

UNIVERSITE DU QUEBEC

MEMOIRE

PRESENTÉ A

L'UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE

PAR

DOMINIQUE ST-ONGE

ETUDES DE L'INTERACTION ENTRE L'ACTINE

ET LES LIPIDES

AVRIL 1986

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.

A COEUR VAILLANT RIEN D'IMPOSSIBLE

CE QUE FEMME VEUT, DIEU LE VEUT

A papa, pour m'avoir permis d'être là!

RESUME

Les interactions entre l'actine et les membranes naturelles ont fait l'objet de nombreuses études. Il est généralement admis que l'actine est liée aux membranes par l'intermédiaire de protéines membranaires. La littérature ne fait aucunement mention de la possibilité d'une interaction directe entre l'actine et les lipides membranaires.

Dans ce projet de maîtrise nous avons montré qu'il existe, dans certaines conditions, une interaction entre l'actine et les lipides membranaires.

Nous avons étudié le phénomène à l'aide d'un système composé d'actine-G ou F et de vésicules artificielles: les liposomes chargés positivement, négativement et neutres. L'interaction entre les liposomes et l'actine a été mesurée par viscosimétrie à faible taux de cisaillement, turbidimétrie, cosédimentation ainsi que par microscopie électronique.

Nos résultats nous ont montré qu'une interaction peut avoir lieu entre l'actine et les lipides chargés positivement. Cette interaction est donc de nature électro-

statique . Cette interaction se traduit par la formation d'agrégats de liposomes maintenus ensemble par l'actine.

Nous avons par la suite étudié l'influence de certains facteurs physicochimiques susceptibles de modifier les interactions actine-lipides en particulier, la concentration d'actine, les ions K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , le pH , la température, et la concentration d'ATP.

Les résultats de la viscosimétrie à faible taux de cisaillement montrent qu'il se forme un réseau entre l'actine et les liposomes chargés positivement. Les liposomes servent de point de pontage entre les filaments.

Les expériences portant sur l'étude des ions monovalents (K^+) et divalents (Mg^{2+} et Ca^{2+}) confirment l'hypothèse que l'interaction entre l'actine et les liposomes chargés positivement est de nature électrostatique puisque l'interaction est inhibée en présence de fortes concentrations de ces cations.

En présence d'environ 10 mM d'ions Mg^{2+} et Ca^{2+} , on observe aussi des interactions entre l'actine et les liposomes chargés négativement et neutres. Les cations bivalents servent à lier les liposomes et l'actine.

Des variations de pH, de température et d'ATP ne modifient pas les interactions entre l'actine et les liposomes et nous concluons que ces facteurs n'ont aucune influence sur les interactions actine-lipides.

Les photographies au microscope électronique montrent que les filaments d'actine se disposent de façon régulière à la surface des liposomes, ils forment des structures paracrystallines. Les filaments se disposent soit les uns parallèles aux autres avec une périodicité correspondant au pas de l'hélice de la actine-F, soit en "filet". Dans ce cas les filaments s'entrecroisent aussi avec une certaine périodicité.

Il est conclu que l'interaction de l'actine avec les charges positives des liposomes provoque un changement de conformation de l'actine-F qui induit la formation de paracrystaux à la surface des liposomes.

D'autre part, l'existence d'une interaction entre l'actine et les lipides membranaires in vivo est à envisager puisque l'actine peut réagir avec les lipides chargés négativement et neutres en présence de faibles concentrations d'ions bivalents, conditions qui devraient exister dans certaines cellules.

AVANT-PROPOS

Janvier 1983, je suis avec mon directeur dans son bureau et nous définissons les grandes lignes de mon projet de maîtrise. Sujet tout à fait unique et original! me dit-il, cela va révolutionner le monde scientifique!!!! Ah!?! Me voilà maintenant dans un coin de la bibliothèque des piles de livres devant moi. Je commence le dépouillement de la littérature. Sujet très vaste et difficile à cerner puisqu'aucune recherche n'a porté sur le sujet auparavant.

J'ai maintenant mis au point les techniques de mesure et défini les paramètres expérimentaux. L'étude du phénomène commence! Plusieurs mois, jours, heures passés devant des multitudes d'éprouvettes et d'appareils de toutes sortes. J'ai enfin tous mes résultats et prête à rédiger ma thèse.

Décembre 1985. J'y suis arrivée! J'ai réussi à traverser un chemin difficile et parsemé d'embûches! Je suis très fière et heureuse du travail accompli! Le défi est à présent relevé!

Je désire remercier tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin au succès de mes études. En particulier, Dr. Claude Gicquaud, directeur de thèse, pour

m'avoir donné la chance de faire une maîtrise. Merci Docteur pour tous vos encouragements et pour votre infinie patience. Merci aux Drs. Hélène-Marie Thérien et Julian Gruda pour leurs conseils et les discussions pertinentes qui m'ont fait progresser rapidement sur la bonne voie. Merci aussi à toutes les personnes (étudiants et étudiantes, personnel enseignant,...) que j'ai côtoyées durant ces études et qui m'ont aidé à franchir les obstacles. Je ne peux toutes les nommer car elles sont nombreuses mais elles se reconnaîtront.

TABLE DES MATIERES

	Page
Résumé.....	ii
Avant-propos.....	v
Table des matières.....	vii
Liste des figures.....	xi
Introduction.....	1
I. Historique.....	1
II. Interaction entre l'actine et les membranes cellulaires.....	5
III. Objectif du projet de maîtrise.....	13
IV. L'actine et ses propriétés physico- chimiques.....	15
A) Polymérisation de l'actine.....	17
B) Paracristallisation.....	18
i) les paracristaux de Hanson.....	18
ii) les paracristaux de Kawamura.....	19
iii) les microcristaux de Gd^{3+}	19
V. Les liposomes.....	22

Matériel et méthodes.....	27
I. Liste des produits chimiques.....	27
II. Solutions tampons.....	27
III. Préparation des liposomes.....	28
IV. Préparation de l'actine.....	29
V. Techniques de mesure de l'interaction entre l'actine et les liposomes.....	30
A.1) Turbidimétrie.....	30
A.2) Cosédimentation.....	31
A.3) Manipulations pour les techniques de turbidimétrie et de cosédimen- tation.....	31
B) Mesure de la viscosité à faible taux de cisaillement.....	31
C) Microscopie électronique.....	32
Résultats.....	33
I. Mise en évidence d'une interaction entre les liposomes et l'actine-F.....	33

III. Etudes des facteurs physicochimiques qui influencent l'interaction entre l'actine et les liposomes.....	46
A) Influence du pourcentage de stéarylamine dans les liposomes sur l'interaction actine-liposomes.....	46
i) avec l'actine-G.....	46
ii) avec l'actine-F.....	46
B) Influence de la concentration de liposomes sur l'interaction actine-liposomes.....	49
i) avec l'actine-G.....	49
ii) avec l'actine-F.....	50
C) Mise en évidence de l'interaction actine-liposomes par viscosimétrie à faible taux de cisaillement.....	53
D) Influence de la concentration d'actine sur l'interaction actine-liposomes.....	55
i) avec l'actine-G.....	55
ii) avec l'actine-F.....	57
E) Influence des ions K ⁺ sur l'interaction actine-liposomes.....	63
F) Influence des ions divalents sur	

l'interaction actine-liposomes.....	69
G) Influence du pH sur l'interaction actine-liposomes.....	78
H) Influence de la température sur l'interaction actine-liposomes.....	81
i) avec l'actine-F.....	81
ii) avec l'actine-G.....	81
I) Influence de la concentration d'ATP sur l'interaction actine- liposomes.....	86
i) avec l'actine-F.....	86
ii) avec l'actine-G.....	87
III. Conclusion générale.....	94
Discussion.....	95
Bibliographie.....	106

LISTE DES FIGURES

Figures	Page
1. Modèle de la liaison de l'actine aux membranes des cellules épithéliales des bordures en brosse de l'intestin selon Mooseker et Tilney.....	7
2. Interaction entre le cytosquelette et la membrane du globule rouge.....	10
3. Schéma d'un filament d'actine.....	16
4. Les trois types de structures paracrystallines d'actine obtenus par Kawamura.....	21
5. Modèle d'une bicouche lipidique.....	24
6. Schéma d'un liposome unilamellaire.....	24
7. Effet de l'actine-F sur les liposomes chargés positivement, négativement et neutres.....	37
8. Changement de turbidité d'une solution de liposomes en présence d'actine-F.....	38

9.	Formation d'agrégats de liposomes chargés positivement par l'actine-F.....	39
10.	Mélange de liposomes neutres et d'actine-F.....	40
11.	Amas de liposomes chargés positivement et d'actine-F.....	41
12.	Disposition parallèle des filaments d'actine à la surface d'un liposome chargé positivement....	42
13.	Organisation des filaments d'actine en "filet" sur un liposome chargé positivement.....	43
14.	Arrangement au hasard des filaments d'actine à la surface d'un liposome chargé positivement....	44
15.	Disposition parallèle et en filet des filaments d'actine dans une même préparation.....	45
16.	Influence du pourcentage de stéarylamine dans les liposomes et de la concentration d'actine sur l'interaction actine-liposomes.....	48
17.	Influence de la concentration de liposomes sur l'interaction actine-liposomes.....	52

18.	Viscosité à faible taux de cisaillement d'un mélange d'actine-F et de liposomes en fonction de la dilution de liposomes.....	54
19.	Influence de la concentration d'actine-G sur l'interaction actine-liposomes.....	60
20.	Agrégats de liposomes chargés positivement et d'actine-G.....	61
21.	Influence de la concentration d'actine-F sur l'interaction actine-liposomes.....	62
22.	Influence des ions K ⁺ sur l'interaction actine-liposomes mesurée par turbidité différentielle.....	65
23.	Influence des ions K ⁺ sur l'interaction actine-liposomes chargés positivement.....	66
24.	Influence sur l'interaction actine-F-liposo- mes chargés positivement en présence de 25 mM de KCl.....	67
25.	Inhibition de l'interaction actine-F-liposomes chargés positivement en présence de 300 mM	

de KCl.....	68
26. Influence des ions Mg^{2+} sur l'interaction actine-liposomes.....	72
27. Influence des ions Ca^{2+} sur l'interaction actine-liposomes.....	73
28. Agrégation des liposomes chargés positivement par l'actine-F en présence de 15 mM de $MgCl_2$	74
29. Disposition parallèle des filaments d'actine sur un liposome en présence de 15 mM de $MgCl_2$	75
30. Photographie de liposomes neutres et d'actine-F en absence de 15 mM de $MgCl_2$	76
31. Interaction entre l'actine-F et les liposomes neutres en présence de 15 mM de $MgCl_2$	77
32. Influence du pH sur l'interaction actine-F- liposomes.....	79
33. Influence du pH sur l'interaction actine-G- liposomes.....	80

34.	Influence de la température sur l'interaction actine-F-liposomes.....	83
35.	Influence de la température sur l'interaction actine-G-liposomes.....	84
36.	Influence de la température sur l'interaction actine-G-liposomes.....	85
37.	Influence de l'ATP sur l'interaction actine-F- liposomes.....	89
38.	Influence de l'ATP sur l'interaction d'un mélange d'actine-F et de liposomes chargés positivement, de liposomes seuls et d'actine seule.....	90
39.	Influence de l'ATP sur l'interaction actine-G- liposomes.....	91
40.	Influence de l'ATP sur l'interaction d'un mélange d'actine-G et de liposomes chargés positivement, de liposomes seuls et d'actine seule.....	92
41.	Influence de l'ATP sur l'interaction d'un	

mélange d'actine-G et de liposomes neutres, de liposomes seuls et d'actine seule.....	93
42. Arrangements en "filet" et parallèle des filaments à la surface d'un liposome chargé positivement.....	105

INTRODUCTION

I- Historique

L'origine des études sur le mouvement remonte à environ 500 ans avant Jésus-Christ (voir revue dans 118). A l'époque, on ne parlait que de "chair" et non de muscle, et toutes les théories proposées se rapportaient aux éléments naturels: eau terre-air-feu. La première théorie relative au mouvement se présentait comme suit: l'air entrant par la bouche et les narines se mélange au sang par lequel il est transporté à la "chair", ce qui produit le mouvement. Cette théorie de "l'air" (Pneuma theory) fut longtemps acceptée par les scientifiques.

Au début du 3 ième siècle avant Jésus-Christ, Hérophilus d'Alexandrie ainsi que son contemporain Erasistratus reconnaissent le muscle comme l'organe du mouvement et proposèrent le premier mécanisme de la contraction musculaire. Selon eux, l'air respiré se rend aux poumons et de là au cœur, pour se changer ou s'associer à une substance. Le complexe ainsi formé, le "vital spirit" se rend au muscle par l'intermédiaire des nerfs pour produire le mouvement.

Cent ans plus tard, Rufus d'Ephèse isole le muscle par dissection et en décrit pour la première fois la structure: le muscle est composé de fines particules de sang qui entourent les nerfs, artères et veines.

Galen (129 à 201 après Jésus-Christ) travaille à disséquer plusieurs types de muscles et c'est avec lui qu'est née la "myologie".

Jusqu'à la Renaissance, peu de développements nouveaux ont eu lieu concernant la contraction et la physiologie musculaire. Vers 1540, Versalius propose que le muscle est composé de fines structures. Il contient plusieurs fibres qui sont retenues ensemble par la "chair". Par la suite, Fabricius Ad Aquapendente montre qu'il existe une différence entre la nature fibreuse du muscle et celle d'autres organes. William Croone, en 1664, observe que le muscle est constitué de fibres tendineuses entre lesquelles on retrouve la présence de "chair" et que ces fibres sont réunies ensemble par leurs extrémités. A la même époque, Nicholas Stensen montre que ces fibres peuvent être séparées en minuscules fibrilles.

Avec l'avènement du microscope optique, la structure fine du muscle sera précisée. Leeuwenhoek, en 1674, fait le premier examen microscopique du muscle et en 1682 décrit les striations transversales des fibres musculaires c'est-à-dire

l'alternance de bandes sombres et de bandes claires. D'après lui, ces striations sont dues à des fibres disposées perpendiculairement aux fibres musculaires. Mais Bowman (1840) va à l'encontre des observations de Leeuwenhoek sur la striation du muscle. Selon lui, les fibrilles composant le muscle sont constituées de "grains" et la striation serait due à un alignement des grains des fibrilles adjacentes. Ainsi les bandes claires seraient formées par l'alignement des grains et les bandes sombres par l'espace entre les grains. Plus tard, Krause et Hensen décrivent une bande sombre (ligne Q) au milieu de la bande claire (bande I), et de plus Hensen montre l'existence d'une région claire (bande H) au centre de la bande sombre (bande A).

Au milieu du 19 ième siècle débutent les travaux sur la biochimie du muscle. Kühne isole une protéine à laquelle il donne le nom de myosine. A partir de cette époque, les recherches se concentrent sur cette protéine. Halliburton (1887) découvre qu'en mélangeant une préparation de myosine avec de la poudre de muscle, il obtient un gel. Finck montre que la poudre fabriquée par Halliburton contient une autre protéine myofibrillaire qu'il a appelé actine et que le complexe moins soluble obtenu par Halliburton était formé d'une combinaison d'actine et de myosine.

Straub, en 1940, isole pour la première fois l'actine et

en a découvert les principales propriétés. En 1952, on reconnaît que l'actine est une des protéines responsables du mouvement.

Au milieu des années 1950, on a montré par microscopie électronique que les fibrilles musculaires contiennent deux types de filaments. Des filaments fins composés d'actine et des filaments épais composés de myosine.

Depuis le commencement, les études portant sur le mouvement, n'ont concerné que la cellule musculaire. Cependant, d'autres chercheurs ont eu un intérêt marqué pour l'étude d'autres cellules motiles: en particulier pour le mouvement du cytoplasme des cellules végétales (cyclose).

En 1952, Loewry fut le premier à isoler de l'actine chez un myxomycète Physarum polycephalum ce qui montrait une analogie biochimique entre le mouvement amiboidé et le mouvement musculaire. Depuis, l'actine a été identifiée chez de nombreuses cellules non-musculaires qui ont certaines formes de motilité.

Puisque les recherches sur l'actine ont débuté dans les systèmes motiles, on avait tendance à lui attribuer un rôle uniquement dans les mouvements cellulaires. Cependant, on reconnaît maintenant que l'actine joue aussi un rôle de

constituant du cytosquelette qui permet le maintien de la forme et de la structure générale des cellules.

III- Interaction entre l'actine et les membranes cellulaires

Comme nous l'avons déjà souligné, il est possible de retrouver l'actine aussi bien dans les cellules musculaires que dans les cellules non-musculaires telles que les amibes (35, 50, 75, 135, 136, 153, 177, 180), les cellules de la cornée (10, 14, 16, 44, 72, 82), les cellules cancéreuses (11 59, 63, 149), les fibroblastes (18, 63), les globules rouges (17, 33, 48, 64, 163), les hépatocytes (107, 122), les cellules de l'intestin (56, 105, 115), certaines moisissures comme Physarum polycephalum (117), les neutrophiles (14), les cellules nerveuses (8, 18, 28, 51, 92, 138, 139), chez les oeufs d'oursins de mer (79, 97, 110, 164), les cellules photoréceptrices (144), les lymphocytes (5), certaines plantes (1, 15, 36, 40, 90, 128, 129, 131) et les spermatozoïdes (54, 161).

On attribue à l'actine deux rôles différents:

- 1) Un premier rôle dans les phénomènes motiles comme le mouvement des cellules par émission de pseudopodes (38, 50, 159, 180), l'exocytose (8, 25, 37, 167, 170), le déplacement d'organites: granules de l'épithélium pigmentaire de la rétine chez la grenouille (116), lysosomes dans les leucocytes polymorphonucléaires (111), diffusion latérale des molé-

cules de rhodopsine des photorécepteurs des écrevisses (42), déplacement des granules dans les cellules chromaffines (20, 25). L'actine est aussi impliquée dans le phénomène de la cytokinèse (53, 67, 146), la production d'un courant cytoplasmique chez Nitella (15, 129), dans la régulation de la filtration glomérulaire (2), ainsi que dans la transmission synaptique (27).

2) L'actine joue aussi un rôle dans l'élaboration du cytosquelette: en particulier pour le maintien de la forme des cellules. Citons deux exemples bien connus:

a) Dans le globule rouge (62, 147), c'est l'interaction de l'actine avec d'autres protéines membranaires qui donne la forme biconcave aux érythrocytes.

b) Les microvillosités qui tapissent l'épithélium intestinal contiennent des faisceaux d'actine qui déforment la membrane (113). Comme on peut le voir dans la figure 1, l'actine contenue dans ces microvillosités est liée latéralement aux membranes par des protéines membranaires. D'autres protéines attachent aussi l'actine par l'extrémité du "bundle" au niveau de la plaque terminale.

Ces exemples ne sont pas limitatifs: il existe beaucoup d'autres cellules où l'actine joue un rôle de constituant du cytosquelette: cellules de la cornée (44), fibroblastes (62, 76), cellules cancéreuses (13, 179), plaquettes sanguines

(56, 141, 160), les neutrophiles (14), les cellules pulmonaires du rat (169), etc..

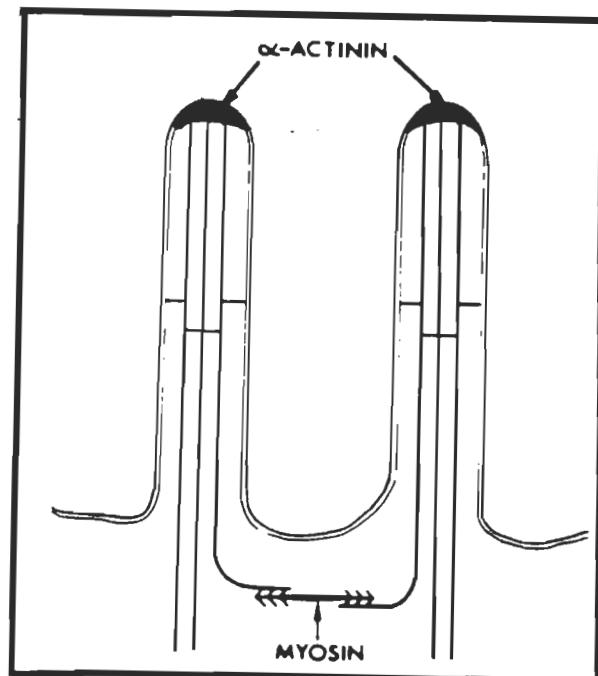


Figure 1: Modèle de la liaison de l'actine aux membranes des cellules épithéliales des bordures en brosse de l'intestin selon Mooseker et Tilney (113).

Un fait important est à souligner. Dans la plupart des cas, l'actine se retrouve à proximité des membranes, et il a été montré que les filaments d'actine sont souvent attachés aux membranes (12, 30, 62, 63, 71, 105, 108, 135, 160, 161, 166).

La liaison de l'actine aux membranes peut se faire de deux façons:

1) De manière latérale: C'est le cas chez une algue multila-mellaire, Nitella (129) où l'on retrouve un attachement latéral de l'actine aux membranes des chloroplastes. Ce même type de liaison est observé chez une amibe, Dictyostelium discoideum(95), ainsi que dans les cellules sensorielles de l'oreille de poulet(69).

2) De manière perpendiculaire: l'actine est alors attachée aux membranes par une de ses extrémités. Une telle liaison se retrouve dans les spermatozoïdes d'Invertébrés marins tels ceux des oursins de mer (7), la limule Limulus (162) et la moule Nytilus (165) ainsi que dans plusieurs autres types de cellules (150).

Très souvent, on retrouve les deux types d'attachement dans une même cellule. Les exemples les plus connus sont ceux des cellules épithéliales des bordures en brosse de l'intestin (113) et dans les fibroblastes (100).

L'étude détaillée de l'interaction entre l'actine et les membranes cellulaires a permis de découvrir des protéines servant d'intermédiaires dans la liaison actine-membranes (17, 23, 29, 31, 41, 55, 57, 74, 86, 87, 94, 100, 106, 112, 133, 140, 165).

Jusqu'à maintenant plusieurs de ces protéines ont été identifiées. Nous procèderons à la description des protéines qui sont les plus connues:

1) La spectrine qui est un tétramère de 460 Kd fut découverte tout d'abord dans les érythrocytes. Dans les globules rouges, la spectrine n'est pas un intermédiaire direct entre l'actine et les lipides. Comme on peut le voir à la figure 2, la spectrine est liée à une autre protéine: l'ankyrine ou bande 2.1, et le complexe actine-spectrine-ankyrine est lié dans la membrane par une autre protéine, la bande 3. (3, 32, 126, 127, 182).

Par la suite, la spectrine a aussi été identifiée dans d'autres cellules. Burridge et al. (24) ont montré la présence de la spectrine dans les fibroblastes de souris, de poulet, dans la membrane des cellules HeLa et dans les cellules chromaffines de la médullo-surrénale. Levine et Willard (93) l'ont extraite du cerveau de boeuf et de porc. Ils lui ont donné le nom de fodrine mais on reconnaît

maintenant qu'il s'agit d'une spectrine (33, 56, 60, 168).

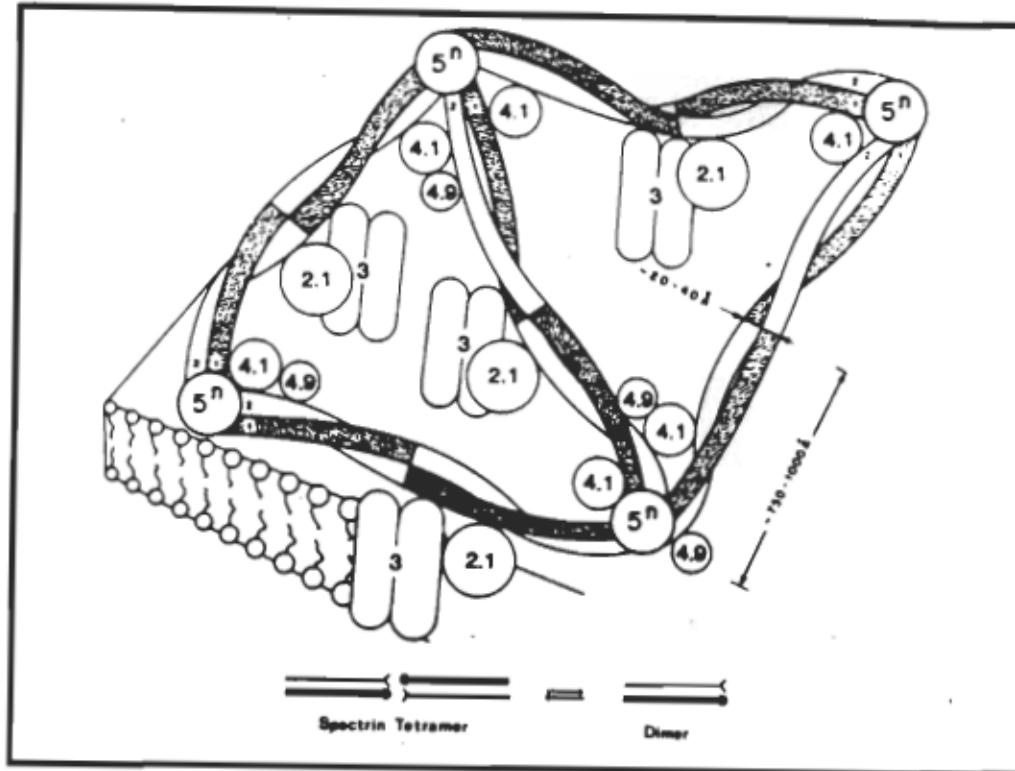


Figure 2: Arrangement du complexe actine-spectrine-ankyrine-glycoprotéine dans le globule rouge.

5ⁿ : actine G

2.1: Ankyrine

3: bande 3

— : spectrine

Palek, J.; Shih, C.L. (127)

2) Le complexe 110 Kd-calmoduline: ce complexe a été trouvé dans les cellules épithéliales des bordures en brosse de l'intestin (20, 34, 58, 70). Le rôle de ce complexe serait de lier latéralement les filaments d'actine aux membranes. Des expériences montrent que le complexe 110 Kd-calmoduline est une protéine périphérique et non intégrale qui serait liée aux lipides par l'intermédiaire d'une ou plusieurs autre(s) protéine(s) qui n'a (ont) pas encore été identifiée(s).

