuffisante pour capter tous les cations divalents dans le milieu. Cependant, les travaux de Herbette ont été effectués avec des membranes composés seulement de DPPC et en présence de 5 à 10 mM de Ca^{2+} , alors que nos liposomes comportent des lipides anioniques, soit DMPS ou DMPG. Il est possible que la présence d'un lipide anionique augmente la quantité de Ca^{2+} capté par les liposomes. Les travaux de Macdonald et Seelig (75) montrent que pour de

faibles concentrations de Ca^{2+} , ce ratio ne change pas beaucoup en présence de liposomes composés de POPC:POPG (1:1). Toutefois, ces travaux ont été effectués en présence de 100 mM de NaCl, ce qui peut empêcher jusqu'à un certain point la captation des cations divalents par les phospholipides. Dans nos conditions, il est donc possible qu'une bonne partie des cations divalents soit captée par les phospholipides. Cependant, il est impossible de préciser si la quantité de cations divalents captée par les phospholipides est suffisante pour empêcher la polymérisation de l'actine.

Par ailleurs, les résultats obtenus en microscopie électronique avec des concentrations croissantes de KCl viennent appuyer notre hypothèse. En effet, en présence de grandes concentrations de cations monovalents, il y a moins de formation d'amas d'actine et on observe une présence accrue de filaments normaux. Les ions K^+ stabilisent les filaments d'actine. Cependant, les résultats obtenus par DSC ne viennent pas vraiment appuyer cette hypothèse. En effet, il semble que de grandes concentrations de KCl (150 mM) n'affectent pas le pic de dénaturation de l'actine puisqu'on observe toujours une disparition complète du pic d'agrégation à ces concentrations de KCl.

Pour vérifier notre hypothèse, des expériences relativement faciles à faire peuvent être proposées. D'abord, les expériences réalisées par DSC dans la présente étude pourraient être refaites mais avec des concentrations de cations divalents plus grandes, de l'ordre de 5 à 10 mM.

Ces études permettraient de vérifier s'il y a agrégation de la protéine, donc de l'actine sous forme polymérisée, en présence d'un excès de cations divalents. Une autre série d'expériences peut être effectuée qui consiste à doser les cations divalents libres dans le milieu. Ces expériences

pourraient être réalisées par absorption atomique et permettraient de mesurer la quantité de cations divalents captés par les charges négatives des phospholipides anioniques (DMPS ou DMPG). On pourrait alors ajuster la concentration de cations divalents en tenant compte de la quantité de cations captés par les phospholipides, de manière à obtenir une concentration finale de cations libres dans le milieu d'environ 2 mM. En ce sens, des expériences préliminaires ont été effectuées par Aissani (1). Les résultats ont montré que la quantité de Mg^{2+} résiduel dans le milieu est d'environ 0.4 mM en présence de liposomes composés de DMPC:DMPS (1:1) pour une concentration initiale de 2 mM de Mg^{2+} (condition utilisée dans la présente étude). Il semble donc que les phospholipides anioniques captent une quantité de cations divalents suffisante pour provoquer la dépolymérisation de l'actine.

Jusqu'ici, nous avons expliqué la disparition du pic d'agrégation par une dépolymérisation de l'actine due à une captation des cations divalents par les charges négatives des phospholipides anioniques (DMPS ou DMPG). Il y a une autre explication pour interpréter la disparition du pic d'agrégation de l'actine qui n'implique pas une dépolymérisation. Nous appellerons cette hypothèse "l'effet détergent". D'abord, il est important de rappeler que la DSC est une méthode de mesure indirecte des interactions actine-lipides (voir section 3). Par DSC, on mesure donc des effets des lipides sur le processus de dénaturation de l'actine qui ne sont pas nécessairement une preuve d'interaction. Les phénomènes observés peuvent donc être différents à la température ambiante et à la température de dénaturation de l'actine. L'effet détergent se produirait à la température de dénaturation de l'actine.

Ainsi, lorsque l'actine se dénature à une température d'environ 69 °C, les résidus hydrophobes sont exposés. Les phospholipides anioniques (DMPS ou DMPG) agissent alors

comme un savon en se fixant sur les parties hydrophobes des résidus. Cet effet détergent des lipides empêcherait donc l'agrégation des résidus hydrophobes. L'effet détergent est un phénomène qui dépend des conditions ioniques ainsi que de la quantité et de la nature des lipides qui se fixent sur les résidus hydrophobes.

La microscopie électronique ne supporte pas l'hypothèse d'un effet détergent se produisant seulement à la température de dénaturation de l'actine, en ce sens que toutes les manipulations concernant la microscopie électronique se font à température ambiante. Les amas d'actine observés par microscopie électronique se forment à température ambiante et non pas à la température de dénaturation de l'actine. Cependant, il est possible que l'effet détergent se produise à la température ambiante. Ceci impliquerait donc qu'une certaine quantité de lipides se fixerait sur les résidus hydrophobes de l'actine non dénaturée (native). Cette fixation des lipides entraînerait une modification de l'organisation de l'actine qui se traduirait par la présence d'agrégats au microscope électronique.

D'autre part, les résultats obtenus par DSC suggèrent une interaction possible entre l'actine et les liposomes anioniques (DMPS ou DMPG) compte tenu qu'on observe une modification du thermogramme des liposomes en présence d'actine. Cette interaction est peu probable puisque la microscopie électronique n'a absolument rien démontré en ce sens. D'ailleurs, les travaux de Miyata et Hotani (83) montrent que la présence d'un lipide anionique, la cardiolipine, dans la bicouche membranaire n'inhibe pas la polymérisation de l'actine. Ces résultats n'appuient pas l'hypothèse d'une interaction puisque la cardiolipine est un lipide formé de deux molécules de PG (50), dont la charge globale est négative. S'il y avait une interaction directe entre l'actine et les lipides anioniques qui entraînerait

une dépolymérisation de l'actine, les résultats des travaux de Miyata et Hotani (83) ne montreraient pas de l'actine polymérisée.