3) L'alpha-actinin: cette protéine a été identifiée pour la première fois dans les lignes Z des myofibrilles musculaires associée à l'eu-actinin (103). Par la suite, elle a aussi été isolée dans les cellules intestinales de poulet par Mooseker et Tilney (113) et Schollmeyer et al. (145). Son rôle dans la liaison de l'actine aux membranes est encore controversée. Certains auteurs affirment que cette protéine est responsable de l'attachement de l'actine aux membranes en autant que ces membranes contiennent des composantes particulières soit du diacylglycérol et/ou de l'acide palmitique (21, 109). D'autres chercheurs comme Burridge et McCullough (22), Small (151) et Mabuchi et al. (96) soutiennent que l'α-actinin ne sert qu'à lier les filaments d'actine parallèlement entre eux pour former des faisceaux et ne joue aucun rôle dans l'attachement de l'actine ou des faisceaux aux membranes.

4) La vinculine: cette protéine de 130 Kd, mise en évidence pour la première fois par Geiger en 1979 (57) dans les fibroblastes, sert aussi d'intermédiaire dans la liaison de l'actine aux membranes (73). Elle possède aussi la propriété de lier les filaments d'actine pour former des faisceaux ou des paracristaux (76). La vinculine peut se retrouver seule (57) ou liée à une autre protéine: la taline (100). Cette association vinculine-taline sert de pont entre l'extrémité d'un faisceau d'actine et les membranes.

5) La protéine de 43 Kd isolée de Torpedo marmorata. Walker et coll. (174) l'ont isolée des récepteurs cholinergiques de Torpedo marmorata. Cette protéine attache, de façon perpendiculaire, l'actine filamenteuse aux membranes qui contiennent des récepteurs. Son rôle n'est pas encore bien défini mais elle contrôlerait la mobilité et la stabilité des récepteurs cholinergiques.

6) D'autres protéines moins bien caractérisées seraient aussi impliquées dans l'attachement de l'actine aux membranes. Dans une récente étude de l'amibe Dictyostelium discoideum, Luna et coll. (95) ont isolé et identifié quatre protéines qui lient l'actine. Ces polypeptides de 180, 130, 86 et 77 Kd sont, selon ces auteurs, des candidats pour une liaison membranaire des filaments d'actine.

Ces protéines joueraient un rôle fondamental en contrôlant l'attachement de l'actine aux membranes et par conséquent contrôlent certains phénomènes biologiques qui sont sous la dépendance de l'attachement de l'actine aux membranes tels la phagocytose, la pinocytose, la mobilité des récepteurs membranaires, etc...

III- Objectif du projet de maîtrise

Les études antérieures concernant les interactions entre l'actine et les membranes naturelles ont montré que les filaments d'actine sont liés dans les membranes par l'intermédiaire de protéines transmembranaires. Aucune étude n'a jusqu'alors suggéré qu'il pourrait exister une interaction directe entre l'actine et les lipides.

Or, des expériences réalisées dans le laboratoire où j'ai fait ma maîtrise tendent à montrer qu'il pourrait exister une interaction directe entre l'actine et les lipides membranaires. Ce phénomène est nouveau et a de nombreuses implications en biologie cellulaire. Comme ces expériences ont été très préliminaires, nous avons donc choisi, vu l'importance du phénomène, de l'étudier plus en détail.

Le but de mon projet de maîtrise est donc de montrer par plusieurs méthodes s'il existe réellement une interaction entre l'actine et les lipides membranaires.

Pour procéder à cette étude, nous avons conçu un modèle expérimental composé de membranes artificielles: les liposomes que nous avons mis en présence d'actine purifiée.

Nous avons opté pour ce modèle pour plusieurs raisons:

- 1) Ce modèle n'implique que des liposomes et de l'actine, ce qui élimine toute autre possibilité d'interaction entre l'actine et d'autres constituants membranaires.
- 2) Nous pouvons aussi varier à volonté la composition des liposomes en lipides.
- 3) De plus, il est possible dans un tel système de contrôler les conditions physicochimiques du milieu comme le pH, la température, la force ionique, etc...

L'utilisation d'un tel système, nous assure donc que les interactions ne peuvent se produire qu'entre l'actine et les lipides et dans des conditions bien déterminées et facilement contrôlables.

Avant de débuter l'analyse des résultats, nous allons décrire les deux composantes de notre modèle. Nous résumerons tout d'abord quelles sont les principales propriétés de l'actine, puis par la suite, ce que sont les liposomes.

IV) L'actine et ses propriétés physicochimiques

L'actine est une protéine que l'on retrouve dans la plupart des cellules eucaryotes. On sait qu'au cours de l'évolution, l'actine a été étonnamment bien conservée. Il y a en effet très peu de différences entre l'actine d'une espèce et celle d'une autre espèce. Les variations peuvent se refléter au niveau du poids moléculaire et surtout du point isoélectrique (171). Par exemple, l'actine extraite de Physarum est plus acide que l'actine du muscle squelettique (172) et celle d'Acanthamoeba est plus acide que n'importe quelle autre actine (61).

Néanmoins, malgré ces variations, l'actine conserve ses principales propriétés quelle que soit son origine.

L'actine existe sous deux formes: la forme monomérique ou globulaire encore appelée actine-G et le polymère qui a une structure filamenteuse, l'actine-F.

1) L'actine globulaire: le monomère d'actine contient en moyenne 375 acides aminés pour un poids moléculaire d'environ 42000. Elle a une forme ovoïde de 3.5 sur 5.5 nm de diamètre. Le monomère possède une charge globale négative (173).

Chaque monomère possède plusieurs sites d'affinités pour les ions, certains de haute affinité et d'autres de faible affinité. On y retrouve aussi un site pour les nucléotides,

l'ATP ou l'ADP.

2) L'actine filamenteuse: un filament d'actine est constitué de deux brins. Chaque brin comprend un grand nombre de monomères juxtaposés et les deux brins se torsadent pour former une double hélice. Le pas de l'hélice est de 37.5 nm et contient 13 monomères chacun distancé de 5.5 nm. Un filament d'actine a un diamètre de 7 nm. (Voir figure 3)

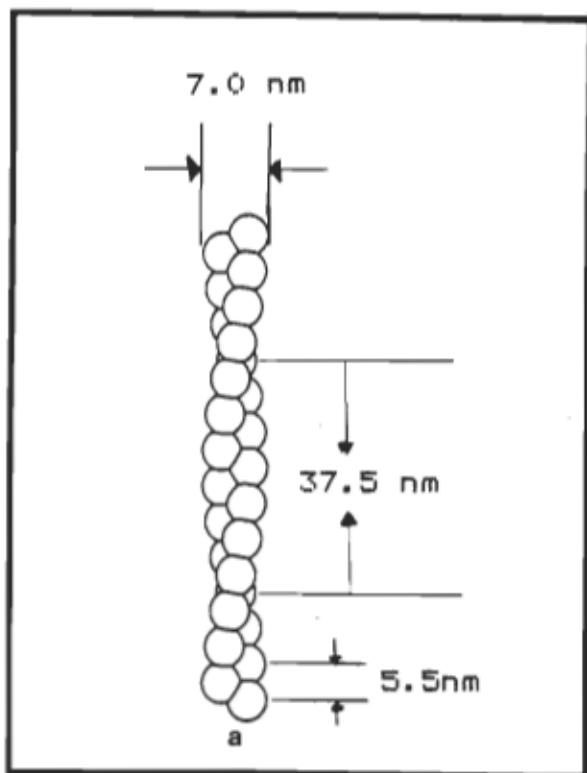


Figure 3: Schéma d'un filament d'actine
De Rosier, D.J.; Tilney, L.G. (45)

A) Polymérisation de l'actine

La polymérisation de l'actine est déclenchée par l'ajout d'ions qui vont se fixer sur les sites de hautes et faibles affinités (4, 102, 156, 157). Les sels les plus couramment utilisés sont le KCl , $MgCl_2$ et le $CaCl_2$ aux concentrations d'une centaine de mM pour le KCl et de l'ordre du mM pour le $MgCl_2$ et le $CaCl_2$.

L'actine globulaire mise en présence de ces cations subit un changement de conformation (52, 142, 143), quoique cette hypothèse soit encore controversée, (6, 68) pour se transformer en "F-monomères" ou "G*-actine". Ces monomères activés ont la propriété de s'assembler pour former un noyau de 3 ou 4 monomères: c'est l'étape de la nucléation. On assiste par la suite à l'addition de "F-monomères" au noyau: c'est le processus d'elongation. L'ajout de "F-monomères" se fait aux deux extrémités du noyau, cependant, une extrémité polymérisée plus rapidement que l'autre (99).

A l'état d'équilibre, les filaments ne demeurent pas dans un état statique, une extrémité du filament continue à polymériser tandis que l'autre extrémité se dépolymérisé à la même vitesse. Ce phénomène appelé "treadmilling" permet un échange entre les monomères d'actine du filament et ceux du milieu (119, 175).

Au cours de la polymérisation, il se produit une hydrolyse de l'ATP liée aux monomères. Cependant cette hydrolyse n'est pas un prérequis pour la polymérisation, car le "F-monomère" sans ATP peut aussi former des filaments (39, 130). Certains auteurs (119, 175) ont établi que les monomères qui composent un filament ont tous un ADP de lié.

Il faut souligner le fait que ce sont toujours des ions positifs qui causent la polymérisation de l'actine. En conséquence, c'est la neutralisation de charges négatives de l'actine qui serait à l'origine de la formation des filaments (142).

B) Paracristallisation

Dans certaines conditions bien particulières, l'actine filamenteuse a la possibilité de s'assembler et de former des structures régulières appelées paracristaux. Jusqu'à maintenant, plusieurs types de paracristaux ont été identifiés et on les regroupe en trois classes distinctes:

i) les paracristaux de Hanson: Hanson en 1967 (65) a montré que l'actine pouvait s'organiser en structures régulières en présence de fortes concentrations d'ions Mg^{2+} , au minimum 25 mM. Ces paracristaux sont produits lorsque les sites cationiques de très faible affinité de l'actine sont comblés (157). On obtient alors des structures paracristallines composées de filaments d'actine, parallèles les uns aux

autres, disposés de manière périodique. La périodicité des paracristaux équivaut à environ 37.5 nm, ce qui correspond au pas de l'hélice du filament.

ii) les paracristaux de Kawamura: Kawamura et Maruyama (80) découvrent que la paracristallisation de l'actine peut se faire dans des conditions tout à fait différentes de celles de Hanson. Il met de l'actine en présence de 0.1-0.2 M de KCl, 0.4 mM d'ATP, au pH de l'actine. Il observe alors trois types de paracristaux d'actine auquel il donne l'appellation de types I, II, III. (Voir figure 4)

Les types I et II consistent en un entrecroisement des filaments d'actine: "type filet". Le type II a une disposition plus lâche et donc une périodicité plus faible que le type I. Le dernier type de paracristaux (type III), a un aspect similaire à ceux obtenus par Hanson.

iii) les microcristaux de Gd³⁺: En mettant de l'actine globulaire en présence d'ions lanthanides tel le gadolinium (Gd³⁺), Dos Remedios et coll. (47) ont fabriqué d'autres types de paracristaux. Dans ce cas, des structures tubulaires et des microcristaux constitués par l'accolement latéral et régulier de monomères d'actine en monocouche sont formés.

Il faut souligner que tous ces types de paracristaux se

forment dans des conditions qui sont loin de celles retrouvées in vivo. Cependant des structures paracrystallines similaires ont aussi été observées lors de l'association de l'actine avec d'autres protéines (21, 45, 76, 149). De telles structures pourraient donc aussi exister dans les cellules, mais leur existence in vivo n'a pas encore été démontrée.

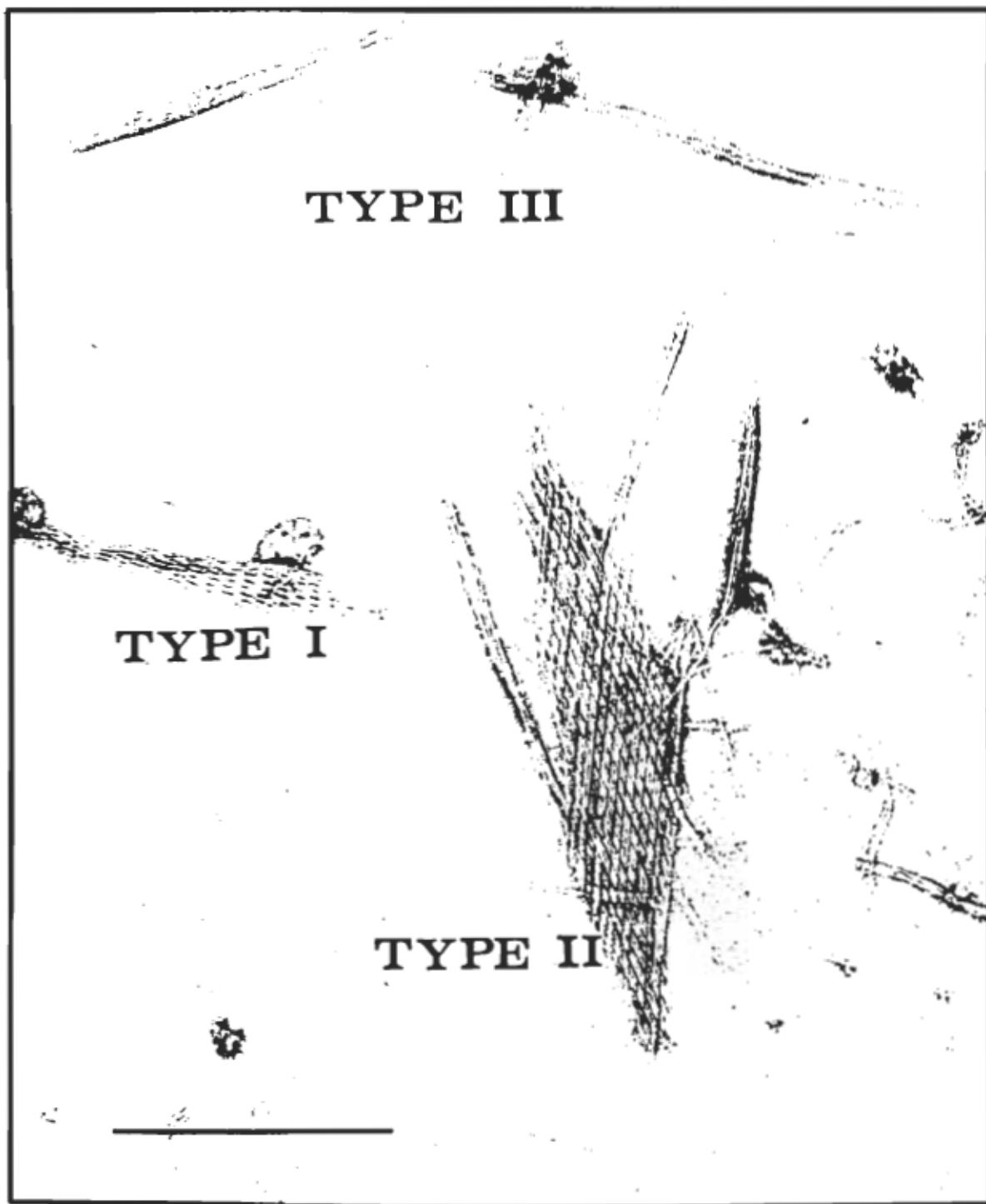


Figure 4: Trois types de paracristaux d'actine-F obtenus par Kawamura et Maruyama (80).

V- Les liposomes

Les membranes naturelles contiennent trois types de molécules: les lipides, les protéines et les glucides. Les lipides sont les constituants essentiels des membranes car ils composent la bicouche à la base de l'architecture membranaire. Les lipides se retrouvent en quantité variable selon le type de cellule.

Les lipides, ces molécules amphiphiles, contiennent une partie hydrophile: "la tête" et une partie hydrophobe "la queue" (178). (Voir figure 5). Lorsque ces molécules sont exposées à un solvant aqueux, elles se disposent de manière à ce que seule la partie hydrophile soit en contact avec le solvant aqueux, la partie hydrophobe se protégeant du solvant.

Il est possible de fabriquer des membranes artificielles composées seulement de lipides. Il en existe trois sortes: les monocouches, les bicouches (BLM) et les liposomes.

1) Les monocouches: comme leur appellation l'indique, ne comprennent qu'une seule couche de lipides dont la face hydrophile est en contact avec un solvant aqueux et la face hydrophobe en contact avec l'air.

2) Les bicouches (BLM): sont formées de deux couches de lipides dont les parties hydrophobes se font face et les

parties hydrophiles entrent en contact avec le solvant aqueux (Voir figure 5).

3) Les liposomes sont des structures vésiculaires composées d'une quantité variable de bicouches lipidiques séparées par des espaces aqueux (Voir figure 6).

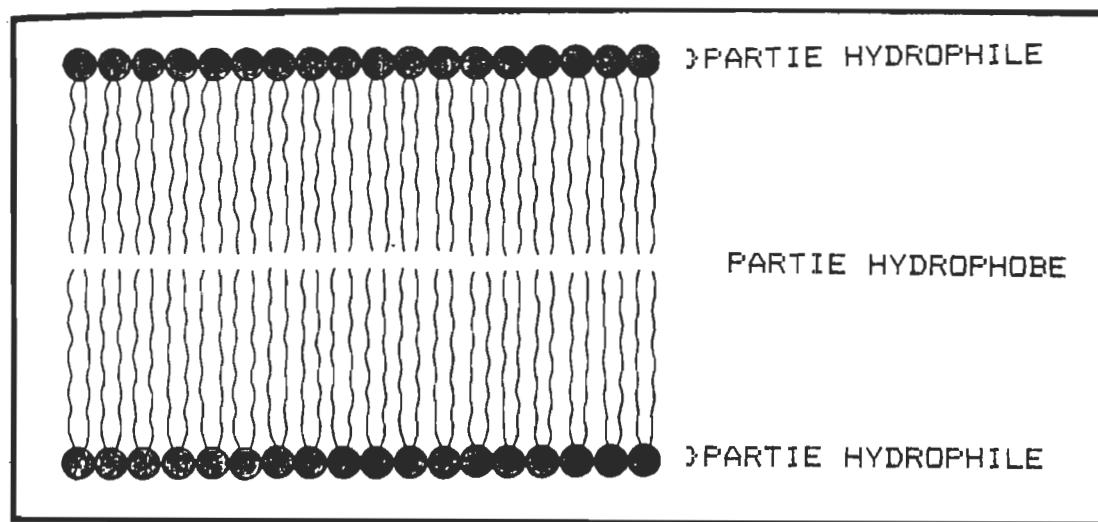


Figure 5: Modèle d'une bicouche lipidique selon Weissmann (178).

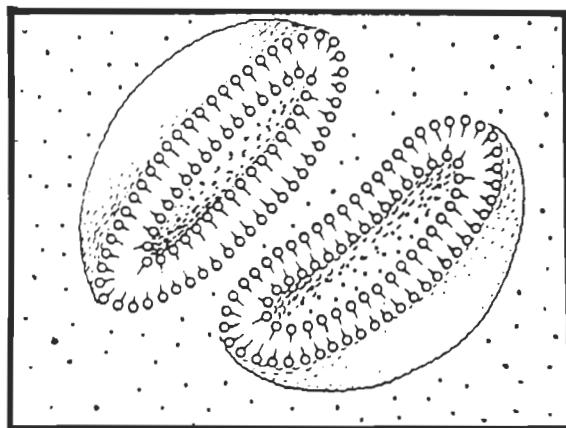


Figure 6: Schéma d'un liposome unilamellaire selon Weissmann (178).

Pour étudier l'interaction entre les lipides et l'actine, nous avons opté pour l'utilisation des liposomes, car le liposome est le modèle qui se rapproche le plus des membranes naturelles. En effet, le liposome est un système fermé, s'entourant de part et d'autre d'une phase aqueuse.

De plus, les techniques de fabrication des liposomes possèdent l'avantage d'être très accessibles et faciles à utiliser. Ils sont "mobiles" contrairement aux B.L.M. qui sont fixés dans l'appareil servant à leur fabrication.

Plusieurs types de liposomes peuvent être fabriqués. On les regroupe en trois catégories: petites vésicules unilamellaires (SUV), (88,104) diamètre variant entre 20 et 50 nm; les vésicules unilamellaires larges (LUV) (98,132) de 220-1000 nm et les vésicules multilamellaires (MLV) (83, 121, 137) de 400-3500 nm de diamètre.

Cette variabilité dans le diamètre des liposomes dépend de plusieurs facteurs: la technique de fabrication, la quantité et la nature des lipides ainsi que la composition ionique du milieu.

Dans ce travail, nous avons mis en évidence l'existence d'une interaction directe entre l'actine et les liposomes sans l'intermédiaire d'une protéine membranaire qui lie l'actine. Pour ce faire, nous avons utilisé principalement quatre techniques:

- la turbidimétrie qui permet de mesurer la formation d'agrégats entre l'actine et les liposomes
- la cosédimentation des mélanges actine-liposomes
- la viscosimétrie à faible taux de cisaillement qui permet de mesurer la formation de gel
- la microscopie électronique qui permet dans certains cas de voir directement les structures formées

MATERIEL ET METHODES

I- Liste des produits chimiques

Stéarylamine (SA) S-6755

Acide oléique (AO) 0-0750

Phosphatidylcholine (PC) P-5763

Ces lipides proviennent de Sigma Chemical Co. (St-Louis, Mo.), ils sont dissous dans du chloroforme et conservés sous azote pendant au maximum 1 mois. Aucun contrôle de pureté n'a été fait sur ces lipides.

Les autres produits sont de grade analytique.

II-Solutions tampons

Trois solutions tampons ont été utilisées:

A) Tampon G: Tampon Tris-HCl pH 8.0 (2mM); CaCl_2 (0.2 mM); β -mercaptoéthanol (0.5 mM); et de l'ATP (0.2 mM). Ce tampon sert à diluer l'actine-G et pour préparer des liposomes qui réagissent avec l'actine-G.

B) Tampon D: Tampon Tris-HCl pH 8.0 (10mM); CaCl_2 (0.1 mM); β -mercaptoéthanol (0.5 mM) et de l'ATP (0.2 mM); KCl (40 mM); MgCl_2 (2 mM). Ce tampon est utilisé pour la préparation des

liposomes mis en contact avec l'actine-F et aussi pour diluer l'actine F.

C) Tampon E: Tampon Tris-HCl pH 8.0 (18 mM); ATP (0.2 mM) β -mercaptoéthanol (0.5 mM); KCl (80 mM) et du MgCl₂ (2 mM). Ce tampon sert à polymériser l'actine-G en actine-F en mélangeant 1 volume d'actine-G dissoute dans le tampon G avec 1 volume de tampon E. On obtient ainsi la composition du tampon D.

III- Préparation des liposomes

Les liposomes sont préparés en utilisant la technique de renversement de phase de Szoka et Papahadjopoulos (158).

Cette technique comporte 2 étapes principales: tout d'abord la formation, par sonication, de micelles inversées constituées de gouttelettes de phase aqueuse entourées de lipides le tout en suspension dans une phase organique. L'étape suivante consiste à faire évaporer lentement la phase organique. Cette étape amène à l'obtention d'un "gel" où les micelles sont si près les unes des autres que la friction entre elles cause la rupture de quelques unes, et par le fait même, la libération de la phase aqueuse de ces micelles brisées. On assistera alors à l'organisation en bicouche des lipides et à la formation de liposomes.

Les lipides (72 μ moles), en solution dans du chloroforme, sont mis dans un ballon rodé de 50 ml et le solvant est évaporé, sous pression réduite, à l'aide d'un rotoévaporateur Büchi modèle R 110. Les lipides sont redissous dans 3 ml d'éther, après quoi on ajoute 1 ml de phase aqueuse, du tampon G ou D selon les cas. Le mélange est soumis aux ultrasons à l'aide d'un appareil Mégason modèle P-300 fonctionnant à intensité moyenne, pendant 5 minutes ou jusqu'à la formation d'une suspension homogène. L'éther est ensuite évaporée à l'aide du rotoévaporateur en respectant les conditions décrites par Szoka et Papahadjopoulos (158). Les liposomes obtenus sont resuspendus selon les expériences dans 2 ml de tampon G ou D. On récolte environ 3 ml de liposomes à la fin de la préparation.

Les liposomes chargés positivement sont composés de 90% PC et 10% SA, les liposomes chargés négativement, 90% PC et 10% AD, et les liposomes neutres, 100% PC; en poids.

IV-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 (155) modifiée par Nonomura et al. (120).

La concentration de l'actine est déterminée par mesure de l'absorbance à 290 nm, $A^{0.1\%}_{290\text{nm}}=0.63$ (91).

L'actine-G est dissoute dans le tampon G. L'actine-F est préparée en mélangeant des volumes égaux d'actine-G et de tampon E, qui induit la polymérisation. L'actine-F est par la suite diluée aux concentrations désirées avec du tampon D.

La préparation de l'actine-F subit quelques modifications selon les conditions expérimentales. Par exemple, dans l'étude de l'influence du Mg^{2+} sur l'interaction actine-liposomes, l'actine-F est obtenue dans des solutions de tampons D et E dans lesquelles on exclut le $MgCl_2$.

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

A.1) Turbidimétrie

L'interaction entre l'actine et les liposomes se produisant presque instantanément, la formation d'agrégats entre l'actine et les liposomes est mesurée quelques minutes après le mélange par turbidimétrie à 550 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Cette longueur d'onde a été choisie en faisant référence aux expériences de Deleers et al (43).

Certains résultats sont exprimés en turbidité différentielle c'est-à-dire en soustrayant de la turbidité du mélange actine-liposomes, la turbidité des liposomes et de l'actine seule. Ces valeurs de turbidité différentielle représentent donc la turbidité qui résulte seulement de

l'interaction entre l'actine et les liposomes.

A.2) Cosédimentation

L'agrégation entre l'actine et les liposomes est aussi mesurée par cosédimentation. La méthode consiste à centrifuger un mélange d'actine et de liposomes à une vitesse qui sédimente les agrégats d'actine et de liposomes, mais peu l'actine et les liposomes seuls. Les composants qui demeurent dans le surnageant sont quantifiés par turbidimétrie à 550 nm.

A.3) Manipulations pour les techniques de turbidimétrie et de cosédimentation

Un volume égal d'actine et de liposomes (3 ml au total) sont déposés dans un tube à centrifugation. On laisse reposer 10 minutes à température ambiante ou autre selon l'expérience tel que précisé dans les résultats. Un ml est prélevé et la turbidité de la solution lue au spectrophotomètre à 550 nm. Le volume restant (2 ml) est centrifugé à 3700 g X 10 minutes à 4°C. Le surnageant est recueilli et sa turbidité mesurée à 550 nm.

B) Mesure de la viscosité à faible taux de cisaillement

La viscosité du mélange actine-liposomes est mesurée à faible taux de cisaillement selon la technique de Pollard (134). Un volume égal d'actine et de liposomes sont mélangés

dans un tube conique. Après avoir brassé le mélange au vortex, ce dernier est immédiatement mis dans un capillaire gradué. Le mélange est laissé 1 heure à température de la pièce. La viscosité du mélange est déterminée en mesurant le temps que met une bille d'acier de 0.16 mm de diamètre pour descendre dans le capillaire. Plus la substance est visqueuse, plus la bille prend du temps à descendre.

C) Microscopie électronique

Une goutte du mélange actine-liposomes est déposée sur une grille recouverte de formvar-carbone. Le surplus du mélange est enlevé 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 Phillips 201 fonctionnant à 80 Kv.

RESULTATS

I-Mise en évidence d'une interaction entre les liposomes et l'actine-F

Lorsque l'on mélange de l'actine-F avec des liposomes chargés positivement, en l'espace de quelques secondes, la solution change d'aspect. Dans le tube apparaît un précipité "floconneux" (fig. 7A).

Par contre, ce phénomène ne se produit pas quand on mélange de l'actine avec des liposomes chargés négativement (fig. 7C) ou avec des liposomes neutres (fig. 7E).

Cette expérience montre donc, qu'il se produit une interaction entre l'actine et les liposomes chargés positivement.

Nous pouvons quantifier l'intensité du phénomène en mesurant la turbidité de la solution. Ces résultats sont illustrés à la figure 8. Ce graphique représente les pourcentages de turbidité de mélanges actine-liposomes comparativement aux témoins de liposomes seuls. Une forte hausse de la turbidité se produit lorsque l'actine est mise en présence de liposomes chargés positivement (fig. 8A).

Aucune augmentation de turbidité n'est enregistrée pour les mélanges d'actine avec des liposomes chargés négativement (fig. 8B) ou neutres (fig. 8C).

Examen des préparations des mélanges actine-liposomes au microscope électronique

L'examen du précipité obtenu en mélangeant de l'actine avec des liposomes chargés positivement montre que ce précipité est formé d'agrégats de liposomes et de filaments d'actine (fig. 9). A plus fort grossissement, on peut voir que les liposomes sont maintenus ensemble par des filaments d'actine (fig. 11). Sous la contrainte imposée par ces filaments d'actine, les liposomes sont déformés et prennent une forme allongée.

De tels amas ne s'observent pas dans un mélange d'actine avec des liposomes chargés négativement ou neutres (fig. 10). Dans ce cas, les liposomes et l'actine se côtoient mais rien n'indique une interaction quelconque. L'actine s'y retrouve dispersée et les liposomes qui sont à proximité ont une forme généralement sphérique et ne semblent nullement influencés par la présence d'actine.

En conséquence, les agrégats qui se forment entre l'actine et les liposomes chargés positivement ne sont pas dus à un artefact de suspension, mais résultent bien d'une

interaction entre l'actine et les liposomes.

A fort grossissement, on observe que l'actine ne se dispose pas au hasard sur les liposomes mais plutôt en structures régulières très caractéristiques. On note que trois types de structures cristallines peuvent se former:

1) les filaments se juxtaposent les uns parallèlement aux autres. Il se forme alors une couche d'actine avec des striations transversales ayant une périodicité longitudinale d'environ 37.5 nm. Cette structure est semblable aux paracristaux qu'ont obtenus Hanson(65) et Smith et al. (152) par un excès de Mg^{2+} (voir fig. 12).

2) les filaments peuvent s'entrecroiser pour former une structure en "filet". Ces structures ressemblent aux paracristaux de type II de Kawamura (fig. 13).

3) Quelques fois, l'actine s'arrange de façon moins bien ordonnée. Il ne s'agit toutefois pas d'une disposition au hasard car on observe souvent une certaine régularité (fig. 14).

Souvent, ces trois types d'organisation de l'actine peuvent coexister dans une même préparation. Sur la figure 15, on voit deux types de structures paracrystallines formées par les mêmes filaments d'actine mais sur différents liposomes. Nous n'avons pas pu déterminer les conditions expérimentales qui nous permettraient de ne former qu'un seul

type de structure cristalline.

En résumé, la précipitation d'un mélange d'actine et de liposomes chargés positivement résulte d'une agrégation des liposomes par l'actine, ce qui provoque, par le fait même, la hausse de turbidité.

Ces agrégats sont formés en raison de l'attraction de l'actine et des liposomes chargés positivement car l'actine possède une charge globale négative. Cependant, le phénomène observé est plus complexe qu'une simple attraction électrostatique entre l'actine et les liposomes, car il se forme des structures paracristallines, phénomène qui implique une réorganisation de l'actine au niveau moléculaire. Nous aborderons ce point au cours de la discussion.

Maintenant que nous avons montré que l'actine intéragit avec les liposomes chargés positivement, nous allons amorcer une étude de certains facteurs physicochimiques qui peuvent influencer cette interaction.

Figure 7. Effet de l'actine-F sur les liposomes.

Mélange d'actine-F et de liposomes chargés positivement (fig. 7A), liposomes chargés négativement (fig. 7C), et liposomes neutres (fig. 7E). Témoins: liposomes chargés positivement (fig. 7B), négativement (fig. 7D) et neutres (fig. 7F).

Concentration d'actine-F, 0.1 mg/ml

Concentration de lipides 1mM

liposomes chargés positivement: (90%PC+10%SA)

liposomes chargés négativement: (90%PC+10%AO)

liposomes neutres: (100%PC)

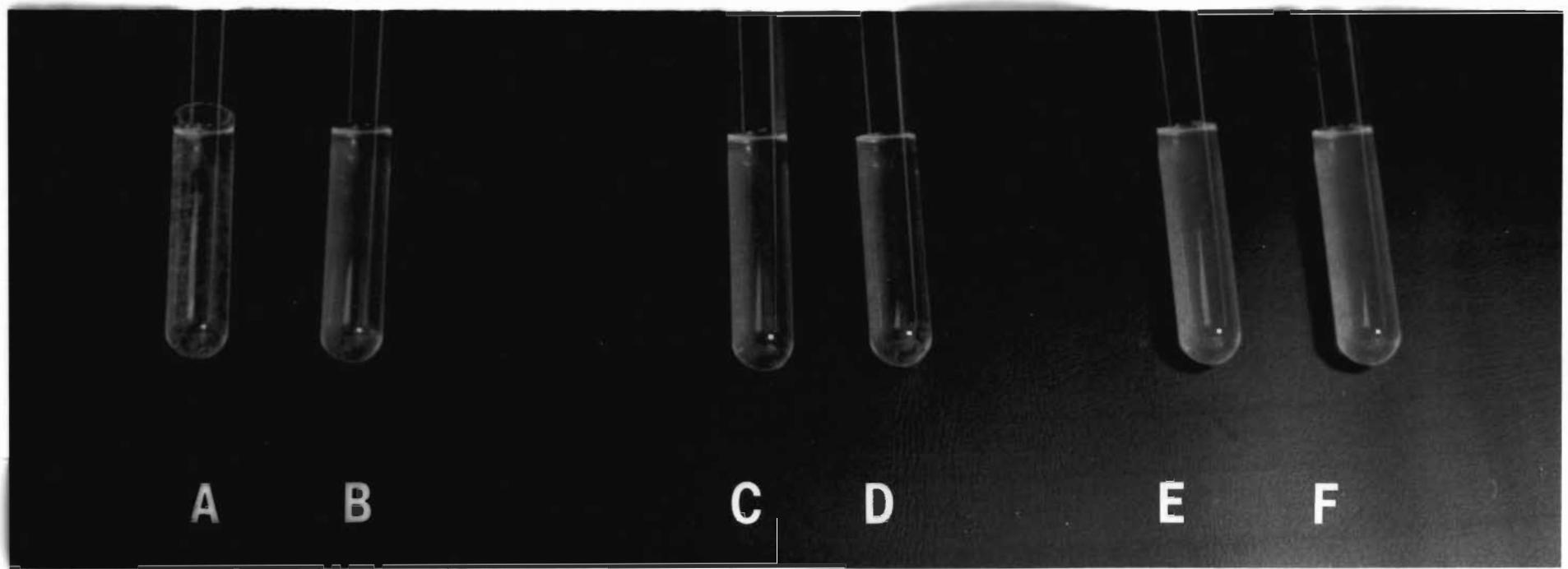


Figure 8. Changement de la turbidité à 550 nm d'une solution de liposomes avant — et après - - - ajout d'actine-F. Liposomes chargés positivement (fig. 8A), négativement (fig. 8B), et neutres (fig. 8C).

Concentration de lipides 1mM

Concentration d'actine-F 0.3 mg/ml

liposomes chargés positivement: (90%PC+10%SA)

liposomes chargés négativement: (90%PC+10%AD)

liposomes neutres: (100%PC)

Influence de la charge du liposome sur l'interaction actine-liposomes

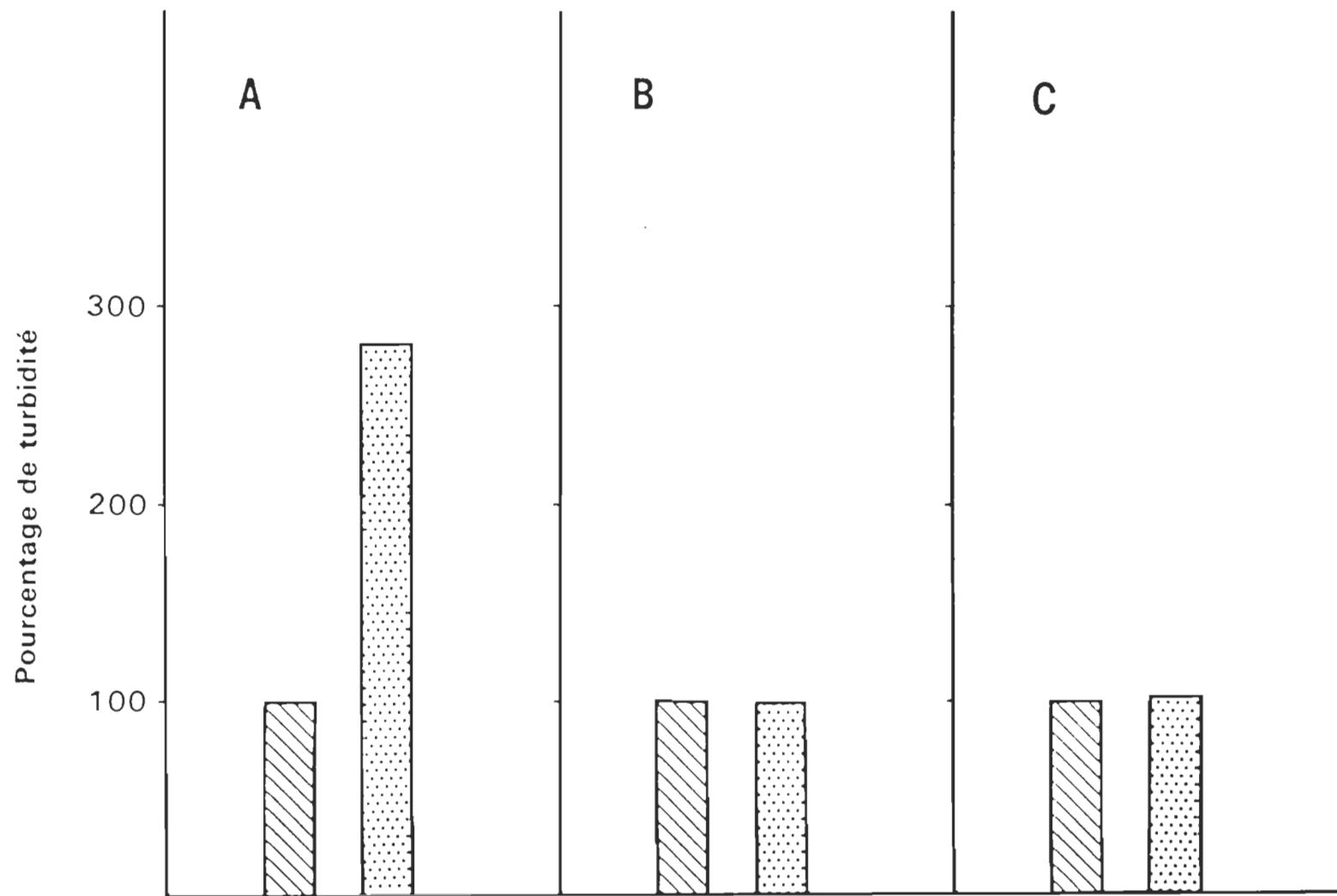


Figure 9. Vue au microscope électronique d'agrégats obtenus en mélangeant des liposomes chargés positivement et de l'actine-F. Les agrégats de liposomes ont des formes et tailles variables. Les liposomes sont fortement allongés par les filaments d'actine.
Coloration à l'acétate d'uranyl 1%
Grossissement: 15000X

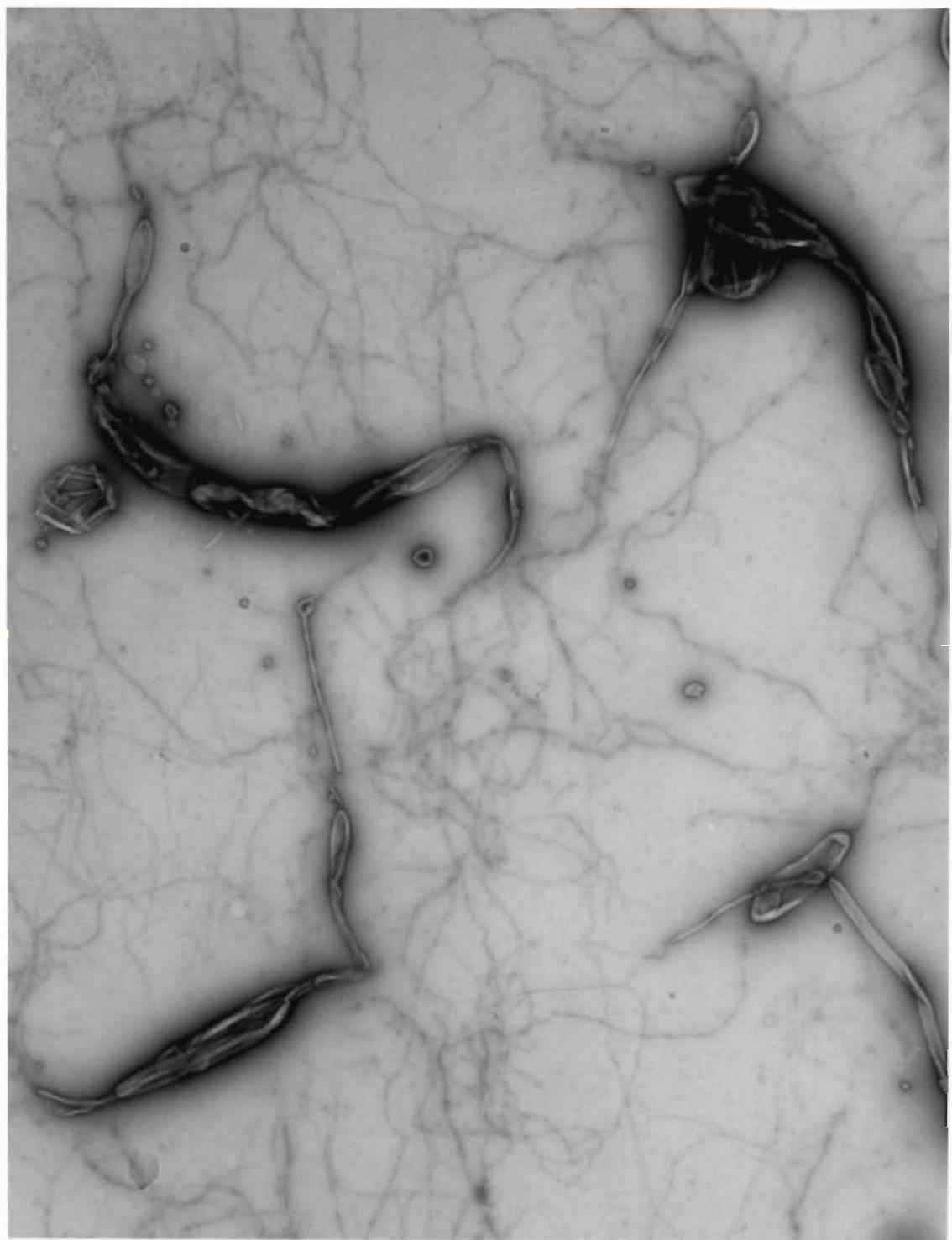


Figure 10. Vue au microscope électronique d'un mélange de liposomes neutres et d'actine-F.

Les liposomes neutres gardent leur forme sphérique et les filaments d'actine sont libres dans le milieu. Aucune interaction ne se produit entre l'actine et les liposomes.

Coloration à l'acétate d'uranyl 1%

Grossissement: 63000X

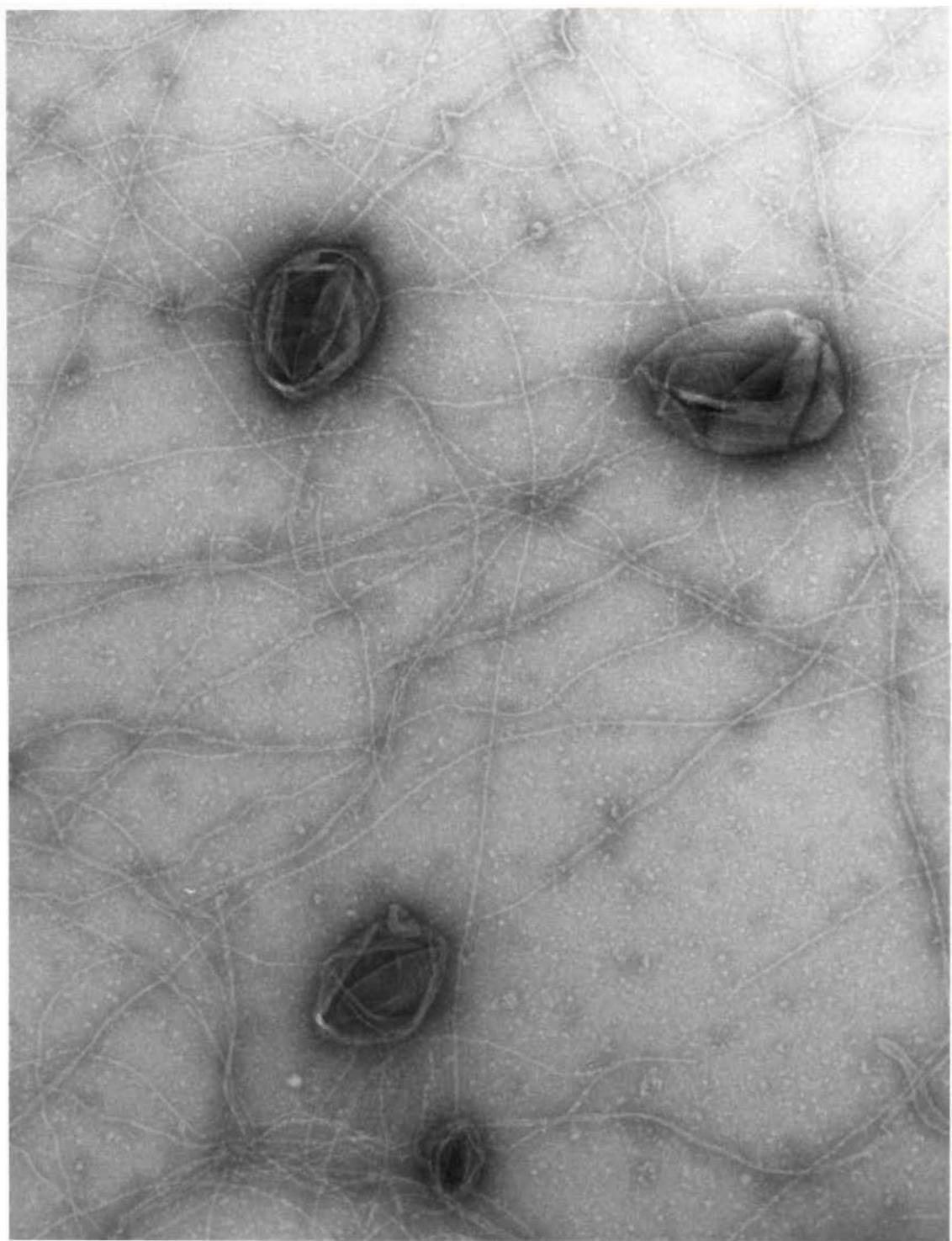


Figure 11. Amas de liposomes chargés positivement et d'actine-F. L'actine-F se dispose de façon régulière à la surface du liposome. On peut voir la disposition parallèle et entrecroisée des filaments. Sous la contrainte de l'actine-F, les liposomes prennent une forme allongée.
Coloration à l'acétate d'uranyl 1%
Grossissement: 29000X



Figure 12. Interaction actine-F-liposomes chargés positivement. A la surface du liposome, les filaments se disposent les uns parallèles aux autres et forment des paracristaux avec une périodicité d'environ 37.5 nm. A l'extérieur du liposome, les filaments s'orientent au hasard.

Coloration à l'acétate d'uranyl 1%

Grossissement: 124000X



Figure 13. Arrangement en "filet" de l'actine-F sur un liposome chargé positivement. Les filaments s'entrecroisent de manière régulière, et en dehors du liposome, les filaments sont désordonnés. Le liposome prend une forme allongée.
Coloration à l'acétate d'uranyl 1%
Grossissement: 92000X



Figure 14. Disposition plus ou moins irrégulière des filaments à la surface d'un liposome chargé positivement. On peut apercevoir pour certains filaments une périodicité qui n'est pas constante et n'apparaît pas sur toute la surface du liposome.

Coloration à l'acétate d'uranyl 1%

Grossissement: 92000X



Figure 15. Disposition dans une même préparation de filaments parallèles et entrecroisés à la surface des liposomes chargés positivement. Les mêmes filaments d'actine peuvent former des structures différentes sur deux liposomes. Coloration à l'acétate d'uranyl 1% Grossissement: 85000X



II-Etude des facteurs physicochimiques qui influencent l'interaction entre l'actine et les liposomes

A) Influence du pourcentage de stéarylamine dans les liposomes sur l'interaction actine-liposomes

i) avec l'actine-G

La figure 16A montre les valeurs de turbidité de mélanges composés d'actine-G et de liposomes chargés positivement et contenant des quantités croissantes de SA.

Pour de faibles concentrations d'actine c'est-à-dire entre 0.1 et 0.3 mg/ml, la turbidité augmente avec le pourcentage de SA constituant les liposomes, puis elle se stabilise pour des quantités de SA supérieures à 5%.

Cependant, pour de fortes concentrations d'actine c'est-à-dire supérieures à 0.5 mg/ml, le phénomène est différent. Tout d'abord, la turbidité du mélange actine-liposomes augmente avec le pourcentage de SA incorporée dans les liposomes, pour atteindre un plateau et finalement diminuer.

ii) avec l'actine-F

Les valeurs de turbidité des mélanges actine-F-liposomes chargés positivement constitués d'un pourcentage croissant de SA sont représentées à la figure 16B.

La turbidité des mélanges croit en fonction du pourcentage de SA composant les liposomes. On atteint un quasi plateau à partir d'un pourcentage d'environ 5% de SA. Les courbes ont le même aspect quelle que soit la concentration d'actine-F en solution. Il faut noter que les valeurs de turbidité sont semblables pour des concentrations d'actine situées entre 0.3 et 1.0 mg/ml.