4.2.3- Analyse des résultats obtenus avec le DMPA.

Les résultats obtenus avec le lipide anionique DMPA sont quelque peu surprenants. En effet, étant donné la charge négative de ce lipide, on s'attendait à obtenir, soit des résultats similaires à ceux obtenus avec les autres lipides anioniques (DMPS et DMPG), soit aucune interaction avec l'actine. Les résultats ont plutôt montré une interaction directe entre l'actine et le DMPA similaire à l'interaction observée entre l'actine et les lipides neutres (DMPC et DMPE). Ainsi, on observe en calorimétrie une disparition partielle du pic de dénaturation de l'actine en présence de liposomes. En microscopie électronique, nous avons observé une organisation non structurée des filaments d'actine ne recouvrant pas entièrement la surface des liposomes.

La disparition partielle du pic de dénaturation de l'actine s'explique bien avec la théorie de superposition des pics. Ainsi, il y aurait une concentration locale d'actine à la surface des liposomes, ce qui entraînerait une agrégation rapide. Cependant, la concentration locale des filaments d'actine à la surface des liposomes ne serait pas assez élevée pour permettre l'annulation complète du pic positif par le pic négatif. Ces résultats sont difficiles à interpréter mais on peut cependant émettre une hypothèse pour les expliquer.

D'abord, il ne faut pas oublier que les liposomes utilisés ici sont constitués d'un mélange de lipides, soit le DMPC et le DMPA dans des proportions égales. Il est maintenant bien établi que l'ajout de cations divalents à un tel mélange de lipides peut provoquer la formation de domaines de lipides à l'intérieur de

la bicouche phospholipidique *in vitro* (43, 56, 57, 70, 79, 102, 142, 146). En fait, les cations divalents serviraient à maintenir liées ensemble les molécules chargées négativement (68, 70, 89, 90, 110). Dans le cas qui nous concerne, la présence de cations divalents pourrait induire la formation de domaines composés de molécules de DMPA et, par conséquent, les molécules de DMPC se retrouveraient aussi sous forme de domaines. D'ailleurs, le thermogramme des liposomes seuls, composés de DMPC:DMPA (1:1), obtenus par DSC, montre qu'il y a un pic de transition avec un épaulement, donc coexistence de deux phases.

Selon notre hypothèse, l'interaction observée entre l'actine et les liposomes composés d'un mélange de DMPC:DMPA (1:1) serait due aux molécules de DMPC, présentes sous forme de domaines dans la bicouche membranaire, et non pas aux molécules de DMPA. L'interaction serait donc du même type que celle observée entre l'actine et les lipides neutres, à savoir une interaction de nature électrostatique, nécessitant la présence de cations divalents. Cependant, étant donné la présence d'une moins grande quantité de molécules de DMPC, l'interaction ne pourrait se faire sur toute la surface des liposomes. On observe donc une interaction partielle en calorimétrie et en microscopie électronique.

D'autre part, les résultats obtenus avec le KCl en microscopie électronique et en calorimétrie sont quelque peu différents. En effet, la microscopie a montré que la présence de faibles concentrations de KCl inhibe complètement l'interaction actine-lipides. Ces résultats supportent en partie les résultats obtenus par DSC puisque ceux-ci montrent qu'il y a une inhibition partielle de l'interaction en présence d'une faible concentration (20 mM) de cations monovalents (fig.35 et 37).

En général, la microscopie électronique ne vient pas appuyer les résultats obtenus par DSC quant à l'effet du KCl. Pour pouvoir affirmer ou confirmer qu'il y a inhibition ou non par le KCl, il faudrait déterminer comment se distribue les ions à la surface des liposomes, ce qui est impossible ici. Cependant, on peut émettre quelques idées à la lumière de nos résultats.

Par exemple, le thermogramme des liposomes composés de DMPC:DMPA (1:1) en présence d'actine montre toujours un pic de transition avec un épaulement, même à des concentrations élevées de KCl. Il semble donc qu'il y ait toujours formation de domaines de lipides en présence d'actine. Ces domaines pourraient être formés par la liaison de l'actine à certaines molécules de lipides, ce qui induirait un réarrangement des molécules de lipides à l'intérieur de la bicouche phospholipidique.

D'autre part, en microscopie électronique, l'utilisation du KCl inhibe complètement l'interaction, ce qui est contraire aux résultats obtenus par DSC. Une différence entre les deux techniques est l'utilisation de l'acétate d'uranyl pour colorer les échantillons en microscopie électronique. Il est probable que la présence de ce colorant, qui est aussi un sel, soit la cause de l'inhibition de l'interaction actine-liposomes par le KCl. Il est cependant impossible de dire comment l'acétate d'uranyl agirait sur le système actine-liposomes composés de DMPC:DMPA (1:1).

4.2.4- Analyse des résultats obtenus avec le DGDG.

Les résultats obtenus par microscopie électronique avec le lipide non-chargé DGDG n'ont montré aucune interaction entre l'actine et le lipide. Cependant, les résultats obtenus par DSC montrent un effet du lipide sur le processus de dénaturation thermique de l'actine (diminution de la T_m et augmentation du ΔH_{cal}). L'augmentation "apparente" du ΔH_{cal} s'explique avec la théorie de superposition des pics. Ainsi, on observe une diminution marquée de la T_m de l'actine en présence de liposomes, ce qui a pour conséquence de favoriser un découplage du pic positif et négatif. Il n'y a donc plus ou pratiquement plus d'annulation du pic de dénaturation par le pic d'agrégation, d'où une augmentation "apparente" du ΔH_{cal} de dénaturation de l'actine.