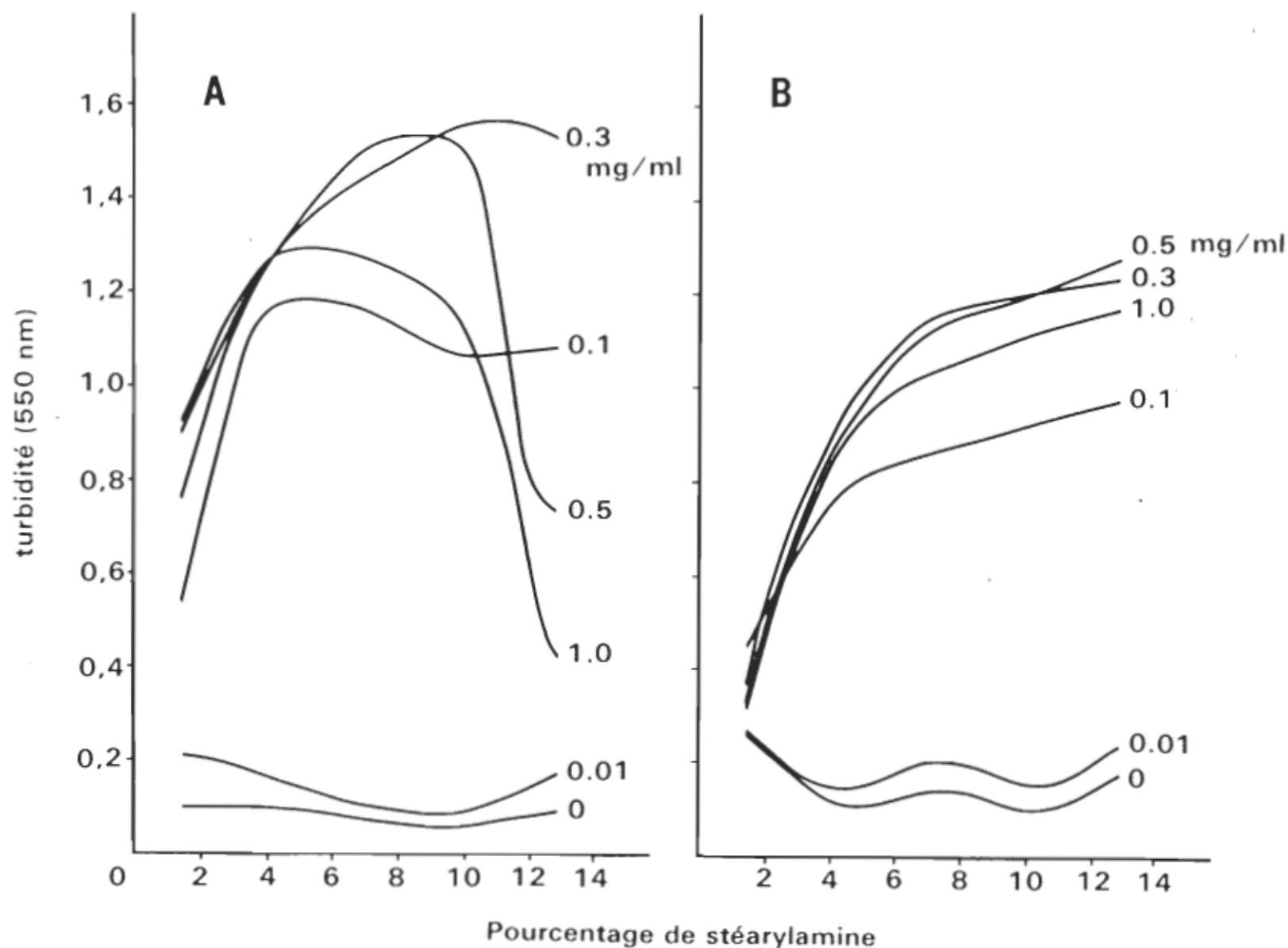
Ces expériences nous montrent que l'intensité d'agrégation entre l'actine et les liposomes chargés positivement varie en fonction de la concentration d'actine et du pourcentage de SA contenue dans les liposomes. La turbidité maximale est obtenue pour un mélange de 0.3 mg/ml d'actine G ou F et de liposomes contenant 10 % de SA. Pour les expériences suivantes, nous utiliserons donc ces valeurs.

Figure 16. Variation de turbidité à 550 nm de mélanges d'actine, à différentes concentrations, et de liposomes constitués d'un pourcentage croissant de stéarylamine.

Figure A: Mélange actine-G-liposomes

Figure B: Mélange actine-F-liposomes

Influence du pourcentage de stéarylamine et de la concentration d'actine sur l'interaction actine- liposomes



B) Influence de la concentration de liposomes sur l'interaction actine-liposomes

La figure 17 montre la turbidité avant et après séparation obtenue d'un mélange d'actine et de liposomes chargés positivement pour des concentrations croissantes de liposomes. Tout d'abord, la turbidité des mélanges actine-liposomes est mesurée quelques minutes après addition de l'actine aux liposomes, puis ceux-ci sont centrifugés, afin de séparer les gros agrégats et la turbidité est mesurée à nouveau dans le surnageant.

i) avec l'actine-G

Lorsque de l'actine-G est mélangée avec des liposomes chargés positivement, la turbidité augmente en fonction de la quantité de liposomes dans la solution (fig. 17A), ce qui signifie que les agrégats formés sont plus gros et/ou plus nombreux à mesure que l'on ajoute des liposomes. Les expériences de coséparation montrent une légère hausse de turbidité dans le surnageant suivie immédiatement d'une baisse jusqu'à une concentration de lipides de 1mM. Cette diminution est due à la formation de plus gros agrégats d'actine et de liposomes qui séparent. Pour des concentrations supérieures à 1 mM de lipides, la turbidité du surnageant après séparation augmente graduellement en fonction de la concentration de liposomes. Cette hausse n'est pas due à la présence de liposomes non liés à l'actine mais plutôt à la

formation d'agrégats plus petits et plus difficilement sédimentables.

ii) avec l'actine-F

Des résultats similaires sont obtenus pour des mélanges d'actine-F et de liposomes chargés positivement (fig. 17B).

Ces expériences nous montrent qu'à une concentration de 1 mM de lipides, il se produit la plus forte agrégation des liposomes aussi bien par l'actine-G que F. Ainsi pour les expériences futures, nous utiliserons cette concentration de lipides.

Les résultats préliminaires nous ont montré qu'il se produit une interaction entre l'actine et les liposomes chargés positivement, et que cette interaction est probablement de nature électrostatique. De cette conclusion, on peut présumer que la variation de certains facteurs physicochimiques comme la force ionique du milieu, le pH, la température peuvent modifier cette interaction actine-liposomes. Ces facteurs physicochimiques peuvent influencer l'interaction actine-liposomes de deux façons:

1) en agissant directement sur l'interaction c'est-à-dire en s'interposant entre l'actine et les liposomes.

2) de façon indirecte, en modifiant l'un ou l'autre ou même les deux composants du milieu: l'actine et les liposomes.

Nous avons donc choisi d'étudier l'influence de certains facteurs sur l'interaction actine-liposomes en particulier, la concentration d'actine, KCl , $MgCl_2$, $CaCl_2$, ATP, le pH, et la température.

Bien que nous avons démontré que seuls les liposomes chargés positivement peuvent réagir avec l'actine, nous continuerons à étudier l'influence des facteurs physicochimiques sur les systèmes faits d'actine et de liposomes chargés négativement ou neutres, car il se pourrait qu'il se produise une interaction entre ces liposomes et l'actine dans d'autres conditions expérimentales.

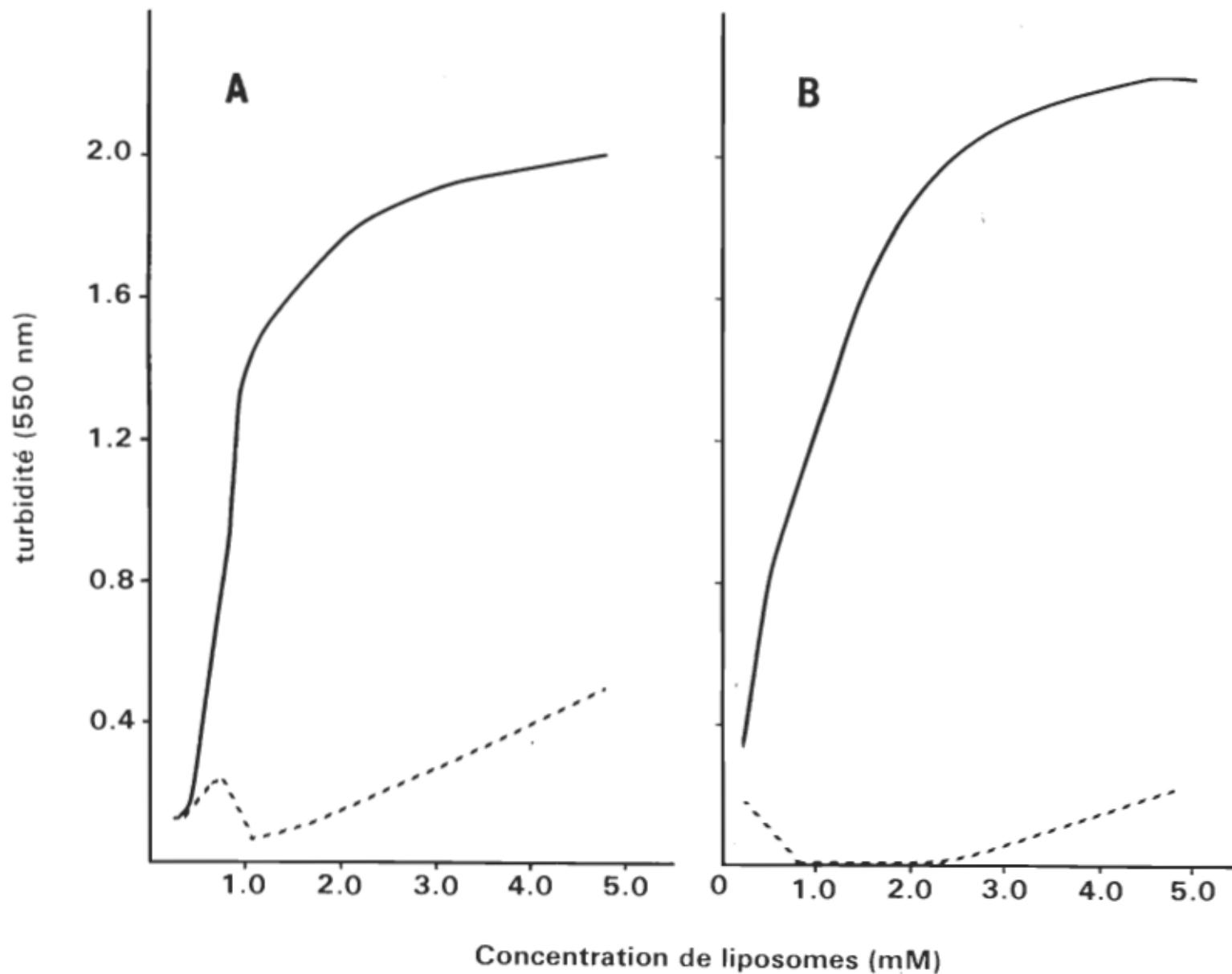
Figure 17. Turbidité des mélanges d'actine-liposomes
en fonction de la concentration de liposomes chargés positivement avant— et
après---sédimentation à 3700 g X 10 minutes.

Figure A: Mélange actine-G-liposomes

Figure B: Mélange actine-F-liposomes

Concentration d'actine 0.3 mg/ml

Influence de la concentration de liposomes sur l'interaction actine-liposomes



C) Mise en évidence de l'interaction actine-liposomes par viscosimétrie à faible taux de cisaillement

La figure 18 montre les mesures de viscosité des mélanges actine-liposomes en fonction de la concentration de liposomes.

Pour un mélange d'actine-F 1.0 mg/ml et de liposomes chargés positivement, la viscosité change en fonction de la concentration de liposomes. A une concentration d'environ 1 mM de lipides, là où la viscosité est la plus élevée, il y a formation d'un gel composé de filaments d'actine "pontés" par des liposomes. Pour des concentrations plus faibles de liposomes, la viscosité du mélange est plus faible car il y a diminution des points de pontage entre les filaments d'actine. Pour des concentrations plus fortes de liposomes, il y a aussi une baisse de la viscosité du mélange actine-liposomes car il se forme des agrégats qui précipitent.

Dans le cas des mélanges actine-F-liposomes chargés négativement ou neutres, aucune variation de viscosité ne se produit quelque soit la concentration de liposomes.

Cette expérience confirme donc qu'il y a une interaction entre l'actine et les liposomes chargés positivement mais qu'il ne se produit aucun phénomène semblable avec les liposomes chargés négativement ou neutres.

Figure 18. Viscosité à faible taux de cisaillement de
mélanges d'actine-F et de liposomes en
fonction de la concentration de lipides.

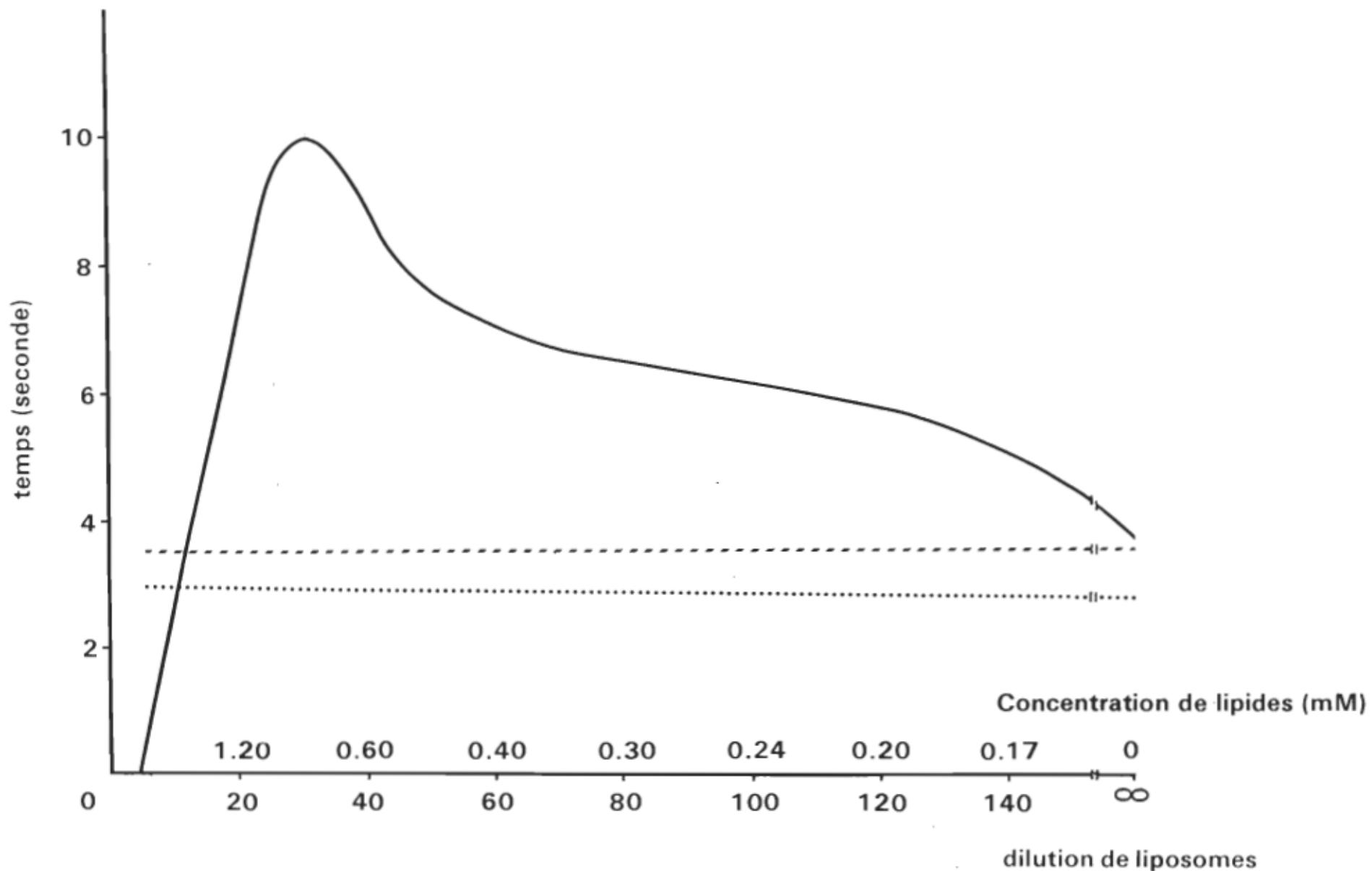
— liposomes chargés positivement (90%PC+10%SA)

..... liposomes chargés négativement (90%PC+10%AO)

--- liposomes neutres (100%PC)

Concentration d'actine-F, 1.0 mg/ml

Viscosité à faible taux de cisaillement en fonction de la dilution de liposomes



D) Influence de la concentration d'actine sur l'interaction actine-liposomes

i) avec l'actine-G

La figure 19 représente les turbidités avant et après séparation à 3700g X 10 minutes, de solutions de liposomes mis en présence de concentrations croissantes d'actine-G. La turbidité après séparation est mesurée dans le surnageant des solutions.

Sur la figure 19A, nous avons les résultats des turbidités pour des mélanges actine-G-liposomes chargés positivement. La turbidité avant séparation augmente pour des concentrations variant entre 0 et 0.1 mg/ml d'actine-G. Pour des concentrations supérieures à 0.1 mg/ml, la turbidité diminue légèrement.

La hausse de turbidité s'explique par la formation d'agrégats de liposomes et d'actine de plus en plus gros. Comme l'actine possède plusieurs sites chargés négativement, elle peut lier plusieurs liposomes, et les liposomes ayant aussi de nombreuses charges positives peuvent réagir avec plus d'une molécule d'actine. Il en résulte donc une agrégation des liposomes et de l'actine-G.

Cependant, pour de fortes concentrations d'actine il se produit un phénomène de saturation, puis d'inhibition. En

effet, lorsque tous les sites positifs des liposomes sont saturés par des monomères d'actine, il ne peut plus s'établir de liens entre un monomère d'actine et plusieurs liposomes, réduisant ainsi la formation d'agrégats.

Ces résultats sont confirmés par les expériences de cosédimentation. Pour de faibles concentrations d'actine, entre 0 et 0.1 mg/ml, il se forme de gros agrégats qui sédimentent et la turbidité du surnageant diminue. Aux plus fortes concentrations, la turbidité du surnageant augmente pour atteindre un plateau, ce qui signifie qu'il se forme moins d'agrégats.

Les mêmes expériences effectuées avec des liposomes chargés négativement (fig. 19B) et neutres (fig. 19C) montrent qu'il n'y a aucune interaction entre l'actine et ces liposomes puisque les valeurs de turbidité restent constantes

Un détail est à remarquer. Les valeurs de turbidité avant et après sédimentation d'un mélange d'actine et de liposomes chargés négativement sont presque semblables. Par contre, il y a une grande différence entre les valeurs de turbidité avant et après sédimentation pour les solutions d'actine et de liposomes neutres. Ce phénomène s'explique par le fait que les liposomes neutres sont plus gros que les liposomes chargés négativement et par conséquent sédimentent

en partie à 3700g X 10 minutes.

Les photographies (fig. 20) prises au microscope électronique d'un mélange de liposomes chargés positivement et d'actine-G 0.1 mg/ml montrent de gros amas de liposomes. Il ne nous est pas possible de voir l'actine car les monomères d'actine-G ne sont pas visibles au microscope électronique. Il faut noter néanmoins que les liposomes conservent en général leur forme sphérique.

ii) avec l'actine-F

La figure 21 illustre l'effet de la concentration d'actine-F sur l'interaction actine-liposomes.

Les résultats sont similaires à ceux obtenus avec les mélanges actine-G-liposomes. La turbidité d'un mélange actine-liposomes chargés positivement augmente en fonction de la concentration d'actine-F. A partir de 0.2 mg/ml d'actine elle se stabilise. Cette hausse de turbidité s'explique par la formation d'agrégats de liposomes et d'actine de plus en plus gros. Le plateau indique qu'il se produit une saturation.

La turbidité mesurée dans le surnageant après centrifugation des mélanges actine-liposomes diminue jusqu'à une concentration de 0.2 mg/ml d'actine, puis elle augmente avec la concentration d'actine. C'est à la valeur minimale de

turbidité du surnageant après centrifugation que les plus gros agrégats se forment.

La turbidité des mélanges actine-F-liposomes chargés négativement (fig. 21B) ou neutres (fig. 21C) reste à peu près constante en fonction de la concentration d'actine. Par contre, la turbidité mesurée dans le surnageant après séédimentation augmente en fonction de la concentration d'actine. On peut expliquer ce résultat par l'augmentation de la densité et de la viscosité du milieu due à l'ajout toujours en plus grande quantité d'actine-F. Ces hausses de densité et viscosité empêchent les liposomes de sédimentier. Ils restent en suspension dans le surnageant ce qui en augmente la turbidité. Le phénomène est plus prononcé pour les liposomes neutres, car ceux-ci sont plus gros, et sédimentent moins en présence d'actine contrairement aux liposomes chargés négativement, qui sont plus petits.

En microscopie électronique, on aperçoit sur la figure 9 la formation d'amas de liposomes et d'actine. Les liposomes ont tendance à se disposer en chaînette, les uns à la suite des autres. Souvent, ils prennent une forme allongée, imposée par l'actine-F.

De ces expériences, nous pouvons conclure que seuls les liposomes chargés positivement interagissent avec l'actine G

ou F, dans les conditions expérimentales utilisées. L'intensité maximale d'agrégation entre l'actine et les liposomes se produit entre 0.1 et 0.3 mg/ml d'actine. Au-delà de ces concentrations, les sites positifs des liposomes sont tous saturés par l'actine ce qui empêche la formation d'amas et il y a saturation du phénomène.

Figure 19. Turbidité d'un mélange actine-G-liposomes en fonction de la concentration d'actine avant — et après---sédimentation à 3700 g X 10 minutes.

Figure A: Mélange actine-G-liposomes chargés positivement (90%PC+10%SA)

Figure B: Mélange actine-G-liposomes chargés négativement (90%PC+10%AO)

Figure C: Mélange actine-G-liposomes neutres (100%PC)

Concentration de lipides 1 mM

Influence de la concentration d'actine sur l'interaction actine-liposomes

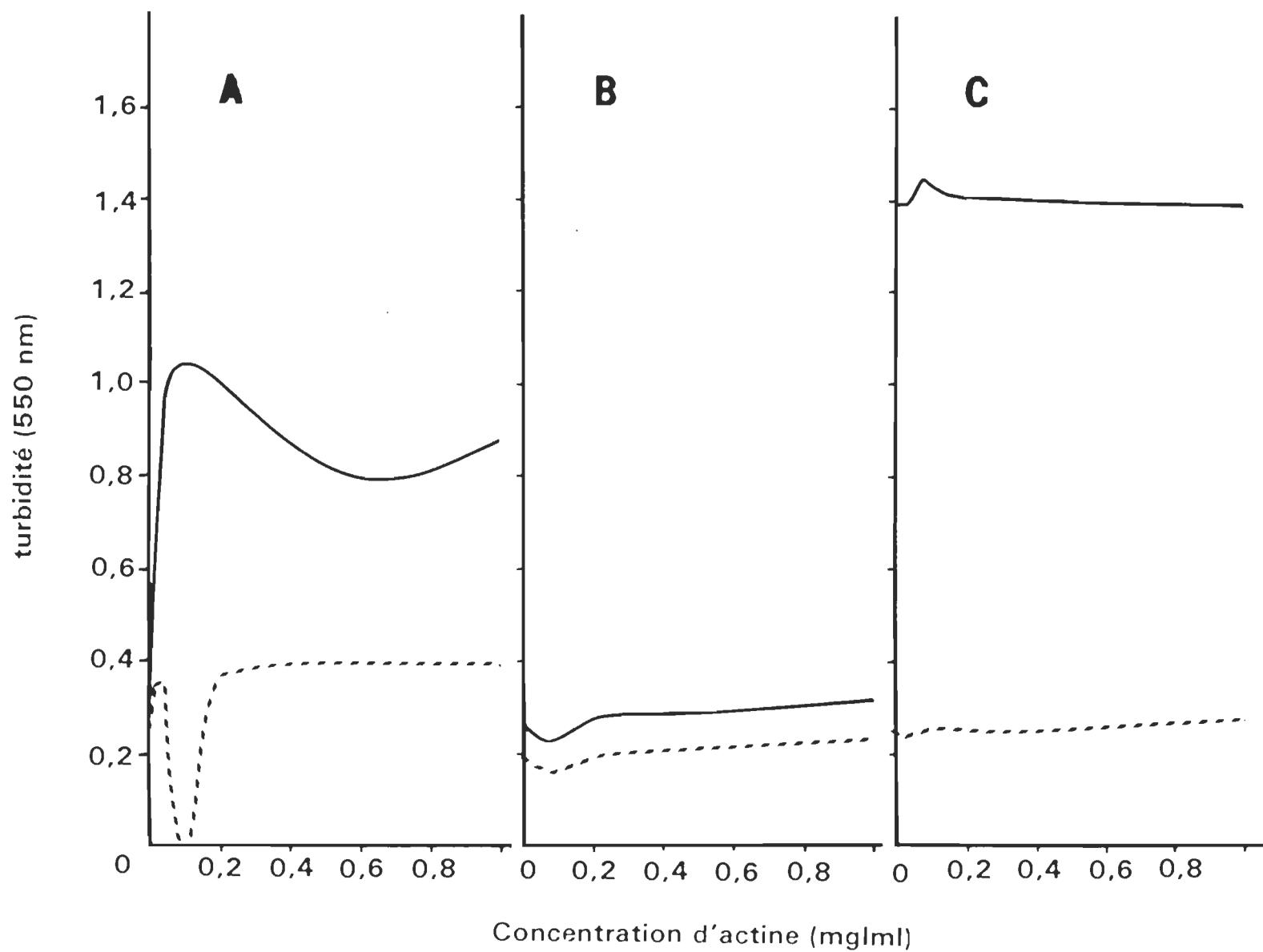


Figure 20: Agrégats de liposomes chargés positivement par l'actine-G. Les liposomes forment des agrégats mais conservent leur forme sphérique.
Coloration à l'acétate d'uranyl 1%
Grossissement: 32000X

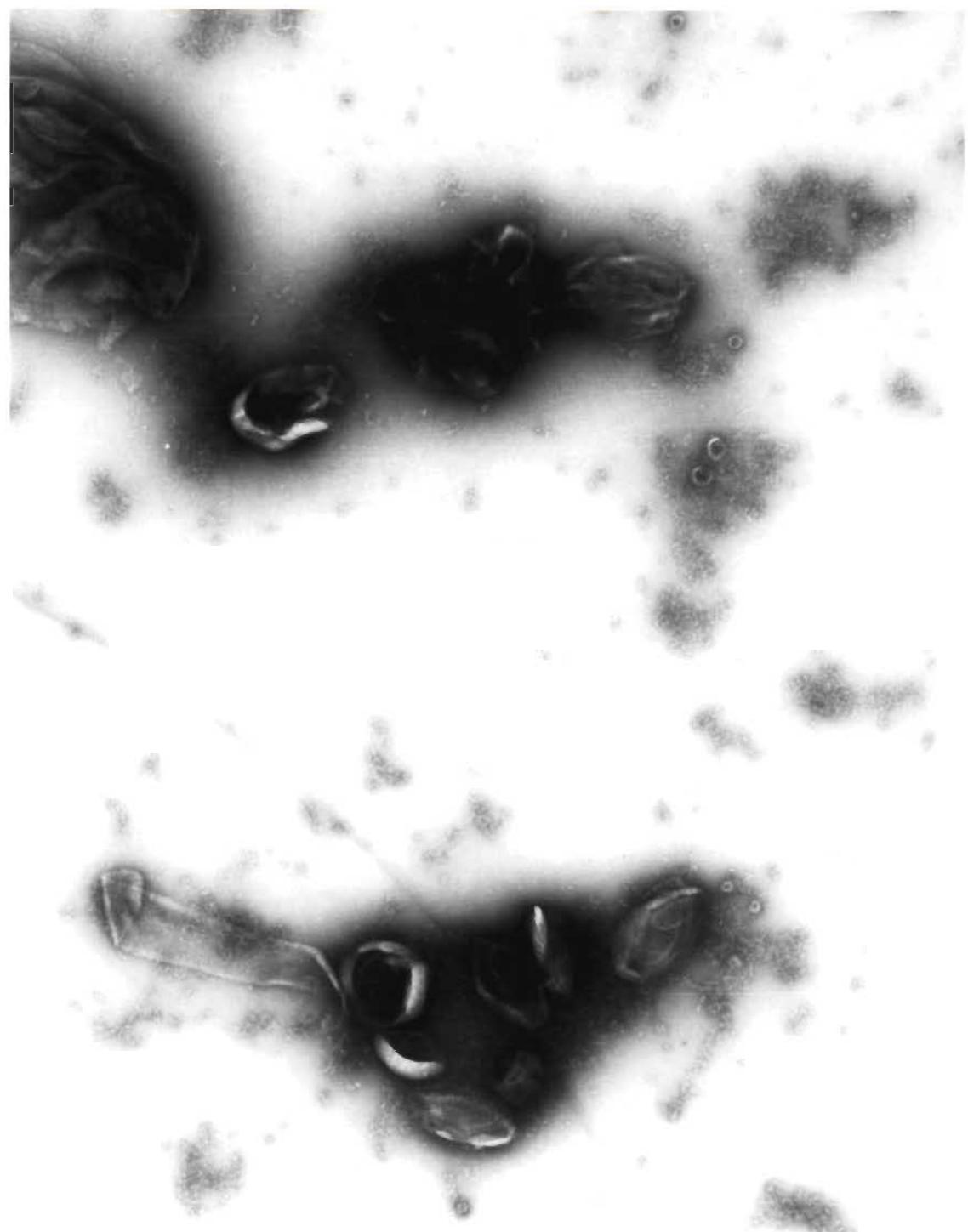


Figure 21. Turbidité du mélange actine-F-liposomes
en fonction de la concentration d'actine
avant— et après---sédimentation à
3700 g X 10 minutes.

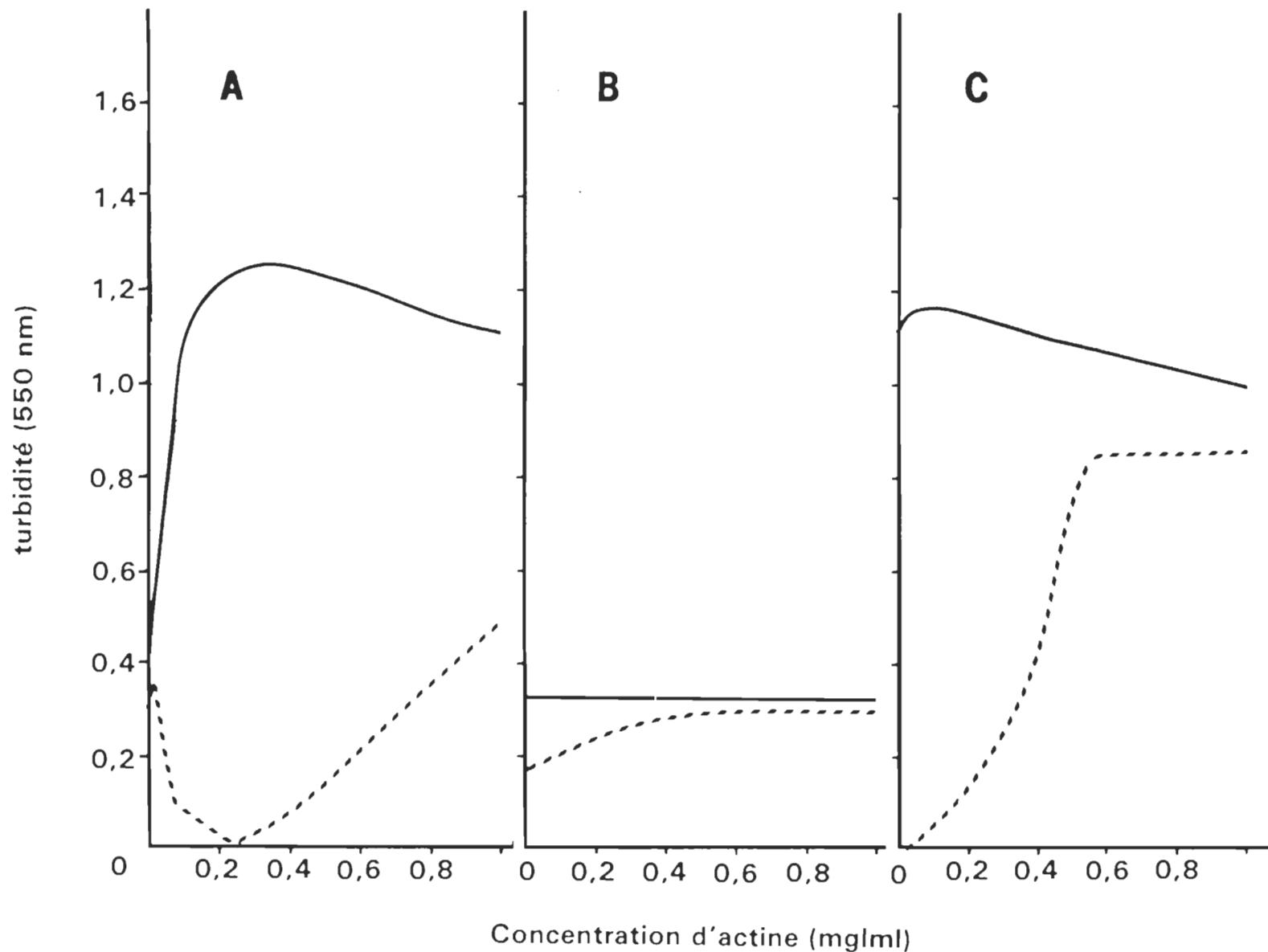
Figure A: Mélange actine-F-liposomes
chargés positivement (90%PC+10%SA)

Figure B: Mélange actine-F-liposomes
chargés négativement (90%PC+10%AO)

Figure C: Mélange actine-F-liposomes
neutres (100%PC)

Concentration de lipides 1 mM

Influence de la concentration d'actine sur l'interaction actine-liposomes



E) Influence des ions K⁺ sur l'interaction actine-liposomes

La figure 22 illustre l'effet des ions K⁺ sur l'interaction actine-liposomes chargés positivement, négativement et neutres.

La turbidité différentielle d'un mélange actine-liposomes chargés positivement augmente en fonction de la concentration de KCl, jusqu'à une valeur de 25 mM. Cette hausse de turbidité montre que la présence de faibles quantités d'ions K⁺ favorise les interactions actine-liposomes chargés positivement.

Par contre, une hausse de la concentration de KCl de 25 à 200 mM cause une diminution de la turbidité différentielle. Le phénomène peut s'expliquer par une inhibition de l'interaction entre l'actine et les liposomes chargés positivement. La présence de fortes quantités d'ions K⁺ et Cl⁻ neutralisent les charges de l'actine et des liposomes ce qui diminue ainsi leur interaction.

A la figure 23B, qui représente l'influence du KCl sur une solution de liposomes chargés positivement seuls, on remarque que la turbidité des liposomes augmente en fonction de la concentration de KCl. Par contre, le KCl ne semble pas avoir d'influence sur l'actine seule.

Pour des concentrations supérieures à 200 mM de KCl, la turbidité différentielle du mélange actine-liposomes chargés positivement est nulle, montrant ainsi qu'aucune liaison ne se produit entre l'actine et les liposomes chargés positivement en présence de concentrations de KCl supérieures à 200 mM.

Ces conclusions sont confirmées par la microscopie électronique où les photographies d'un mélange actine-liposomes chargés positivement en présence de 25 mM de KCl (fig. 24) montrent la présence de filaments d'actine attachés à la surface des liposomes.

Par contre, dans une solution contenant 300 mM de KCl (fig. 25) aucune interaction n'est observée entre l'actine et les liposomes.

Pour ce qui est des mélanges actine-liposomes chargés négativement et neutres, les valeurs de turbidité différentielle sont nulles quelle que soit la concentration de KCl. Donc, le KCl n'a aucun effet sur l'interaction de l'actine avec des liposomes chargés négativement et neutres.

Figure 22. Turbidité différentielle à 550 nm des mélanges d'actine-F et de liposomes en fonction de la concentration de KCl

Figure A: Mélange actine-F-liposomes chargés positivement (90%PC+10%SA)

Figure B: Mélange actine-F-liposomes chargés négativement (90%PC+10%AD)

Figure C: Mélange actine-F-liposomes neutres (100%PC)

Concentration d'actine-F 0.3 mg/ml

Concentration de lipides 1 mM

Influence des ions K⁺ sur l'interaction actine-liposomes

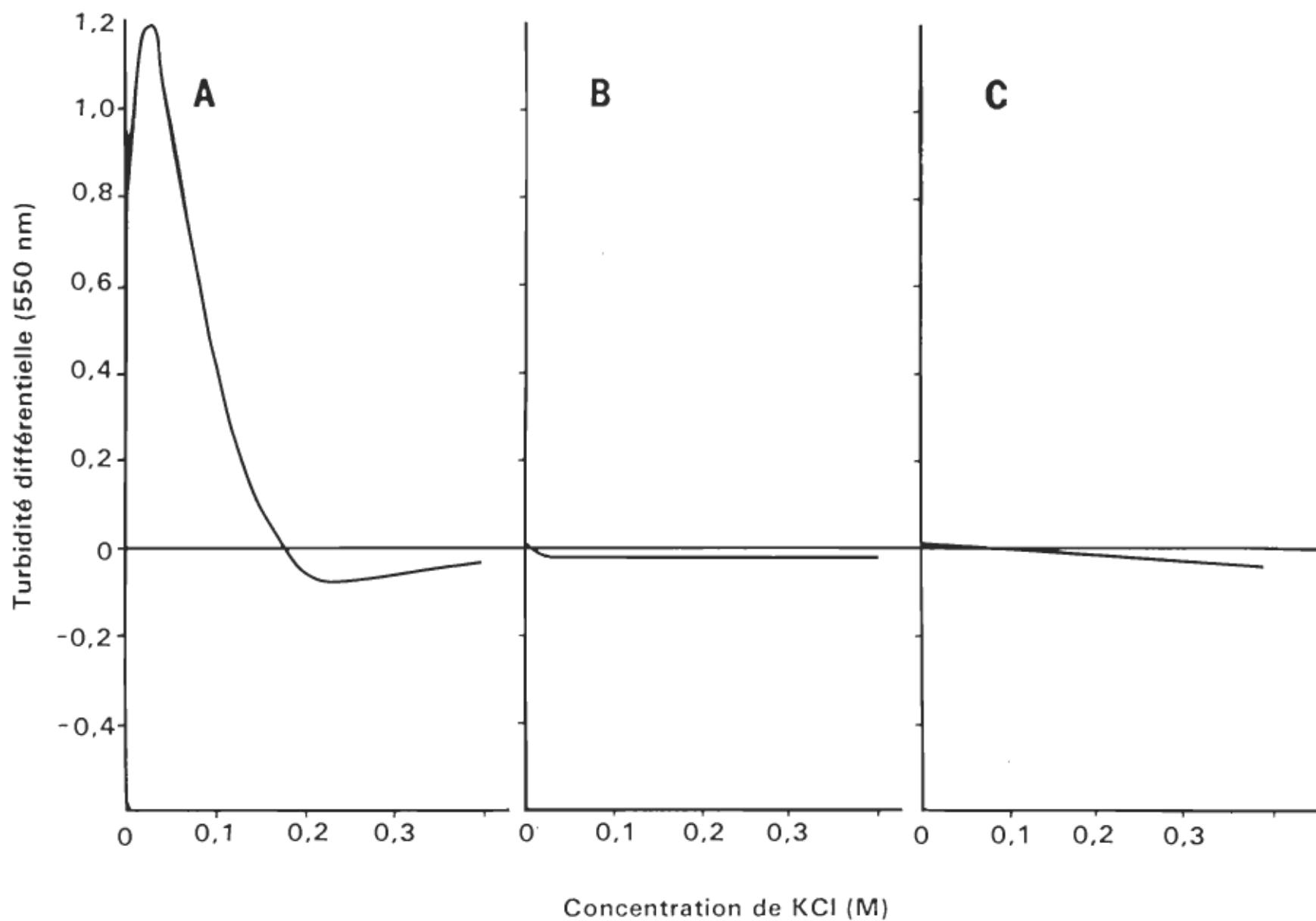


Figure 23. Turbidité de mélanges d'actine-F-liposomes chargés positivement (90%PC+10%SA) en fonction de la concentration de KCl avant — et après - - - - - séédimentation à 3700 g X 10 minutes.

Figure A: Mélange actine-liposomes

Figure B: Liposomes seuls

Figure C: Actine seule

Concentration d'actine-F 0.3 mg/ml

Concentration de lipides 1 mM

Influence des ions K⁺ sur l'interaction actine-liposomes

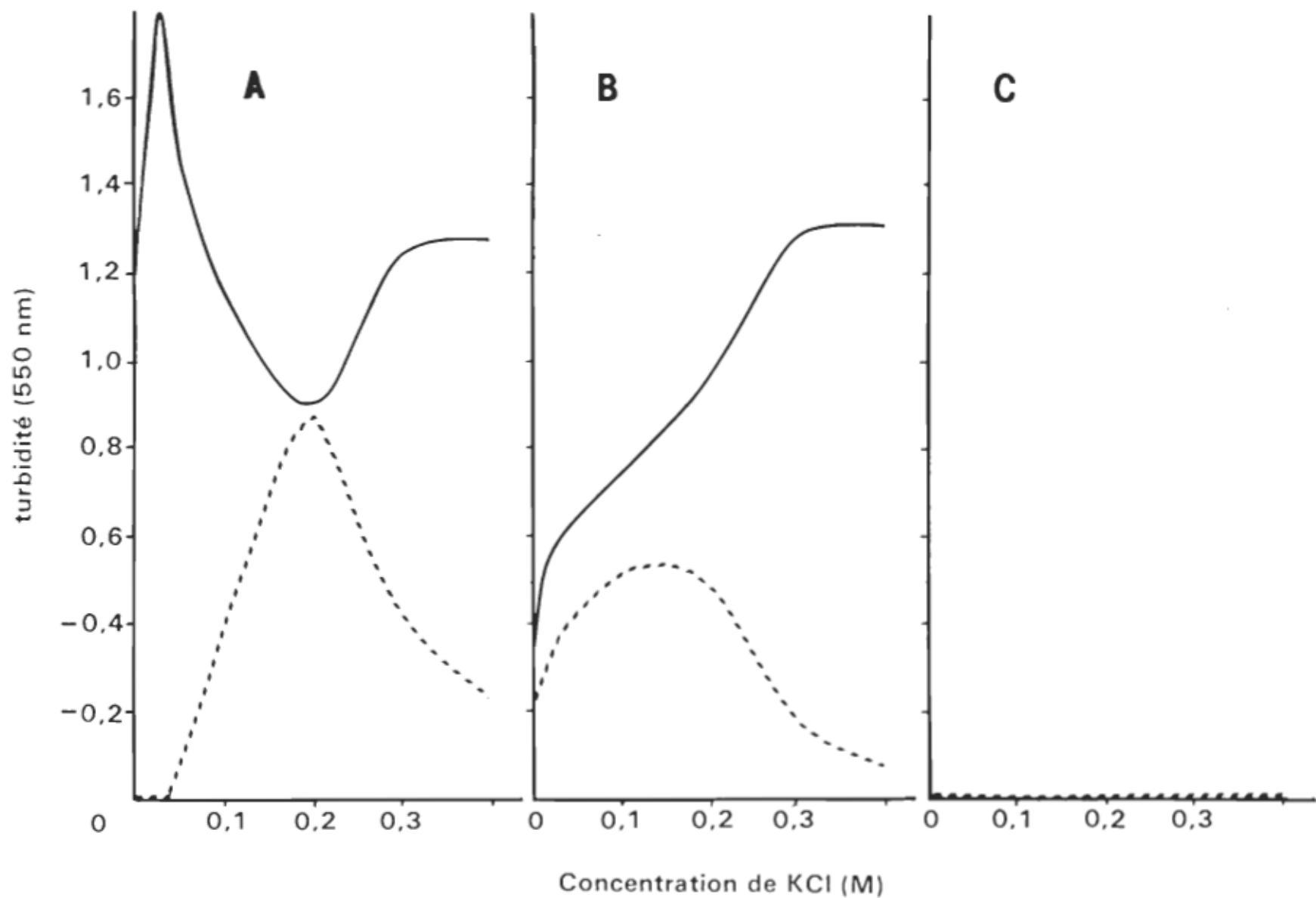


Figure 24. Vue au microscope électronique d'un liposome chargé positivement (90%PC+10%SA) avec de l'actine-F en présence de 25 mM de KCl. L'actine-F est disposée de façon régulière, "en filet" à la surface du liposome. Les filaments à l'extérieur du liposome sont désordonnés et le liposome prend une forme allongée.

Coloration à l'acétate d'uranyl 1%
Grossissement: 83000X

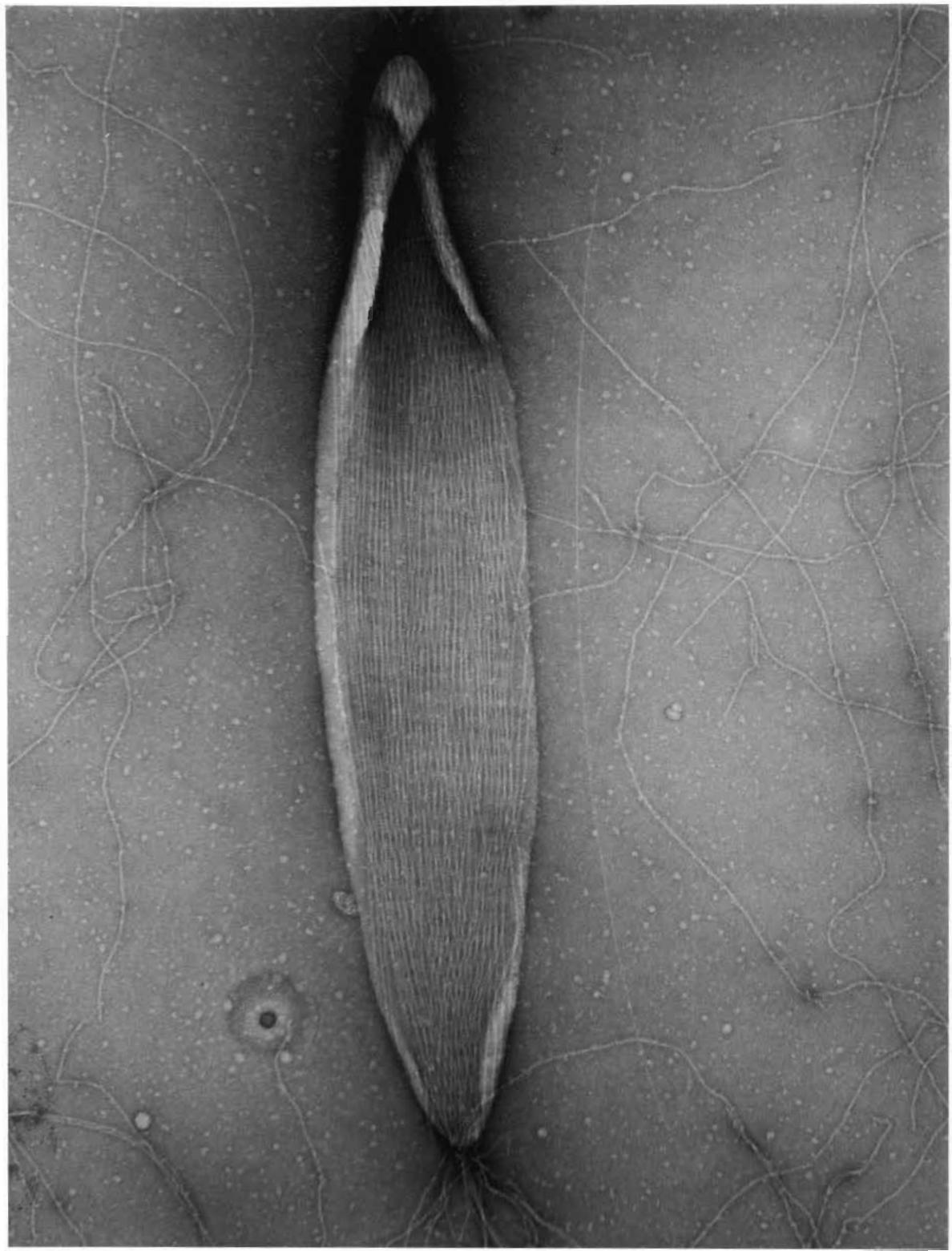
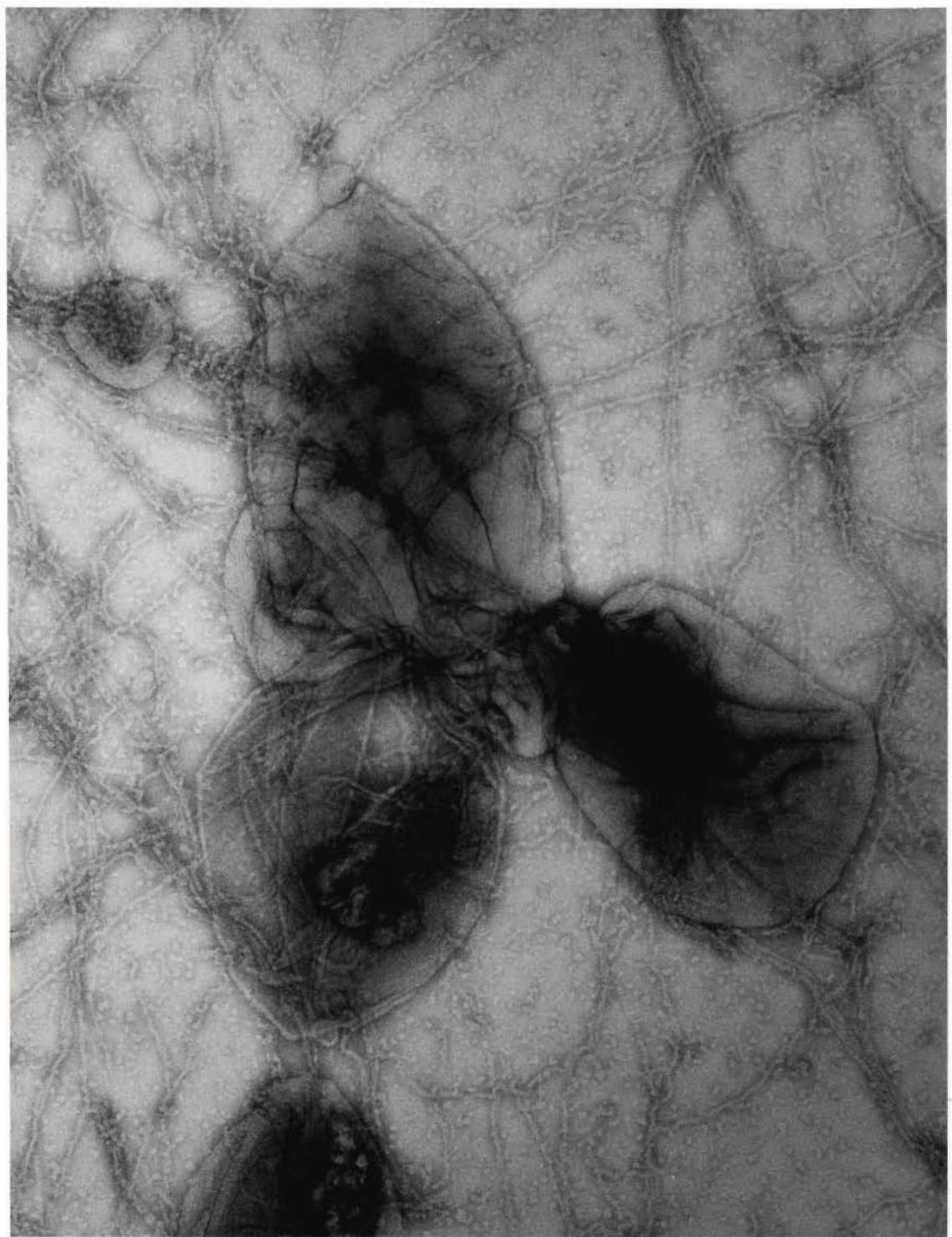


Figure 25. Inhibition de l'interaction entre l'actine-F et les liposomes chargés positivement en présence de 300 mM de KCl.
Il y a beaucoup de filaments dans le milieu mais aucune interaction n'est observée entre l'actine-F et les liposomes.
Coloration à l'acétate d'uranyl 1%
Grossissement: 107000X



F) Influence des ions divalents sur l'interaction actine-
liposomes

Les figures 26 et 27 montrent l'effet des ions Mg^{2+} et Ca^{2+} sur l'interaction actine-liposomes chargés positivement, négativement et neutres. Ces graphiques sont exprimés en turbidité différentielle en fonction de la concentration de $MgCl_2$ ou de $CaCl_2$ selon le cas. Nous traiterons les deux figures simultanément puisque le phénomène est le même pour les deux cations.

Lorsque l'on mélange de l'actine et des liposomes chargés positivement, en absence d'ions divalents, on observe une interaction entre l'actine et les liposomes puisque la turbidité différentielle du mélange est élevée. En présence de concentrations supérieures à 10 mM de Ca^{2+} et Mg^{2+} , la turbidité différentielle diminue continuellement en fonction de la concentration et devient nulle pour des concentrations d'ions divalents supérieures à 70 mM. Cette baisse de la turbidité différentielle signifie que l'interaction entre l'actine et les liposomes diminue en présence de fortes concentrations d'ions divalents. Cette inhibition d'interaction entre l'actine et les liposomes chargés positivement peut être due à deux causes:

1) les ions neutralisent les charges positives des liposomes et négatives de l'actine diminuant l'attraction électrostatique entre les deux. La situation est semblable à

celle avec le KCl.