Nous sommes donc en présence d'un effet du DGDG sur le processus de dénaturation de l'actine qui se produit seulement à la température critique de dénaturation de l'actine. C'est donc un effet détergent du DGDG qui se traduit par un découplage de la dénaturation versus l'agrégation. L'effet détergent observé ici est différent de celui observé entre l'actine et les lipides anioniques (DMPS ou DMPG). Dans ce cas-ci, l'effet détergent facilite la dénaturation sans modification de l'agrégation.

Par ailleurs, l'hypothèse d'une interaction directe entre l'actine et le DGDG est peu probable. En fait, la microscopie électronique et l'absence d'effet du KCl plaident fortement contre une interaction directe.

Les résultats obtenus avec le DGDG supportent donc le modèle proposé par Gicquaud (45) et Pigeon (107), à savoir que l'interaction actine-lipides est de nature électrostatique. En effet, selon ce modèle, il ne devrait pas y avoir une interaction

entre l'actine et le DGDG puisque ce lipide est non-chargé. Les résultats n'ont montré aucune évidence d'une interaction actine-DGDG, ce qui est conforme au modèle proposé.

4.3 - Implication *in vivo* des interactions actine-lipides membranaires.

À la lumière des résultats obtenus dans la présente étude, nous pouvons dire que la nature de la tête polaire des phospholipides influence de façon directe l'interaction actine-lipides membranaires *in vitro*. Ces résultats nous amènent à nous poser la question: Est-ce que les interactions directes actine-lipides peuvent se produire *in vivo*? Même si nos résultats ne prouvent pas que ces phénomènes existent *in vivo*, l'existence de ces interactions actine-lipides dans les membranes naturelles semble possible puisque l'actine peut réagir avec les lipides qui composent les membranes (PC, PE, PA). Cependant, les conditions ioniques jouent un rôle important dans les interactions actine-lipides. Dans les cellules, la concentration de Mg^{2+} est estimée être entre 1 et 8 mM (41) et celle du K^+ , autour de 100 mM. En se basant sur nos résultats, ces conditions ioniques ne sont pas optimales pour favoriser l'interaction actine-lipides, entre autres avec les lipides neutres. Néanmoins, dans ces conditions, une interaction est quand même possible.

Par ailleurs, plusieurs études antérieures ont montré qu'une partie de l'actine attachée aux membranes cellulaires peut être facilement détachée par lavage, alors que le reste demeure solidement ancrée à la membrane (31, 32, 48). L'actine solidement ancrée semble être associée aux protéines membranaires. On peut donc concevoir qu'une partie de l'actine facilement détachable pourrait interagir avec les lipides neutres selon le modèle proposé à la section 1.5.1. On peut même pousser le raisonnement un peu plus loin en supposant

qu'il y ait formation de domaines de lipides à l'intérieur de la membrane *in vivo*.

Ces domaines pourraient servir de sites d'ancrage de l'actine-F, selon les têtes polaires impliquées dans ce regroupement de lipides. Ainsi, les domaines formés de lipides neutres (PC ou PE) pourraient servir de sites d'ancrage pour les filaments d'actine sur la membrane.

En résumé, nos résultats ne sont pas incompatibles avec les études qui proposent que l'actine soit liée aux membranes via des protéines intrinsèques. Nos résultats nous amènent plutôt à la conclusion que deux types d'attachements actine-membrane peuvent exister dans les cellules, à savoir une interaction directe avec les lipides et un ancrage de l'actine via des protéines membranaires.

5. CONCLUSIONS

Nos résultats ont montré que la tête polaire des phospholipides influence de façon directe l'interaction actine-lipides.

1. L'interaction de l'actine avec les lipides neutres (DMPC et DMPE) montre qu'il y a formation de paracristsaux d'actine-F à la surface des liposomes. La présence de cations divalents est nécessaire à l'interaction. Par contre, elle est inhibée par les cations monovalents.

Ces résultats sont conformes au modèle proposé selon lequel l'interaction actine-lipides neutres est de nature électrostatique. Selon ce modèle, la liaison des cations divalents au groupement phosphate des molécules de phospholipides permet d'établir un lien entre deux molécules de lipides qui entraîne un changement d'orientation de la tête polaire des phospholipides. Cette nouvelle orientation de la tête polaire résulte en une meilleure exposition des charges positives permettant alors la liaison avec l'actine-F.

2. Nous avons montré que les lipides anioniques (DMPS et DMPG) ont un effet sur l'actine. Ces lipides anioniques entraînent probablement une dépolymérisation des filaments d'actine qui se trouve alors sous forme d'agrégats. Nous proposons deux hypothèses qui pourraient expliquer la présence de ces agrégats d'actine:

- a) La première hypothèse implique un effet indirect des phospholipides sur l'actine. Il y aurait captation des cations divalents par les charges négatives des phospholipides, ce

qui provoquerait une diminution des cations libres dans le milieu et, par conséquent, une dépolymérisation de l'actine.

- b) La seconde hypothèse implique un effet détergent des phospholipides. Les lipides agiraient comme un savon en se fixant sur les parties hydrophobes des résidus, exposés lors de la dénaturation de l'actine, empêchant ainsi l'agrégation des résidus. Cette hypothèse n'implique pas une dépolymérisation des filaments d'actine.