2) les ions bivalents induisent la paracristallisation de l'actine. Ce phénomène provoque l'agrégation de l'actine en paracristaux, ce qui par conséquent, diminue physiquement la possibilité pour l'actine d'interagir avec les liposomes.

Les figures prises au microscope électronique montrent qu'en présence de faibles concentrations de Mg^{2+} , il y a phénomène d'agrégation entre l'actine et les liposomes chargés positivement (fig. 28). A plus fort grossissement (fig. 29), l'arrangement en structures cristallines de l'actine à la surface des liposomes est observé.

En ce qui concerne les mélanges actine-liposomes chargés négativement et neutres, les valeurs de turbidité différentielle augmentent jusqu'à des concentrations d'environ 20 mM d'ions Mg^{2+} ou Ca^{2+} , au-delà de ces concentrations, elles diminuent, ce qui suggère qu'une interaction se produit entre l'actine et les liposomes en présence de faibles concentrations d'ions divalents. Cette interaction n'est pas cependant aussi forte qu'avec les liposomes chargés positivement.

Nous savons que l'actine est chargée négativement et que les liposomes neutres possèdent des groupements phosphates chargés négativement. Les ions bivalents Ca^{2+} et Mg^{2+} serviraient d'intermédiaire entre les charges négatives de l'ac-

tine et des liposomes. C'est un effet de "pontage" par les ions divalents. A fortes concentrations d'ions, le pontage disparaît en raison de la saturation des sites négatifs de l'actine et des liposomes par ces ions.

En microscopie électronique, on peut voir qu'en absence de Mg^{2+} , aucune interaction ne se produit entre l'actine et les liposomes neutres (fig. 30). Actine et liposomes se côtoient dans le milieu. Cependant, en présence de 15 mM de Mg^{2+} , on peut observer, sur certains liposomes, que l'actine se dépose de façon régulière à la surface des liposomes neutres (fig. 31). On remarque aussi la présence de "bundles" d'actine dans le milieu.

Ainsi, des concentrations de Ca^{2+} et de Mg^{2+} de l'ordre de 10 mM favorisent l'interaction entre l'actine et les liposomes chargés négativement ou neutres.

Figure 26. Turbidité différentielle à 550 nm de mélanges actine-liposomes en fonction de la concentration de $MgCl_2$.

Figure A: Mélange actine-F-liposomes chargés positivement (90%PC+10%SA)

Figure B: Mélange actine-F-liposomes chargés négativement (90%PC+10%AO)

Figure C: Mélange actine-F-liposomes neutres (100%PC)

Concentration d'actine-F 0.3 mg/ml

Concentration de lipides 1 mM

Influence des ions Mg^{2+} sur l'interaction actine-liposomes

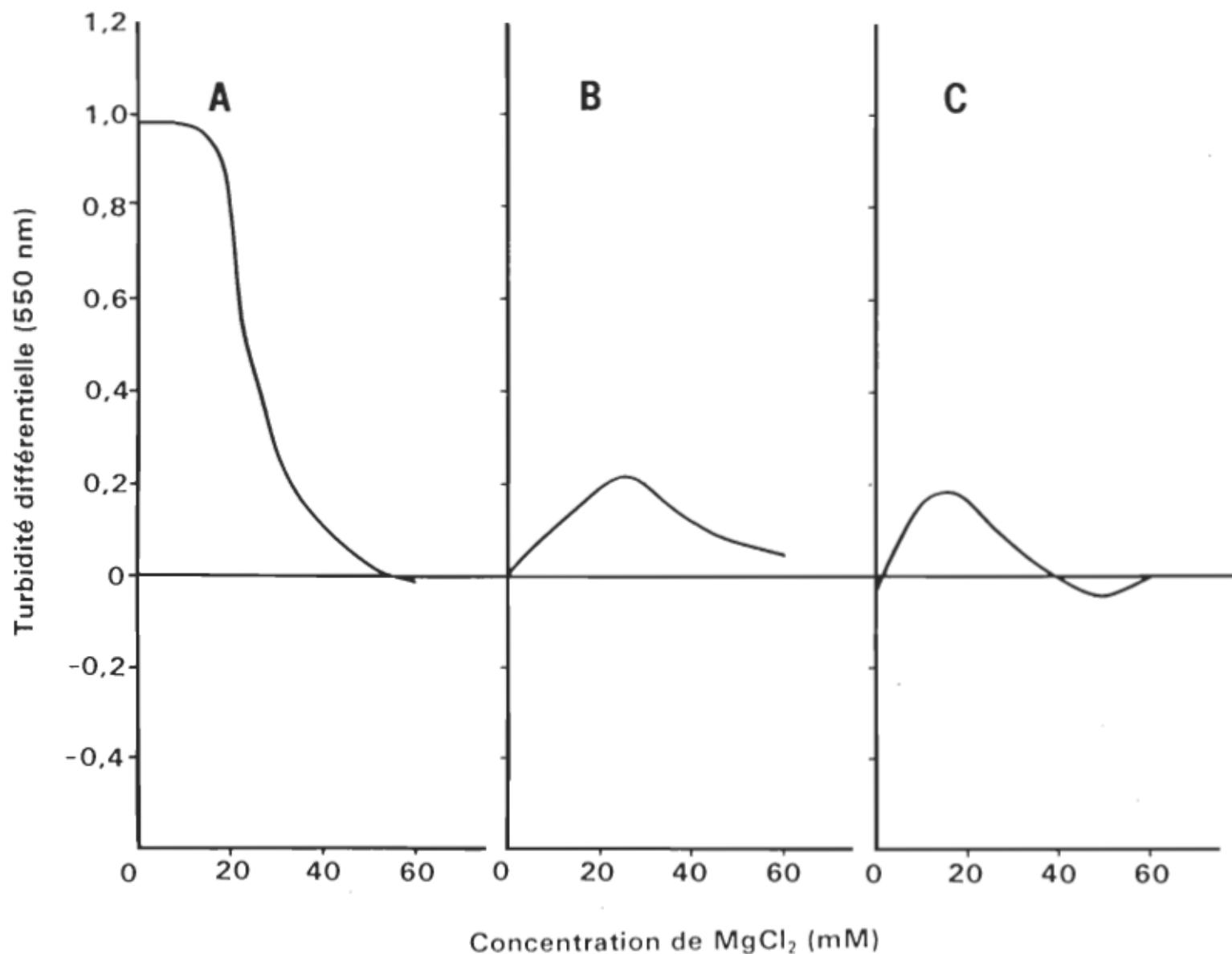


Figure 27. Turbidité différentielle à 550 nm de mélanges actine-liposomes en fonction de la concentration de CaCl_2

Figure A: Mélange actine-F-liposomes

chargés positivement (90%PC+10%SA)

Figure B: Mélange actine-F-liposomes

chargés négativement (90%PC+10%AO)

Figure C: Mélange actine-F-liposomes

neutres (100%PC)

Concentration d'actine-F 0.3 mg/ml

Concentration de lipides 1 mM

Influence des ions Ca^{2+} sur l'interaction actine-liposomes

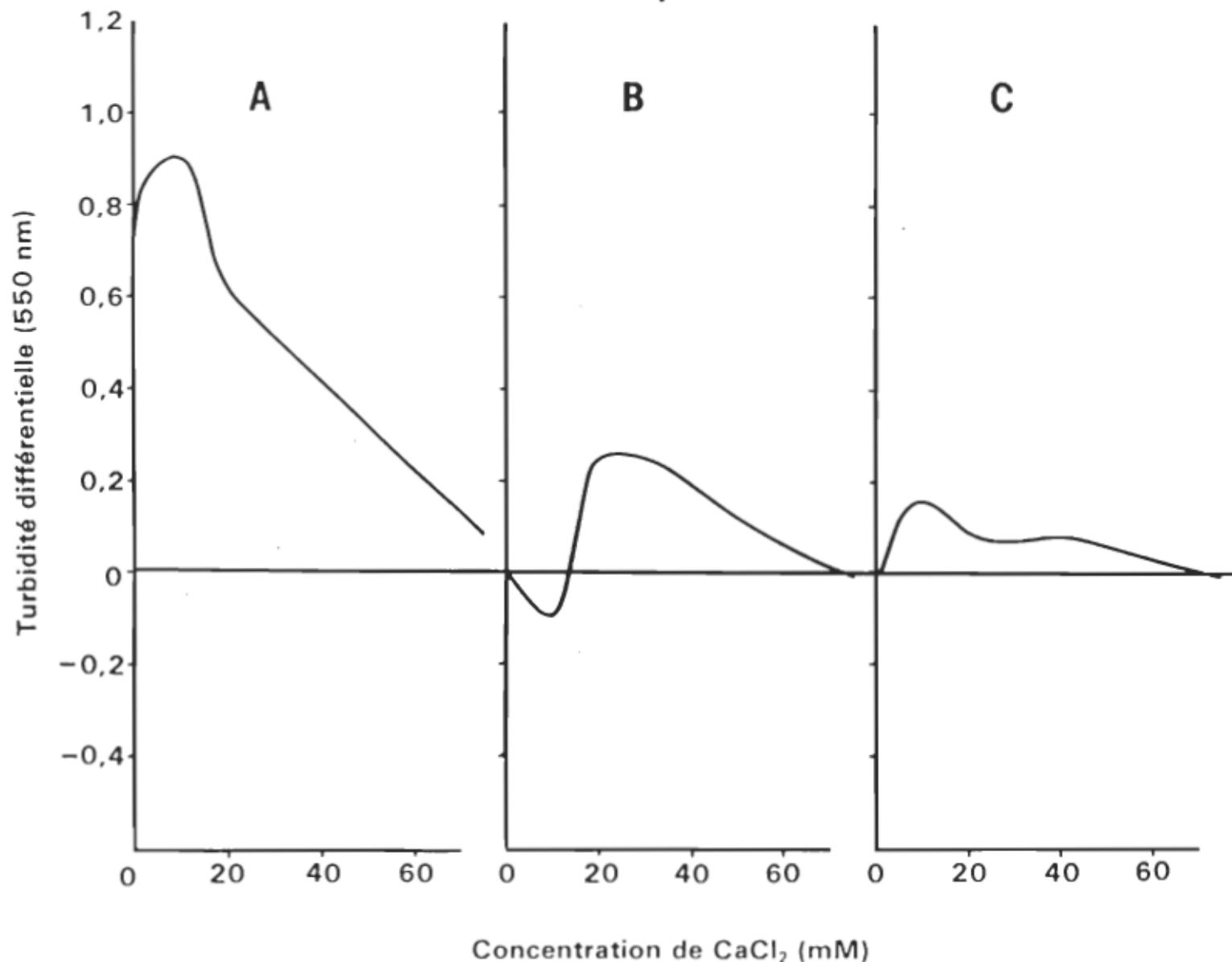


Figure 28. Vue au microscope électronique d'amas de liposomes chargés positivement et d'actine-F formés en présence de 15 mM de $MgCl_2$. L'actine relie entre eux les liposomes qui sont allongés. Les filaments sont disposés parallèlement sur la surface des liposomes. On remarque un bundle à l'extérieur des liposomes.
Coloration à l'acétate d'uranyl 1%
Grossissement: 34000X



Figure 29. Liposomes chargés positivement (90%PC+10%SA)
sur lequel sont disposés des filaments
d'actine. Solution contenant 15 mM de $MgCl_2$.
Les filaments ont une disposition parallèle
et montrent des striations transversales
avec une périodicité longitudinale de 37.5 nm.
Coloration à l'acétate d'uranyl 1%
Grossissement: 137000X



Figure 30. Mélange d'actine-F et de liposomes neutres (100%PC) en absence de $MgCl_2$. L'actine-F et les liposomes se côtoient dans le milieu mais aucune interaction n'a lieu entre les deux.

Coloration à l'acétate d'uranyl 1%

Grossissement: 152000X

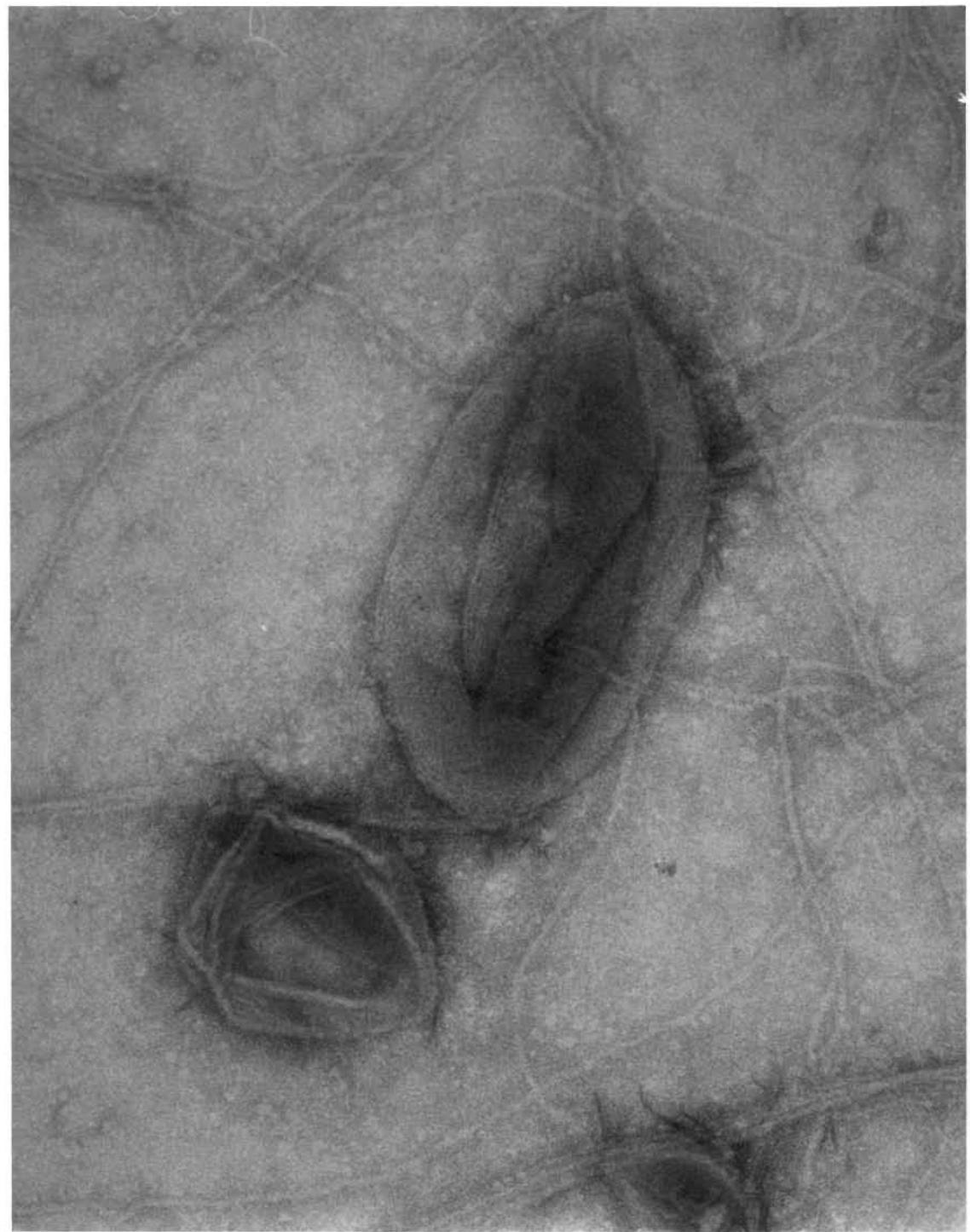
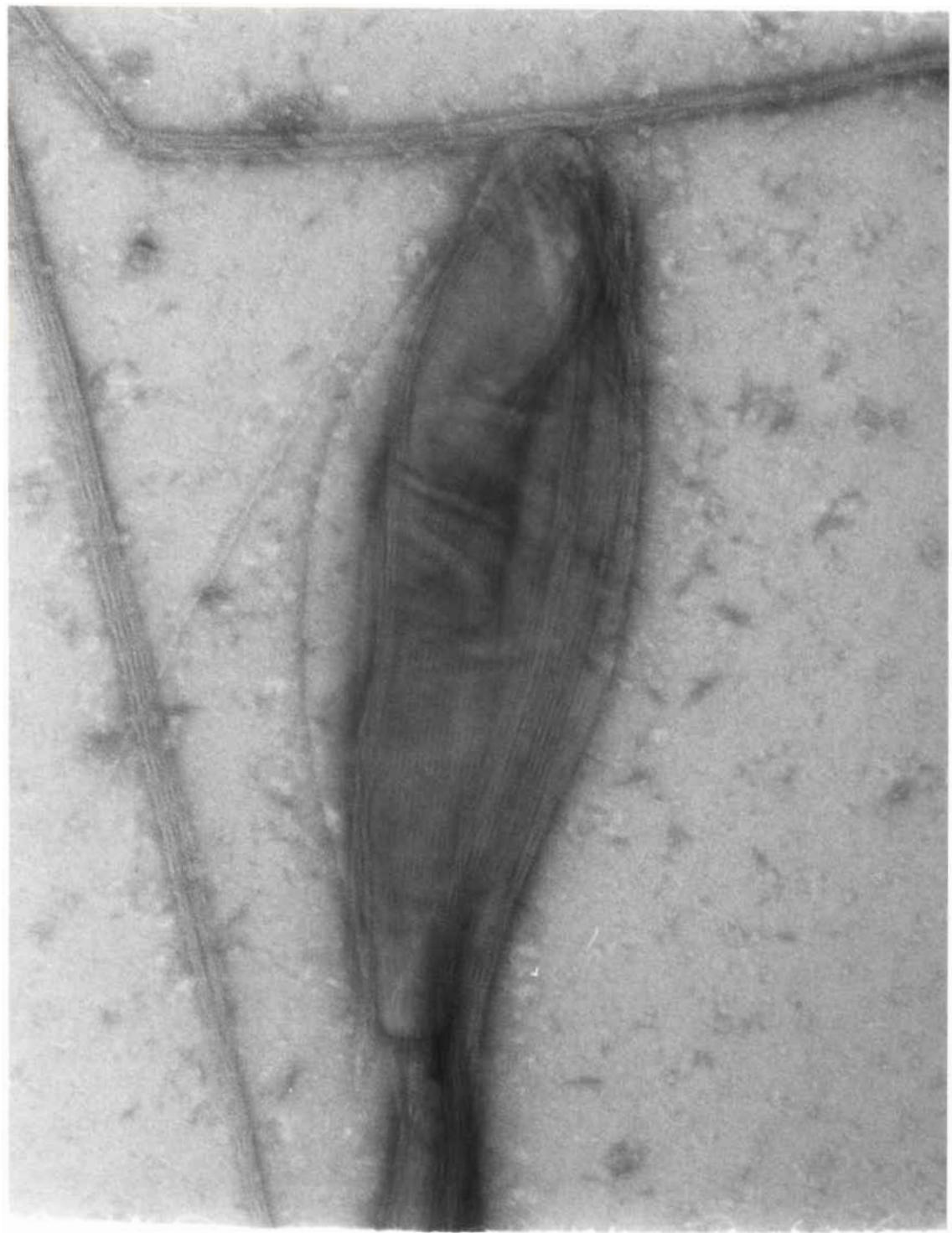


Figure 31. Interaction entre l'actine-F et les liposomes neutres (100%PC) en présence de 15 mM de $MgCl_2$. Les filaments sont disposés parallèlement sur le liposome et le liposome a pris une forme allongée. Des bundles d'actine-F sont présents dans le milieu.

Coloration à l'acétate d'uranyl 1%

Grossissement: 141000X



G) Influence du pH sur l'interaction actine-liposomes

La figure 32 montre l'influence du pH sur des mélanges d'actine-F et de liposomes chargés positivement, négativement et neutres. La figure 33 illustre aussi l'influence du pH mais pour des mélanges actine-G-liposomes. Les graphiques sont exprimés en turbidité différentielle en fonction du pH.

Les valeurs de turbidité différentielle sont élevées pour des mélanges actine-liposomes chargés positivement aussi bien avec l'actine-G qu'avec l'actine-F, mais elles sont nulles pour des mélanges actine-liposomes chargés négativement et neutres, ce qui confirme nos résultats antérieurs selon lesquels l'actine n'interagit qu'avec les liposomes chargés positivement.

De plus, les valeurs de turbidité différentielle demeurent constantes en fonction du pH de 6.0 à 8.0 et quel que soit le mélange impliqué. En conséquence, les variations de pH de 6.0 à 8.0 n'influencent aucunement les interactions actine-liposomes chargés positivement et ne favorisent pas les interactions actine-liposomes chargés négativement ou neutres, du moins dans les conditions expérimentales étudiées

Figure 32. Turbidité différentielle des mélanges actine-F-liposomes en fonction du pH.

Figure A: Mélange actine-F-liposomes chargés positivement (90%PC+10%SA)

Figure B: Mélange actine-F-liposomes chargés négativement (90%PC+10%AO)

Figure C: Mélange actine-F-liposomes neutres (100%PC)

Concentration d'actine-F 0.3 mg/ml

Concentration de lipides 1 mM

Influence du pH sur l'interaction actine-liposomes

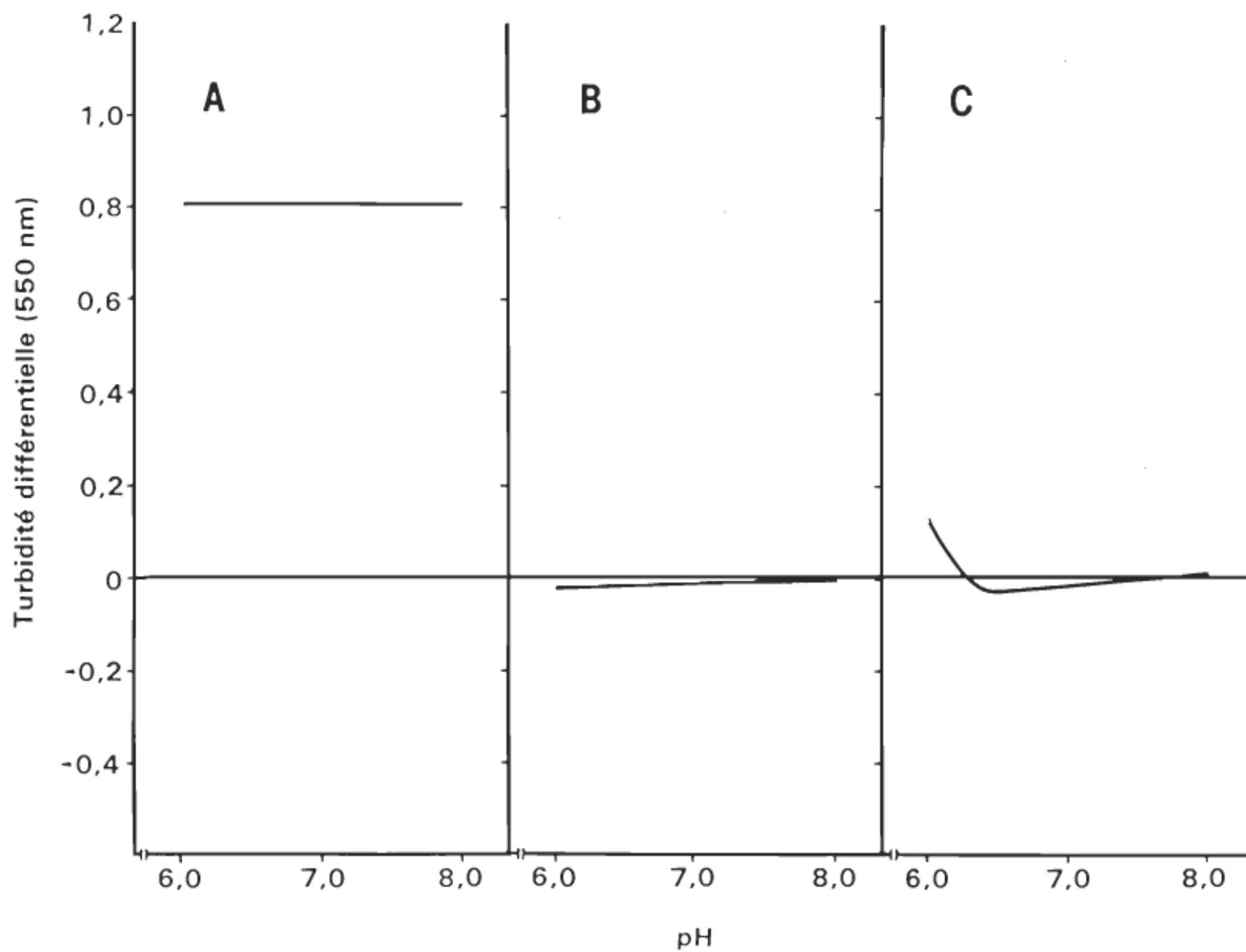


Figure 33. Turbidité différentielle des mélanges
actine-G-liposomes en fonction du pH

Figure A: Mélange actine-G-liposomes
chargés positivement (90%PC+10%SA)

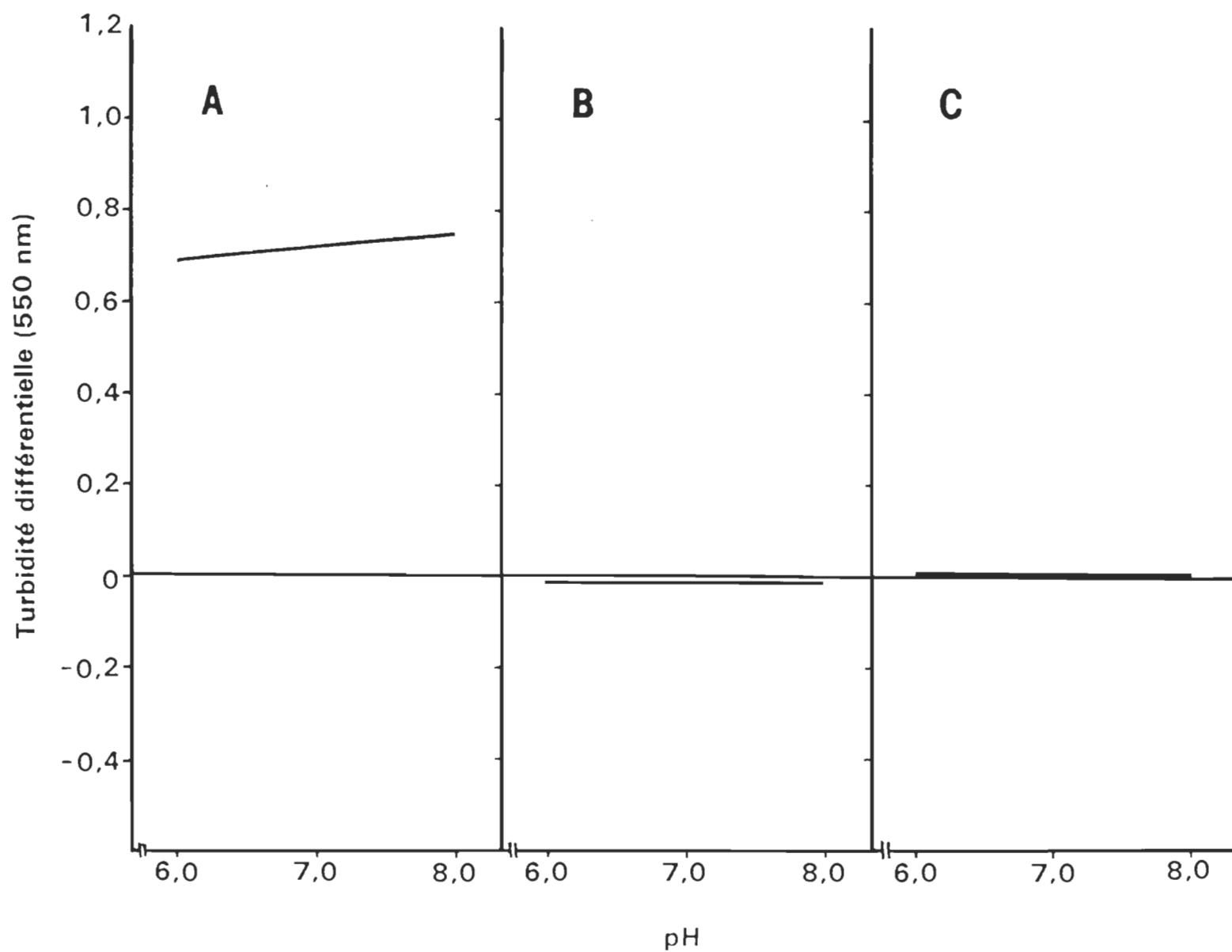
Figure B: Mélange actine-G-liposomes
chargés négativement (90%PC+10%AO)

Figure C: Mélange actine-G-liposomes
neutres (100%PC)

Concentration d'actine-G 0.3 mg/ml

Concentration de lipides 1 mM

Influence du pH sur l'interaction actine-liposomes



H) Influence de la température sur l'interaction actine-liposomes

i) avec l'actine-F

La figure 34 illustre l'effet de la température sur l'interaction entre l'actine-F et les liposomes chargés positivement, négativement et neutres.