L'existence de ces interactions actine-lipides dans les membranes naturelles semble possible puisque l'actine peut réagir avec les lipides qui composent les membranes. Cependant, ces interactions directes actine-lipides occuperaient un rôle secondaire dans les mécanismes de régulation actine-membranes *in vivo*. Ainsi, la formation de domaine de lipides *in vivo* pourraient servir de sites d'ancrage de l'actine-F, selon les têtes polaires impliquées dans ce regroupement de lipides.

RÉFÉRENCES

1. Aissani, M. *L'effet du Mg⁺⁺ sur l'interaction actine-lipides*. Communication personnelle, 1994.
2. Akutsu, H. et Seelig, J. *Interaction of metal ions with phosphatidylcholine bilayer membranes*. *Biochemistry*, 1981, **20**, 7366-7373.
3. Altenbach, C. et Seelig, J. *Ca²⁺ binding to phosphatidylcholine bilayers as studied by deuterium magnetic resonance. Evidence for the formation of a Ca²⁺ complex with two phospholipid molecules*. *Biochemistry*, 1984, **23**, 3913-3920.
4. Bally, M.; Hope, M.; Mayer, L.; Madden, T. et Cullis, P. *Liposomes as drug carriers* (Gregoriadis, G., Ed.). pp 841-853, John Willey and Sons, Toronto.
5. Barany, M.; Findelman, F. et Theratriel-Antony, T. *Studies on the bound calcium*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1962, **98**, 28-45.
6. Bayerl, T.M.; Schmidt, C.F. et Sackmann, E. *Kinetics of symmetric and asymmetric phospholipid transfer between small sonicated vesicles by high-sensitivity differential scanning calorimetry, NMR, electron microscopy and dynamic light scattering*. *Biochemistry*, 1988, **27**, 6078-6085.
7. Bennett, V. *The spectrin-actin junction of erythrocyte membrane skeletons*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1989, **988**, 107-121.

8. Berl, S.; Puszkin, S. et Nicklas, W.J. *Actomyosin-like protein in brain*. Science, 1973, **179**, 441-446.
9. Blume, A. *A comparative study of the phase transitions of phospholipid bilayers and monolayers*. Biochim. Biophys. Acta, 1979, **557**, 32-44.
10. Bradley, M.O. *Microfilament and cytoplasmic streaming: Inhibition of streaming by cytochalasin*. J. Cell Sci., 1973, **12**, 327-334.
11. Bretscher, A. *Molecular architecture of the microvillus cytoskeleton*: In: Brush border membranes. Pitman books Ltd. London (Ciba Foundation symposium 95), 1983, 164-179.
12. Brown, S.S.; Malinoff, H.L. et Wicha, M.S. *Connectin: Cell surface protein that binds both laminin and actin*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1983, **80**, 5927-5930.
13. Burridge, K. et Connell, L. *Talin: a cytoskeletal component concentrated in adhesion plaques and other sites of actin-membrane interaction*. Cell Motil., 1983, **3**, 405-417.
14. Burridge, K. et Phillips, J.H. *Association of actin and myosin with secretory granule membranes*. Nature, 1975, **254**, 526-529.
15. Carlier, M.-F. *Actin polymerization and ATP hydrolysis*. Adv. Biophys., 1990, **26**, 51-73.
16. Carlier, M.-F. *Actin: protein structure and filament dynamics*. J. Biol. Chem., 1991, **266**, 1-4.

17. 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.
18. Carothers Carraway, C.A.; Fang, H.; Ye, X.; Juang, S.-H.; Liu, Y.; Carvajal, M.E. et Carraway, K.L. *Membrane-microfilament interactions in ascites tumor cell microvilli*. J. Biol. Chem., 1991, **266**, 16238-16246.
19. Carraway, K.L. et Carothers Carraway, C.A. *Membrane-cytoskeleton interactions in animal cells*. Biochim. Biophys. Acta, 1989, **988**, 147-171.
20. Chang, C.M. et Goldman, R.D. *The localization of actin-like fibers in cultured neuroblastoma cells as revealed by heavy meromyosin binding*. J. Cell Biol., 1973, **57**, 867-874.
21. Chapman, D. *The structure of lipids*. Ed. Methuen, London, 1965.
22. Chapman, D.; Williams, R.M. et Ladbroke, B.D. *Physical studies of phospholipid VI. Thermotropic and lyotropic mesomorphism of some 1,2-diacyl-phosphatidylcholine (lecithins)*. Chem. Phys. Lipids, 1967, **1**, 445-475.
23. Chapman, D. *Biological membranes*. Vol. 1, Ed. Academic Press, N.Y., 1968.
24. Condeelis, J.S. *The identification of F-actin in the pollen tube and protoplast of Amaryllis belladonna*. Exp. Cell Res., 1974, **88**, 435-439.

25. 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.
26. Cooke, R. *The mechanism of muscle contraction.* CRC Crit. Rev. Biochem., 1986, 21, 53-118.
27. Cooke, R. *The role of the bound nucleotide in the polymerization of actin.* Biochemistry, 1975, 14, 3250-3256.
28. Cooper, A. et Johnson, C.M. *Differential scanning calorimetry.* Methods in Molecular Biology, Vol. 22: Microscopy, Optical Spectroscopy, and Macroscopic Techniques Chap. 9, pp 109-124. Ed. Humana Press Inc., Totowa, NJ, 1994.
29. Creighton, T.E. *Proteins: Structure and molecular properties.* Ed. W.H. Freeman and Company, New York, 1993.
30. Datta, D.B. *A comprehensive introduction to membrane biochemistry.* Ed. Floral Publishing Madison, WI, 1987.
31. Davies, G.E. *Association of actin with the platelet membrane.* Biochim. Biophys. Acta, 1984, 772, 149-160.
32. De Couet, H.G.; Stowe, S. et Blest, A.D. *Membrane-associated actin in the rhabdomeral microvilli of crayfish photoreceptors.* J. Cell Biol., 1984, 98, 834-846.

33. De Rosier, D.J. et Tilney, L.G. *The form and function of actin: a product of its unique design.* Cell Muscle Motil., 1984, 5, 139-169.
34. Dos Remedios, C.G. et Dickens, M.J. *Actin microcrystals and tubes formed in the presence of gadolinium ions.* Nature, 1978, 276, 731-733.
35. 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.
36. Engel, J.; Fasold, H.; Hulla, F.W.; Waechter, F. et Wegner, A. *The polymerization reaction of muscle actin.* Mol. Cell. Biochem., 1977, 18, 3-13.
37. Epand, R.M.; Gabel, B.; Epand, R.F.; Sen, A.; Hui, S.W.; Muga, A. et Surewicz, W.K. *Formation of a new stable phase of phosphatidylglycerols.* Biophys. J. 1992, 63, 327-332.
38. Estes, J.E.; Selden, L.A.; Kinosian, H.J. et Gershman, L.C. *Tightly-bound divalent cation of actin.* J. Muscle Res. Cell Motil., 1992, 13, 272-284.
39. Fisher, A.J.; Curmi, P.M.G.; Barden, J.A. et Dos Remedios, C.G.D. *A reinvestigation of actin monomer conformation under polymerizing conditions based on rates of enzymatic digestion and ultraviolet difference spectroscopy.* Biochim. Biophys. Acta, 1983, 748, 220-229.
40. Forer, A. *Does actin produce the force that moves a chromosome to the pole during anaphase?* Can. J. Biochem. Cell Biol., 1985, 63, 585-598.

41. Fulton, A.B. *Treadmilling, diffusional exchange and cytoplasmic structures*. J. Muscle Res. Cell Motility, 1985, **6**, 263-273.
42. Gagné, J.-F. *La dénaturation thermique de l'actine*. Rapport de stage de biologie médicale (communication personnelle), 1994.
43. Galla, H.J. et Sackmann, E. *Chemically induced lipid phase separation in model membranes containing charged lipids: A spin label study*. Biochim. Biophys. Acta, 1975, **401**, 509-529.
44. Gennis, R.B. *Biomembranes: Molecular structure and function*. Ed. Springer-Verlag New York Inc., New York, 1989.
45. Gicquaud, C. *Actin conformation is drastically altered by direct interaction with membrane lipids: A differential scanning calorimetry study*. Biochemistry, 1993, **32**, 11873-11877.
46. Grimard, R.; Tancrede, P. et Gicquaud, C. *Interaction of actin with positively charged phospholipids: a monolayer study*. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1993, **190**, 1017-1022.
47. Gruenstein, E. *Membrane associated actin decrease following the transformation of chick embryo fibroblasts*. Biophys. J., 1975, **15**, 160a.
48. Gruenstein, E.; Rich, A. et Weihing, R.R. *Actin associated with plasma membranes from 3T3 and Hela cells*. J. Cell Biol., 1975, **64**, 223-234.

49. Hanson, J. Abstr. 7th Int. Cong. Biochem. Tokyo 1976, II-327; Sym. Biol. Hung., 8, 99 (1967).
50. Granner, D.K.; Mayes, P.A.; Murray, R.K. et Rodwell, V.W. *Harper, Précis de biochimie*. Les presses de l'Université Laval et ed. ESKA, Québec/Paris, 1989 Chap. 15: Lipides d'importance physiologique.
51. Heacock, C.S. et Bamburg, J.R. *Levels of filaments and globular actin in chinese hamster ovary cells throughout the cell cycle*. Exp. Cell Res., 1983, 147, 240-246.
52. Herbette, L.; Napolitano, C.A. et McDaniel, R.V. *Direct determination of the calcium profile structure for dipalmitoyllecithin multilayers using neutron diffraction*. Biophys. J., 1984, 46, 677-685.
53. Hope, M.J.; Bally, M.B.; Webb, G. et Cullis, P.R. *Production of large unilamellar vesicles by rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential*. Biochim. Biophys. Acta, 1985, 812, 55-65.
54. Huxley, A.F. *Reflections on Muscle*. Princeton University Press, 1980.
55. Isenberg, G. *Actin binding proteins-lipid interactions*. J. Muscle Res. Cell Motil., 1991, 12, 136-144.
56. Ito, T. *Synthesis of a new PS spin-label and Ca²⁺-induced lateral phase separation in PS-PC membranes*. Biochemistry, 1975, 14, 3064-3069.

57. Jacobson, K. et Papahadjopoulos, D. *Phase transitions and phase separations in phospholipid membranes induced by changes in temperature, pH, and concentration of bivalent cations*. Biochemistry, 1975, 14, 152-161.
58. Kabsch, W.; Mannherz, H.G.; Suck, D.; Pai, E.F. et Holmes, K.C. *Atomic structure of the actin: DNase I complex*. Nature, 1990, 347, 37-44.
59. Kabsch, W. et Vandekerckhove, J. *Structure and function of actin*. Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 1992, 21, 49-76.
60. Kawamura, M. et Maruyama, K. *Polymorphism of F-actin. Three forms of paracrystal*. J. Biochem., 1970, 68, 885-899.
61. Korn, E.D. et Hammer, J.A. *Myosin I*. Curr. Opinion in Cell Biol., 1990, 2, 57-61.
62. Korn, E.D.; Carlier, M.-F. et Pantaloni, D. *Actin polymerization and ATP hydrolysis*. Science, 1987, 238, 638-644.
63. Ladbroke, B.D.; Williams, R.M. et Chapman, D. *Studies on lecithin-cholesterol water interactions by differential scanning calorimetry and X-ray diffraction*. Biochim. Biophys. Acta, 1968, 150, 333-340.
64. Ladbroke, B.D. et Chapman, D. *Thermal analysis of lipids, proteins and biological membranes*. Chem. Phys. Lipids, 1969, 3, 304-367.
65. Laki, K.; Bowen, W.J. et Clark, A.M. *The polymerization of proteins*. J. Gen. Physiol., 1950, 33, 437-443.