Les valeurs de turbidité différentielle d'une solution d'actine-F et de liposomes chargés positivement sont élevées mais demeurent constantes quelle que soit la température du mélange. Ces valeurs élevées confirment l'existence d'une interaction entre l'actine et les liposomes chargés positivement. Nos résultats indiquent que la température n'a aucun effet sur le phénomène du moins dans la gamme des températures étudiées soit de 0 à 50°C.

En ce qui concerne les liposomes chargés négativement et neutres, les graphiques montrent qu'il n'y a pas d'interaction entre l'actine et les liposomes puisque les valeurs de turbidité différentielle sont presque nulles. De plus, les valeurs restent constantes en fonction de la température.

ii) avec l'actine-G

Les variations de turbidité différentielle d'un mélange actine-G-liposomes chargés positivement, négativement et neutres en fonction de la température sont illustrées à la

figure 35.

Pour un mélange actine-G-liposomes chargés positivement, la turbidité différentielle augmente en fonction de la température, ce qui suggère que le phénomène d'interaction entre l'actine et les liposomes chargés positivement est influencé par la température. Cependant, comme on peut le voir à la figure 36B, la turbidité des liposomes seuls mesurée avant centrifugation et après centrifugation varie aussi en fonction de la température. Compte tenu de l'intensité moyenne du phénomène et de l'imprécision de la technique utilisée, nous ne pouvons conclure s'il y a un effet de la température sur l'interaction actine-liposomes ou si cet effet résulte de l'action de la température sur les liposomes seuls.

La turbidité différentielle des mélanges actine-G-liposomes chargés négativement et neutres est nulle et demeure constante en fonction de la température. La température ne modifie aucunement le phénomène.

Figure 34. Turbidité différentielle des mélanges actine-F-liposomes en fonction de la température

Figure A: Mélange actine-F-liposomes chargés positivement (90%PC+10%SA)

Figure B: Mélange actine-F-liposomes chargés négativement (90%PC+10%AO)

Figure C: Mélange actine-F-liposomes neutres (100%PC)

Concentration d'actine-F 0.3 mg/ml

Concentration de lipides 1 mM

Influence de la température sur l'interaction actine-liposomes

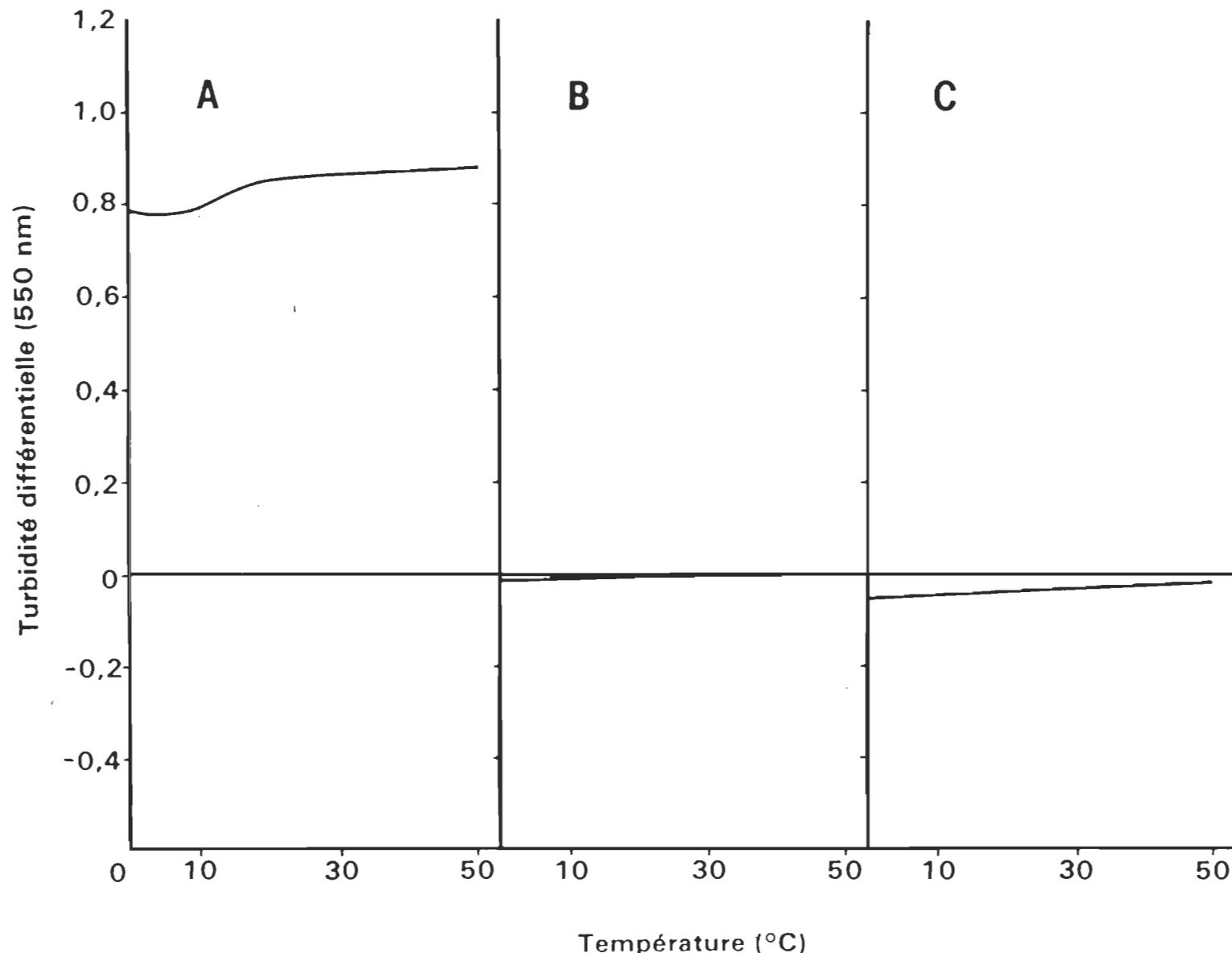


Figure 35. Turbidité différentielle des mélanges actine-G-liposomes en fonction de la température

Figure A: Mélange actine-G-liposomes chargés positivement (90%PC+10%SA)

Figure B: Mélange actine-G-liposomes chargés négativement (90%PC+10%AO)

Figure C: Mélange actine-G-liposomes neutres (100%PC)

Concentration d'actine-G 0.3 mg/ml

Concentration de lipides 1 mM

Influence de la température sur l'interaction actine-liposomes

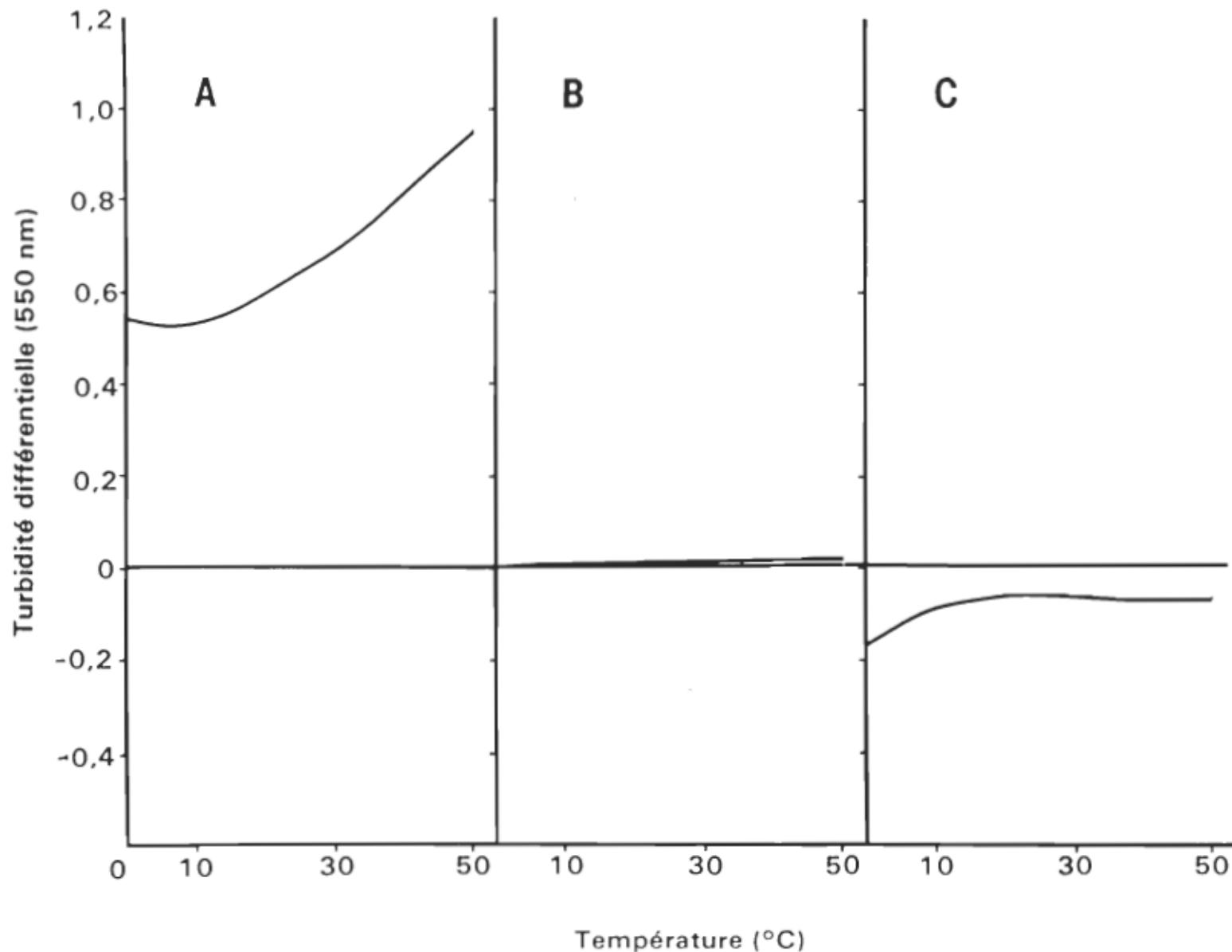


Figure 36. Turbidité à 550 nm d'un mélange actine-G et de liposomes chargés positivement (90%PC+ 10%SA) en fonction de la température.
avant — et après - - - séédimentation à 3700 g X 10 minutes.

Figure A: Mélange actine-G-liposomes

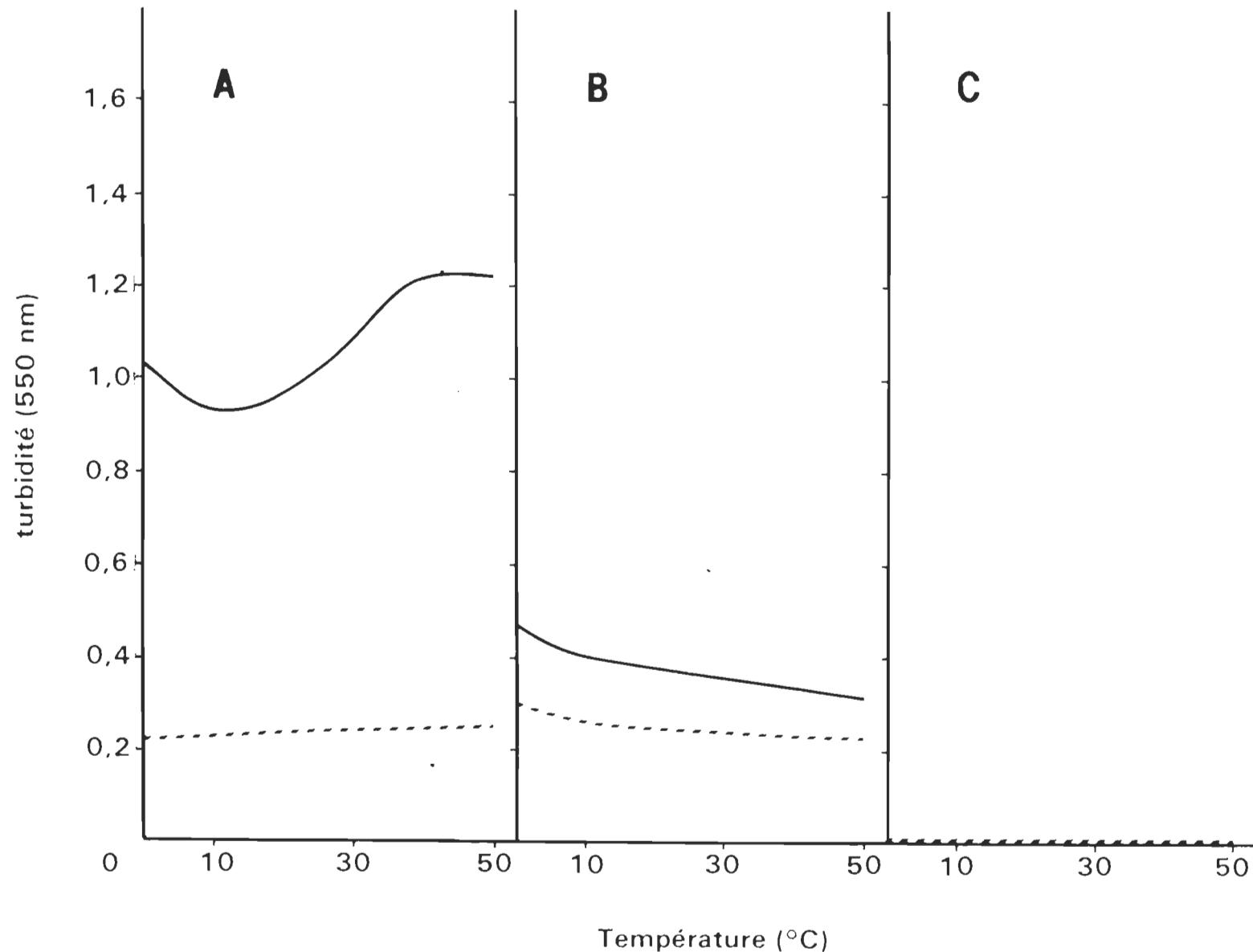
Figure B: liposomes seuls

Figure C: actine seule

Concentration d'actine-F 0.3 mg/ml

Concentration de lipides 1 mM

Influence de la température sur l'interaction actine-liposomes



I) Influence de la concentration d'ATP sur l'interaction actine-liposomes

i) avec l'actine-F

La figure 37 montre les valeurs de turbidité différentielle obtenues en mélangeant de l'actine-F avec des liposomes chargés positivement, négativement et neutres en fonction de la concentration d'ATP.

Les valeurs de turbidité différentielle pour un mélange actine-F-liposomes chargés positivement, diminuent lorsque des concentrations supérieures à 5 mM d'ATP sont dans le milieu. Il semble que ce soit l'effet de l'ATP sur les liposomes seuls qui soit responsable de cette baisse de turbidité différentielle. En effet, on remarque sur la figure 38B qui montre l'action de l'ATP sur les liposomes seuls qu'à des concentrations supérieures à 5 mM d'ATP, la turbidité d'une solution de liposomes seuls croît, ce qui indique soit une fusion, soit une agrégation des liposomes, phénomène qui diminue par conséquent l'interaction actine-liposomes.

Pour les mélanges actine-F-liposomes chargés négativement et neutres, la turbidité différentielle est nulle dans les deux cas, et ceci quelle que soit la concentration d'ATP (fig. 37). L'ATP n'a donc aucun effet et n'induit aucune interaction entre l'actine et ces liposomes chargés négativement et neutres.

ii) avec l'actine-G

Le graphique 39 illustre l'influence de concentrations croissantes d'ATP sur l'interaction entre l'actine-G et les liposomes chargés positivement, négativement et neutres.

Pour un mélange actine-G-liposomes chargés positivement, les valeurs de turbidité différentielle décroissent rapidement puis se stabilisent, en fonction de la concentration d'ATP. Pour expliquer cette forte diminution de la turbidité différentielle, nous devons nous référer à la figure 40 qui illustre l'effet de l'ATP sur les liposomes seuls. En présence d'ATP, les liposomes subissent une influence marquée qui se traduit par une augmentation de la turbidité. Ceci peut être du à la fusion ou l'agrégation des liposomes, diminuant ainsi la surface de contact avec l'actine et par conséquent les interactions actine-liposomes.

Les valeurs de turbidité différentielle d'un mélange actine-G-liposomes chargés négativement (fig 39) demeurent constantes et nulles en fonction de la concentration d'ATP ce qui signifie qu'aucune interaction n'a lieu entre l'actine et ces liposomes chargés négativement et que l'ATP n'a aucune influence sur ce système.

Les valeurs de turbidité différentielle pour les

mélanges actine-G-liposomes neutres varient en fonction de la concentration d'ATP (fig 39). Sur la figure 41 qui montre l'influence de l'ATP sur un mélange actine-G-liposomes neutre (41A), liposomes seuls (41B) et actine seule (41C), on remarque que l'ATP a un effet très marqué sur les liposomes seuls ayant pour résultat une augmentation de la turbidité due à la fusion ou l'agrégation des liposomes. Dans ce cas, on peut dire que les variations de la turbidité différentielle sont dues au moins en partie à un effet de l'ATP sur les liposomes. Cependant, il ne s'agit sans doute pas de la seule raison. En effet, on remarque que les valeurs de turbidité différentielle sont négatives ce qui signifie que la turbidité du mélange a une valeur inférieure à la somme des turbidités des constituants seuls. Nous n'avons pas d'explication pour interpréter ce phénomène.

Figure 37. Turbidité différentielle des mélanges actine-G-liposomes en fonction de la concentration d'ATP.

Figure A: Mélange actine-F-liposomes chargés positivement (90%PC+10%SA)

Figure B: Mélange actine-F-liposomes chargés négativement (90%PC+10%AO)

Figure C: Mélange actine-F-liposomes neutres (100%PC)

Concentration d'actine-F 0.3 mg/ml

Concentration de lipides 1 mM

Influence de l'ATP sur l'interaction actine-liposomes

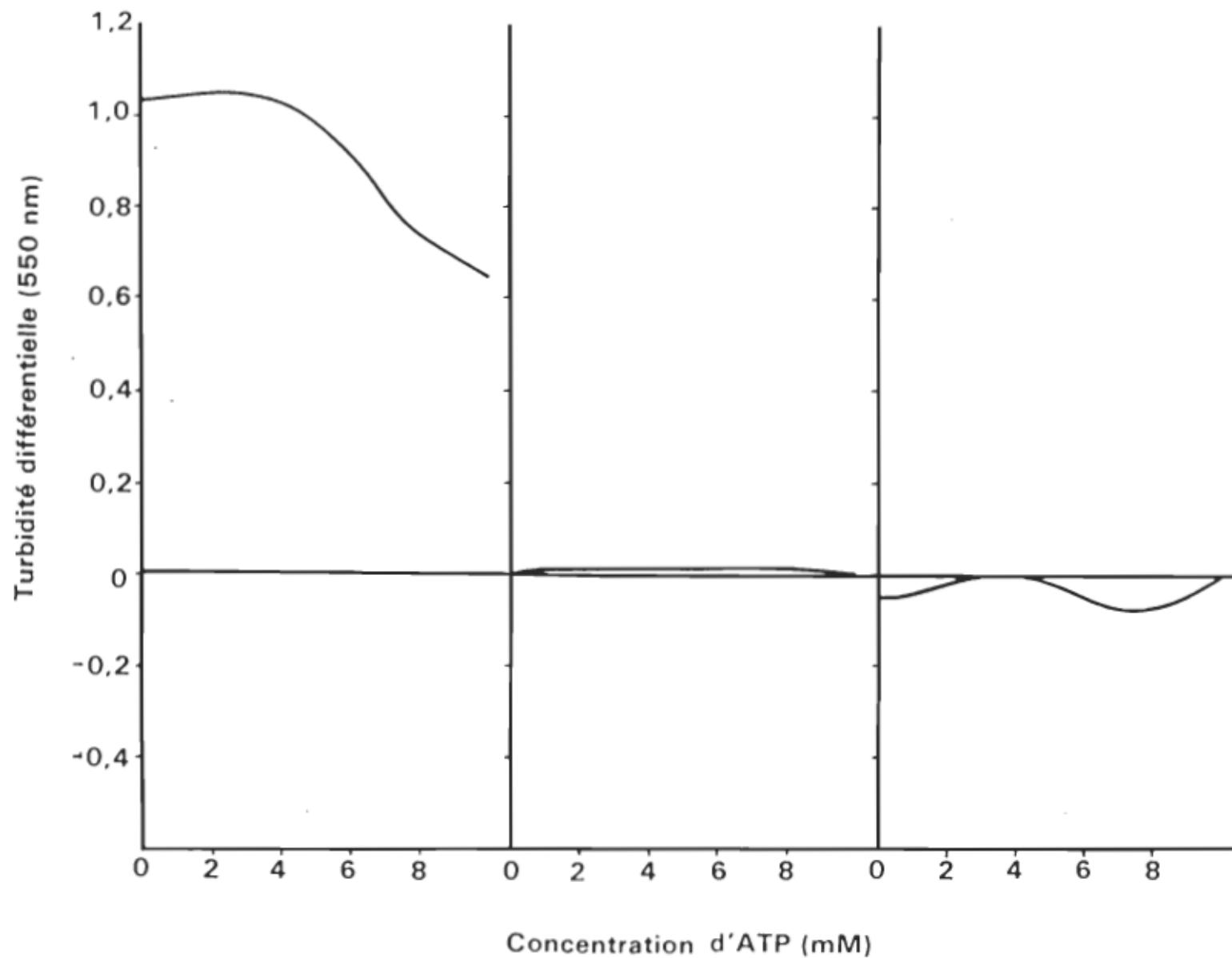


Figure 38. Turbidité à 550 nm d'un mélange actine-F et de liposomes chargés positivement (90%PC+ 10%SA) en fonction de la concentration d'ATP avant — et après--- séédimentation à 3700 g X 10 minutes.