66. Laki, K. et Clark, A.M. *On the nucleotide content of actin preparations*. J. Biol. Chem., 1951, **191**, 599-606.
67. Laliberté, A. et Gicquaud, C. *Polymerization of actin by positively charged liposomes*. J. Cell Biol., 1988, **106**, 1221-1227.
68. Lansman, J. et Haynes, D.H. *Kinetics of Ca²⁺-triggered membrane aggregation reaction of phospholipid membranes*. Biochim. Biophys. Acta, 1975, **394**, 335-347.
69. Le Bihan, T. *Approche cinétique de la dénaturation thermique de l'actine: Contributions expérimentale et théorique*. Mémoire de maîtrise en biophysique, UQTR, 1993.
70. Lee, A.G. *Lipid phase transitions and phase diagrams. II. Mixtures involving lipids*. Biochim. Biophys. Acta, 1977, **472**, 285-344.
71. Lis, L.J.; Lis, W.T.; Parsegian, V.A. et Rand, R.P. *Absorption of divalent cations to a variety of phosphatidylcholine bilayers*. Biochemistry, 1981, **20**, 1771-1777.
72. Llerenas, E. *The molecular interaction between F-actin and lecithin in a phospholipid monolayer system*. Bol. Estud. Med. Biol. Mex., 1985, **33**, 33-39.
73. Luna, E.J. et Hitt, A.L. *Cytoskeleton-plasma membrane interactions*. Science, 1992, **258**, 955-964.

74. Mabrey-Gaud, S. *Differential scanning calorimetry of liposomes*. In: Knight, C.G. (Ed) *Liposomes: from physical structure to therapeutic applications*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1981, 105-138.
75. Macdonald, P.M. et Seelig, J. *Calcium binding to mixed phosphatidylglycerol-phosphatidylcholine bilayers as studied by deuterium nuclear magnetic resonance*. *Biochemistry*, 1987, **26**, 1231-1240.
76. MacLean-Fletcher, S. et Pollard, T.D. *Mechanism of action of cytochalasin B on actin*. *Cell*, 1980, **20**, 329-341.
77. Martonosi, A.; Gouvea, M.A. et Gergely, J. *Studies on actin. I. The interaction of C¹⁴-labelled adenine nucleotide with actin*. *J. Biol. Chem.*, 1960, **235**, 1700-1703.
78. Martonosi, A.; Molino, C.M. et Gergely, J. *The binding of divalent cations to actin*. *J. Biol. Chem.*, 1964, **239**, 1057-1064.
79. McElhaney, R.N. *The use of differential scanning calorimetry and differential thermal analysis in studies of model and biological membranes*. *Chem. Phys. Lipids*, 1982, **30**, 229-259.
80. McLaughlin, A.; Grathwohl, C. et McLaughlin, S. *The adsorption of divalent cations to phosphatidylcholine bilayers membranes*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1978, **513**, 338-357.
81. Melchior, D.L. *Lipid domains in fluid membranes: a quick-freeze differential scanning calorimetry study*. *Science*, 1986, **234**, 1577-1580.

82. Milligan, R.A. et Flicker, P.F. *Structural relationships of actin, myosin, and tropomyosin revealed by cryoelectron microscopy*. J. Cell Biol., 1987, **105**, 29-39.
83. Miyata, H. et Hotani, H. *Morphological changes in liposomes caused by polymerization of encapsulated actin and spontaneous formation of actin bundles*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, **89**, 11547-11551.
84. 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.
85. 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.
86. Murphy, D.J.; Woodrow, I.E. *The lateral segregation model. Biosynthesis and function of plant lipids*. Ed. by Thomson, Mudd and Gibbs. American Society of Plant Physiologists, 1983, 104-125.
87. Murray, R.L. et Dubin, M.W. *The occurrence of actin-like filaments in association with migrating pigment granules in frog retinal pigment epithelium*. J. Cell Biol., 1975, **64**, 705-710.
88. Neuhaus, J.M.; Wanger, M.; Keiser, T. et Wegner, A. *Treadmilling of actin*. J. Muscle Res. Cell Motility, 1983, **4**, 507-527.

89. Newton, C.; Pangborn, W.; Nir, S. et Papahadjopoulos, D. *Specificity of Ca^{2+} and Mg^{2+} binding to PS vesicles and resultant phase changes of bilayer membrane structure.* Biochim. Biophys. Acta, 1978, **506**, 281-287.
90. Nir, S. et Bentz, J. *On the forces between phospholipid bilayers.* J. Colloid Interface Sci., 1978, **65**, 399-414.
91. Nonomura, Y.; Katayama, E. et Ebashi, S. *Effect of phosphates on the structure of the actin filament.* J. Biochem. (Tokyo), 1975, **78**, 1101-1104.
92. Okimasu, E.; Fujii, Y.; Utsumi, T.; Yamamoto, M. et Utsumi, K. *Cytoplasmic proteins, association with phospholipid vesicles and its dependency on cholesterol.* Cell Struct. Func.; 1986, **11**, 273-283.
93. Okimasu, E.; Nobori, K.; Kobayashi, S.; Suzaki, E.; Terada, S. et Utsumi, K. *Inhibitory effect of cholesterol on interaction between cytoplasmic actin and liposomes, and restorative effect of high osmotic pressure.* Cell Struct. Func., 1987, **12**, 187-195.
94. Oosawa, F. *Macromolecular assembly of actin.* In: Muscle and non-muscle motility (ed. by Stracher, A.), 1983, pp. 151-216. New York: Academic Press.
95. Oosawa, F. et Asakura, S. *Thermodynamics of the polymerization of protein.* New York: Academic Press, 1975.
96. Oriol-Audit, C. *Polyamine-induced actin polymerization.* Eur. J. Biochem., 1978, **87**, 371-376.
97. Otto, J.J. *Vinculin.* Cell Motil. Cytoskeleton, 1990, **16**, 1-6.

98. Palevitz, B.A. et Hepler, P.K. *Identification of actin in situ at the ectoplasm-endoplasm interface of Nitella*. J. Cell Biol., 1975, **6 5**, 29-38.
99. Pantaloni, D.; Carlier, M.-F. et Korn, E.D. *The interaction between ATP-actin and ADP-actin*. J. Biol. Chem., 1985, **2 6 0**, 6572-6578.
100. Papahadjopoulos, D.; Moscarello, M.; Eylar, E.H. et Isac, T. *Effects of proteins on thermotropic phase transitions of phospholipid membranes*. Biochim. Biophys. Acta, 1975, **4 0 1**, 317-335.
101. Papahadjopoulos, D. et Kimelberg, H.K. *Phospholipid vesicles (liposomes) as models for biological membranes: their properties and interactions with cholesterol and proteins*. Prog. Surface Sci., 1973, **4**, 141-232.
102. Papahadjopoulos, D.; Poste, G.; Schaeffer et Vail, W.J. *Membrane fusion and molecular segregation in phospholipid vesicles*. Biochim. Biophys. Acta, 1974, **3 5 2**, 10-28.
103. Pardee, J.D. et Spudich, J.A. *Mechanism of K⁺-induced actin assembly*. J. Cell Biol., 1982, **9 3**, 648-654.
104. Parise, L.V. et Phillips, D.R. *Reconstitution of the purified platelet fibrinogen receptor*. J. Biol. Chem., 1986, **2 6 0**, 10698-10707.
105. Payne, M.R. et Rudnick, S.E. *Regulation of vertebrate striated muscle contraction*. Trends Biochem. Sci., 1989, **1 4**, 357-360.

106. Payraastre, B. *Cytosquelette, phospho-inositides et transduction du signal*. médecine/sciences, 1992, 8, 127-133.
107. Pigeon, B. *Étude de l'interaction directe entre l'actine et les lipides membranaires (liposomes) par calorimétrie différentielle à balayage et microscopie électronique*. Mémoire de maîtrise en biophysique, UQTR, 1992.
108. Pollard, T.D. *Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions*. Ann. Rev. Biochem., 1986, 55, 987-1035.
109. Pollard, T.D. et Weeds, A.G. *The rate constant for ATP hydrolysis by polymerized actin*. FEBS letters, 1984, 190, 94-98.
110. Portis, A.; Newton, C.; Pangborn, W. et Papahadjopoulos, D. *Studies on the mechanism of membrane fusion: Evidence for an intermembrane Ca^{2+} -phospholipid complex, synergism with Mg^{2+} , and inhibition by spectrin*. Biochemistry, 1979, 18, 780-789.
111. Privalov, P.L. *Thermodynamic problems of protein structure*. Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem., 1989, 18, 47-69.
112. Privalov, P.L. et Gill, S.J. *Stability of protein structure and hydrophobic interaction*. Adv. Protein Chem., 1988, 39, 191-234.
113. Rioux, L. et Gicquaud, C. *Actin paracrystalline sheets formed at the surface of positively charged liposomes*. J. Ultrastruct. Res., 1985, 93, 42-49.

114. Rotman, A.; Heldman, J. et Linder, S. *Association of membrane and cytoplasmic proteins with the cytoskeleton in blood platelets*. *Biochemistry*, 1982, **21**, 1713-1719.
115. Rouyarenc, J.F. et Travers, F. *The first step in the polymerization of actin*. *Eur. J. Biochem.*, 1981, **116**, 73-77.
116. Roustan, C.; Benyamin, Y.; Boyer, M.; Bertrand, R.; Audemard, E. et Jauregui-Adell, J. *Conformational changes induced by Mg²⁺ on actin monomers*. *FEBS letters*, 1985, **181**, 119-123.
117. Scheel, J.; Ziegelbauer, K.; Kupke, T.; Humbel, B.M.; Noegel, A.; Gerisch, G. et Schleicher, M. *Hisactophilin, a histidine-rich actin-binding protein from Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.*, 1989, **264**, 2832-2839.
118. Schroeder, T.E. *Actin in dividing cells: Contractile ring filaments bind heavy meromyosin*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1973, **70**, 1688-1692.
119. Seelig, J.; MacDonald, P.M. et Scherer, P.G. *Phospholipid head groups as sensors of electric charge in membranes*. *Biochemistry*, 1987, **26**, 7535-7541.
120. Shechter, E. *Biochimie et biophysique des membranes*. Ed. Masson, Paris, 1990.
121. Shechter, E. *Membranes biologiques (structure, transports et bioénergétique)*. Ed. Masson, Paris, 1984.

122. Sheetz, M.P.; Painter, R.G. et Singer, S.J. *The contractile proteins of erythrocyte membranes and erythrocyte shape changes*. In: Cell Motility, Goldman, R.; Pollard, T.; Rosenbaum, J. eds. Cold Spring Harbor Laboratory, Vol. B, 1976, pp. 651-664.
123. Spudich, J.A. et Watt, S. *The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I: Biochemical studies of the interaction of tropomyosin-troponin complex with actin and proteolytic fragments of myosin*. J. Biol. Chem., 1971, **246**, 4866-4871.
124. Squire, J.M. *Mechanisms in muscular contraction*. Edité par J.M. Squire, CRC Press Inc., Boca Raton, Floride, 1990.
125. St-Onge, D. *Études de l'interaction entre l'actine et les lipides*. Mémoire de maîtrise en biophysique, UQTR, 1986.
126. St-Onge, D. et Gicquaud, C. *Evidence of direct interaction between actin and membrane lipids*. Biochem. Cell Biol., 1989, **67**, 297-300.
127. St-Onge, D. et Gicquaud, C. *Research on the mechanism of interaction between actin and membrane lipids*. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1990, **167**, 40-47.
128. Straub, F.B. et Feuer, G. *Adenosinetriphosphate functional group of actin*. Biochim. Biophys. Acta, 1950, **4**, 455-470.
129. Strzelecka-Golaszewska, H.; Prochniewick, E. et Drabikowski, W. *Interaction of actin with divalent cations. The effect of various cations on the physical state of actin*. Eur. J. Biochem., 1978, **88**, 219-227.

130. Strzelecka-Golaszewska, H.; Prochniewick, E. et Drabikowski, W. *Interaction of actin with divalent cations. Characterization of protein-metal complexes.* Eur. J. Biochem., 1978, **88**, 229-237.
131. Szoka, F. et Papahadjopoulos, D. *Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (Liposomes).* Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 1980, **9**, 467-508.
132. 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.
133. Taylor, K.A. et Taylor, D.W. *Formation of 2-D paracrystals on phospholipid layers mixed with quarternary ammonium surfactants.* J. Struct. Biol., 1992, **108**, 140-147.
134. Thompson, T.E. et Huang, C. *Membrane Physiology. Composition and Dynamics of Lipids in Biomembranes.* Ed. by Andreoli, Hoffman, Fanestil and Schultz. Plenum Medical Book Company, New York, 1987, chapitre 2, pp. 25-44.
135. Trifaro, J.M.; Bader, M.F. et Doucet, J.P. *Chromaffin cell cytoskeleton: its possible role in secretion.* Can. J. Biochem. Cell Biol., 1985, **63**, 661-679.
136. Tsilibary, E.C. et Williams, M.C. *Actin and secretion of surfactant.* J. Histochem. Cytochem., 1983, **31**, 1298-1304.
137. Utsumi, K.; Okimasu, E.; Morimoto, Y.M.; Nishihara, Y. et Miyahara, M. *Selective interaction of cytoskeletal proteins with liposomes.* FEBS Letters, 1982, **141**, 176-180.

138. Utsumi, K.; Okimasu, E.; Takehara, Y.; Watanabe, S.; Miyahara, M. et Moromizato, Y. *Interaction of cytoplasmic proteins with liposomes and their cell specificity*. FEBS Letters, 1981, **124**, 257-260.
139. Uyemura, D.G.; Brown, S.S. et Spudich, J.A. *Biochemical and structural characterization of actin from Dictyostelium discoideum*. J. Biol. Chem., 1978, **253**, 9088-9096.
140. Vandekerckhove, J. et Weber, K. *Actin amino acid sequences. Comparison of actins from calf thymus, bovine brain, and SV-40 transformed 3T3 cells with rabbit skeletal muscle actin*. Eur. J. Biochem., 1978, **90**, 451-462.
141. 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, **126**, 783-802.
142. Van Dijck, P.W.M.; De Kruijff, B.; Verkleij, A.J.; Van Deenen, L.L.M. et De Gier, J. *Comparative studies on the effects of pH and Ca²⁺ on bilayers of various negatively charged phospholipids and their mixtures with phosphatidylcholine*. Biochim. Biophys. Acta, 1978, **512**, 84-96.
143. Webb, M.S.; Tilcock, C.P.S. et Green, B.R. *Salt-mediated interactions between vesicles of the thylakoid lipid digalactosyldiacylglycerol*. Biochim. Biophys. Acta, 1988, **938**, 323-333.

144. 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.
145. Wegner, A. et Engel, J. *Kinetics of the cooperative association of actin to actin filaments.* Biophys. Chem., 1975, **3**, 215-225.
146. Wilschut, J. *Preparation and properties of phospholipid vesicles.* In: Leserman, L.D. et Barbet, J. (Eds) *Méthodologie des liposomes appliquée à la pharmacologie et à la biologie cellulaire*, Éditions INSERM, Paris, 1982, **107**, 9-24.
147. Wohlman, A. et Allen, R.D. *Structural organization associated with pseudopod extension and contraction during cell locomotion in Dictyostelium.* J. Cell Sci., 1968, **3**, 105-114.
148. Wuesthube, L.J. et Luna, E.J. *F-actin binds to the surface of ponticulín, a 17-kD integral glycoprotein from Dictyostelium plasma membranes.* J. Cell Biol., 1987, **105**, 1741-1751.
149. Yamamoto, T.; Nojima, M.; Yamamoto, N.; Ishiura, S. et Sugita, S. *Effect of phosphatidyl-L-serine and vinculin on actin polymerization.* Int. J. Biochem., 1987, **19**, 121-125.
150. Zot, H.G.; Doberstein, S.K. et Pollard, T.D. *Myosin I moves actin filaments on a phospholipid substrate: Implications for membrane targeting.* J. Cell Biol., 1992, **116**, 367-376.