Figure A: Mélange actine-F-liposomes

Figure B: liposomes seuls

Figure C: actine seule

Concentration d'actine-F 0.3 mg/ml

Concentration de lipides 1 mM

Influence de l'ATP sur l'interaction actine-liposomes

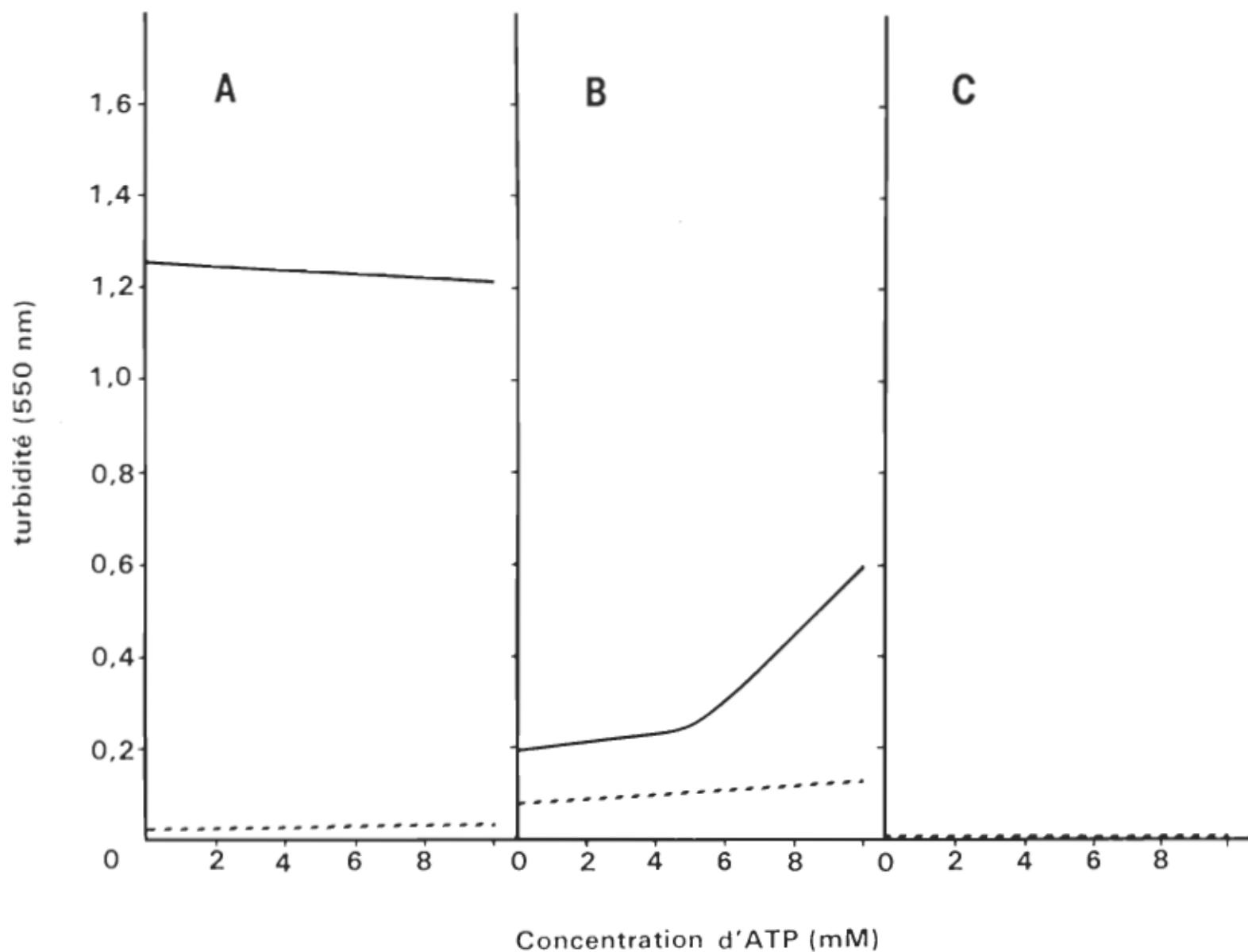


Figure 39. Turbidité différentielle des mélanges actine-G-liposomes en fonction de la concentration d'ATP

Figure A: Mélange actine-G-liposomes

chargés positivement (90%PC+10%SA)

Figure B: Mélange actine-G-liposomes

chargés négativement (90%PC+10%AO)

Figure C: Mélange actine-G-liposomes

neutres (100%PC)

Concentration d'actine-G 0.3 mg/ml

Concentration de lipides 1 mM

Influence de l'ATP sur l'interaction actine-liposomes

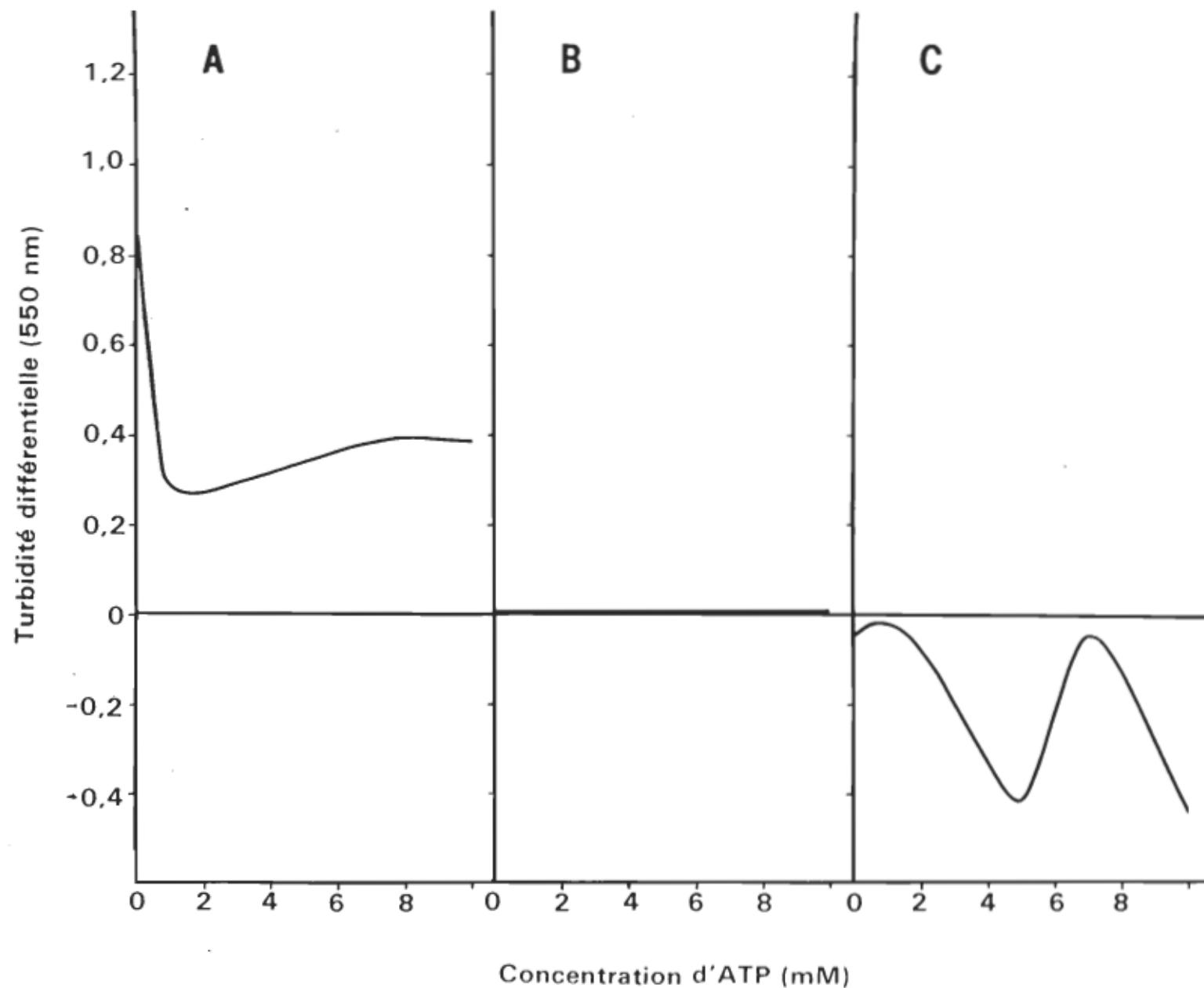


Figure 40. Turbidité à 550 nm d'un mélange actine-G et de liposomes chargés positivement (90%PC+ 10%SA) en fonction de la concentration d'ATP avant — et après---sédimentation à 3700 g X 10 minutes.

Figure A: Mélange actine-G-liposomes

Figure B: liposomes seuls

Figure C: actine seule

Concentration d'actine-G 0.3 mg/ml

Concentration de lipides 1 mM

Influence de l'ATP sur l'interaction actine-liposomes

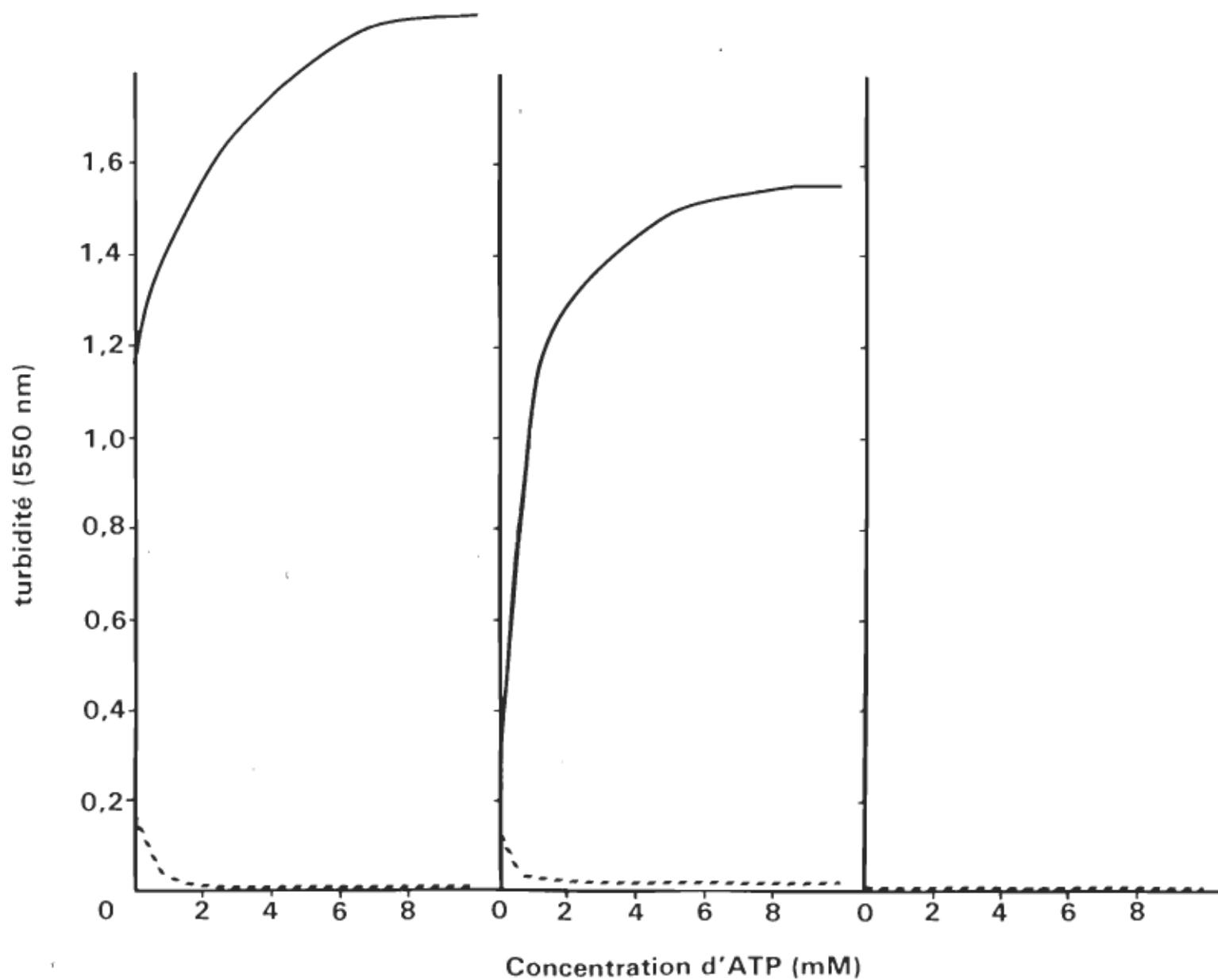


Figure 41. Turbidité à 550 nm d'un mélange d'actine-G-liposomes neutres en fonction de la concentration d'ATP avant — et après - - - sémentation à 3700 g X 10 minutes.

Figure A: Mélange actine-G-liposomes

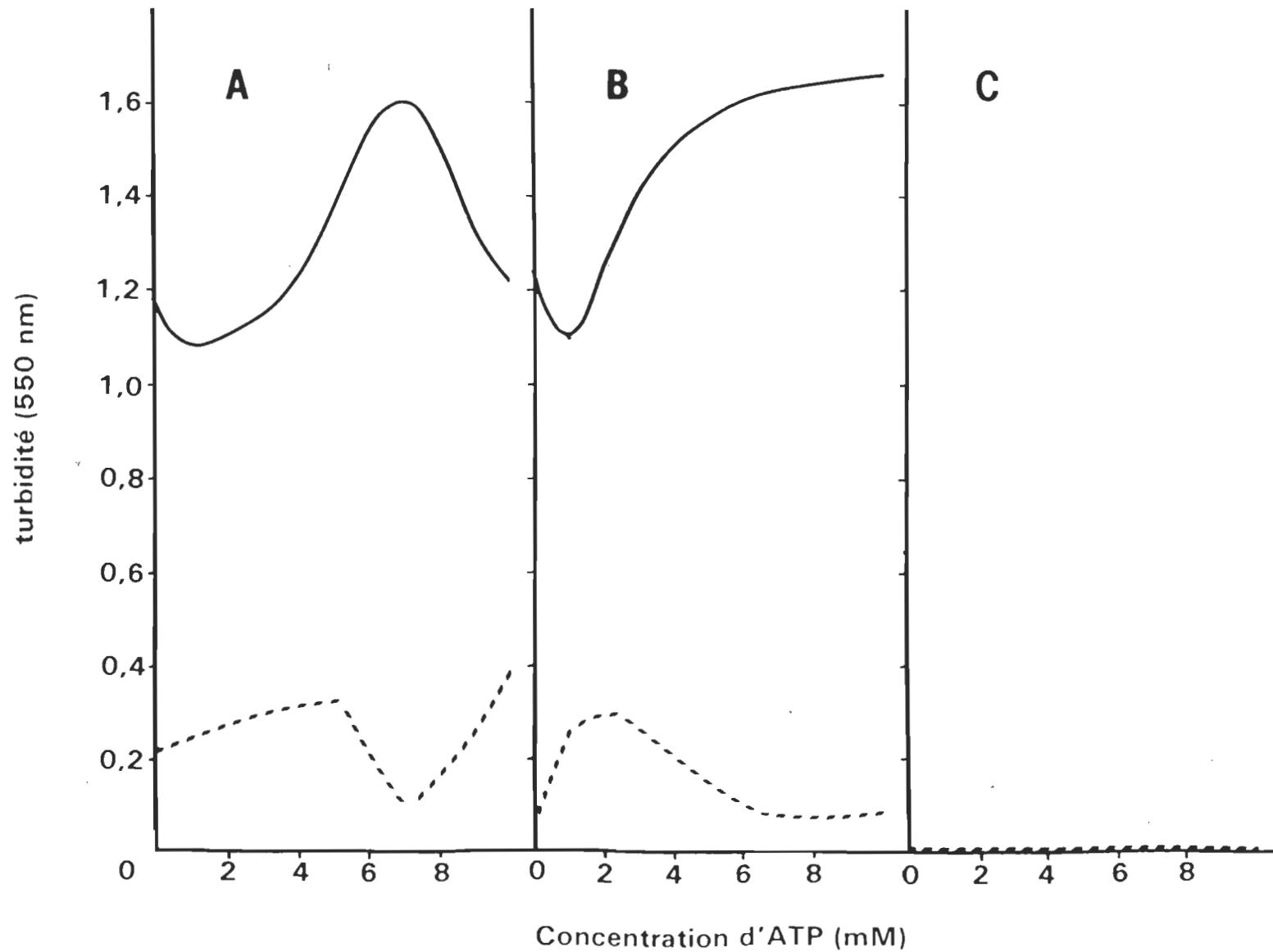
Figure B: liposomes seuls

Figure C: actine seule

Concentration d'actine-G 0.3 mg/ml

Concentration de lipides 1 mM

Influence de l'ATP sur l'interaction actine-liposomes



III-Conclusion générale

En conclusion, il existe une interaction directe entre l'actine-G et F avec les lipides chargés positivement. Cette interaction serait de nature électrostatique puisque des concentrations élevées d'ions monovalents et divalents inhibent cette interaction.

Par contre, l'ATP, le pH et la température n'ont que peu d'influence sur les interactions entre l'actine et les liposomes chargés positivement.

Les interactions actine-liposomes chargés négativement et neutres sont aussi possibles mais seulement en présence d'ions divalents. Cependant l'intensité de l'agrégation est faible.

Lorsque l'actine se dépose à la surface d'un liposome il se forme des structures cristallines de deux types:

- 1) des structures paracrystallines de type de Hanson
- 2) des structures en "filet".

DISCUSSION

Beaucoup de travaux ont été antérieurement faits en ce qui concerne l'interaction entre le cytosquelette, en particulier l'actine, et les membranes cellulaires (12, 30, 62, 63, 71, 105, 108, 135, 160, 161, 166). Il est généralement admis que l'actine se lie aux membranes par l'intermédiaire de protéines membranaires (17, 23, 29, 31, 41, 55, 56, 74, 87, 94, 100, 106, 112, 133, 140, 165). Par contre, la littérature ne fait aucunement mention de la possibilité d'une interaction directe entre l'actine seule et des lipides membranaires. Plusieurs études ont été effectuées sur l'interaction entre les liposomes et la tubuline (26, 77, 84, 85, 89) car on lui attribue aussi un rôle dans les mouvements cellulaires (9, 81, 90, 176) et le maintien de la forme de la cellule (101). Jamais une étude semblable avec l'actine n'a été amorcée. Dans ce projet de recherche, nous avons mis en évidence l'existence d'une interaction directe entre l'actine et les lipides. Nos résultats remettent donc en cause certaines conclusions de la littérature.

Critique des techniques utilisées

1) Méthode de préparation des liposomes

La technique de renversement de phase mise au point par

Szoka et Papahadjopoulos (158) possède l'avantage d'être reproductible: les liposomes préparés dans des conditions données sont très semblables d'une préparation à l'autre. De plus, cette méthode donne des liposomes très concentrés et on peut utiliser une grande variété de lipides. Les liposomes obtenus sont presque tous unilamellaires et peu sont plurilamellaires.

Cependant, cette technique présente certains inconvénients: les populations de liposomes ont une taille très variable. Leur diamètre varie entre 200 et 1000 nm. Or, comme l'actine et les liposomes n'ont pas une flexibilité illimitée, l'actine n'a tendance à se fixer que sur les gros liposomes. Il aurait été possible de séparer les liposomes selon leur taille par des techniques connues de centrifugation, de chromatographie ou d'ultrafiltration (114, 123), mais une fois fractionné, il aurait été nécessaire soit de doser les lipides dans les fractions obtenues soit de compter les liposomes. Or, cela nécessite des manipulations supplémentaires qui sont une source d'erreur et d'imprécision. En effet, les techniques de numération des liposomes en microscopie électronique sont très imprécises. Quant aux techniques de dosage de lipides, elles reposent sur la minéralisation du spécimen et le dosage du phosphore ce qui nécessite un gros échantillon et dont le résultat est plus ou moins précis surtout lorsque l'on travaille en présence d'ATP.

qui contient du phosphore.

Un autre inconvénient est que la technique de Szoka et Papahadjopoulos forme des liposomes de tailles différentes en fonction des conditions dans lesquelles on les prépare. En particulier, la quantité, la nature des lipides et les conditions ioniques modifient la taille des liposomes. Nous avons ainsi remarqué que les liposomes neutres composés de 100%PC sont plus gros que les liposomes chargés positivement ou négativement composés de 90%PC+10%SA et 90%PC+10%AO respectivement. Il est donc quelques fois difficile de comparer quantitativement les résultats obtenus avec deux préparations de liposomes différents puisque leur taille n'est pas la même. De même, la taille des liposomes varie suivant que les liposomes aient été préparés avec du tampon D ou E. Là aussi l'alternative serait de séparer les liposomes selon leur taille, puis de les doser, mais nous venons de le dire, ces méthodes sont longues et entraînent de nombreuses incertitudes.

Il n'existe pas de techniques qui permettent de former de gros liposomes de taille uniforme et unilamellaires. Pour les études que nous avons entreprises, cette méthode de renversement de phase est celle qui nous a paru la meilleure. Signalons que de nouvelles techniques de préparations de liposomes viennent d'être publiées: la technique de déshydra-

tation-réhydratation (83) et de lyophilisation qui pourraient être une alternative intéressante pour ces études.

2) Techniques de turbidimétrie et de cosédimentation

Les interactions entre l'actine et les liposomes se traduisent souvent par la formation d'agrégats ce qui peut être quantifié par turbidimétrie et cosédimentation. Cependant les valeurs de turbidité sont fonction de la taille et du nombre d'agrégats formés ce qui n'est pas toujours proportionnel à l'intensité de l'interaction entre l'actine et les liposomes.

Il se pourrait que, dans certaines conditions, il y ait des interactions entre l'actine et les liposomes sans nécessairement qu'il ne se produise une agrégation des deux constituants. La formation d'agrégats est en effet dépendante de certaines conditions expérimentales. Ainsi dans leurs travaux Ostlund et al. (125), Oplatka et al., (124) et Howell et al. (71) ont étudié l'interaction entre l'actine-F et les granules de sécrétions ou d'autres types de vésicules membranaires. Ils ont montré par centrifugation que l'actine-F inhibait la sédimentation des granules. Ces expériences montrent bien qu'une interaction entre l'actine et des membranes ne conduit pas nécessairement à la formation d'agrégats et par conséquent à une hausse de turbidité. Aussi, il n'est pas impossible que certains phénomènes ou

certains aspects du phénomène soient passés inaperçus par cette technique.

3) Technique de microscopie électronique

La microscopie électronique est une méthode qui n'est pas quantitative mais qui permet de visualiser certains phénomènes. C'est ici une technique qui est donc complémentaire aux autres.

Elle comporte néanmoins certains problèmes qui lui sont propres. On peut se demander si les paracristaux formés à la surface des liposomes ne sont pas causés par la réaction entre l'actine et le colorant: l'acétate d'uranyl. Quoique peu probable puisque l'apparence "floconneux" observé dans les mélanges actine-liposomes montre bien la formation d'une structure entre l'actine et les liposomes, cette possibilité n'est cependant pas à écarter totalement et nous n'avons pas eu de moyen de le vérifier.

Nous avons montré par turbidimétrie et cosédimentation qu'il existe une interaction entre l'actine et les liposomes chargés négativement et neutres mais dont l'intensité est faible. Cette interaction est difficilement observable en microscopie électronique. Il se peut en effet, qu'à une des étapes de la coloration, soit au moment où l'on enlève les surplus de solution ou de colorant sur la grille, les

courants appliqués dissocient l'actine des liposomes. De plus l'utilisation d'ions uranium à forte concentration pourrait fort bien dissocier de faibles interactions électrostatiques.

Nos résultats laissent supposer que la forte interaction qui se produit entre l'actine et les liposomes chargés positivement est de nature électrostatique en raison du fait que les charges négatives de l'actine et positives des liposomes s'attirent et que cette interaction est inhibée par des ions qui probablement neutralisent les charges de l'actine et des liposomes. Cette hypothèse aurait été à confirmer par une expérience où l'actine serait chargée positivement, c'est-à-dire à un pH inférieur à son point isoélectrique, pour savoir avec quel type de liposomes cette actine aurait réagit. Mais à un pH inférieur à son pH_i, l'actine se dénature et précipite. Cette expérience n'est donc pas possible.

Nos résultats ont mis en évidence un phénomène intéressant et inattendu. L'actine en présence de liposomes chargés positivement s'organise, le plus souvent, de façon régulière à la surface des liposomes et forme des structures paracrystallines. Deux types de structures paracrystallines

ont été observées. Les structures de type de Hanson (alignement parallèle) et les structures en "filet". Ces deux types de structures peuvent être présentes dans une même préparation. Nous n'avons pas déterminé quelles conditions ou facteurs induisent un type plutôt qu'un autre.

Egelman et de Rosier (49) ont aussi formé des "filets" en présence d'excès de Mg^{2+} . Selon ces auteurs ainsi que d'autres (154, 157), ces structures en "filet" sont un état transitoire lors de la formation de paracristaux. C'est à notre avis ce qui pourrait se produire dans notre système, car souvent les deux types de structures cristallines coexistent dans une même préparation. La figure 42 illustre ce phénomène. A une extrémité du liposome on observe la disposition des filaments en "filet" et partout ailleurs on aperçoit les paracristaux de type de Hanson, ce qui suggère que les "filets" sont des structures de type de Hanson en formation.

Des structures semblables ont déjà été étudiées par Hanson (65), Kawamura (80), Harwell et al. (66) Yamamoto et al. (181), Spudich et Cooke (154) et Strzelecka-Golaszewska et al. (157) mais elles étaient formées en présence de fortes concentrations d'ions Mg^{2+} ou à pH acide. Par contre, nos paracristaux ont été obtenus à de faibles concentrations de cations divalents et à un pH neutre.

Selon Harwell et al.(66), il existe trois états conformationnels différents de l'actine: l'actine-G, l'actine-F et l'actine-P. Lorsque les monomères d'actine, après avoir formés des filaments parviennent à l'état conformationnel "P", ils s'organisent en paracristaux. Il se peut qu'un mécanisme semblable se produise dans notre système. Dans l'introduction, nous avons souligné que le phénomène de paracristallisation avait lieu lorsque des sites cationiques de très faibles affinités étaient comblés sur le monomère d'actine par des ions divalents. Dans notre cas, il se peut que les charges positives des liposomes réagissent avec ces sites de très faibles affinités de l'actine. Il s'en suivrait donc un changement de conformation de l'actine en P-actine et apparition de paracristaux d'actine mais seulement à la surface des liposomes.

Les paracristaux formés à la surface du liposome se disposent en monocouche et jusqu'à présent peu de chercheurs ont obtenu de telles structures en monocouches Smith (152) et Egelman et al.(49). On peut se demander comment, dans de telles monocouches, les filaments interagissent avec les liposomes. Engelmann et al.(49) soutiennent que les filaments composant un paracristal ne sont plus en hélice. On peut alors supposer que tous les monomères sont en contact avec les lipides mais dans ce cas, la périodicité du paracristal

disparaîtrait ce qui n'est pas le cas. Il se peut aussi que le filament reste en double hélice. Dans ce cas, seuls certains monomères sont en contact avec les lipides. Mais alors, est-ce que les monomères qui ne sont pas en contact avec la surface du liposome et dont le site anionique n'est pas neutralisé par la charge positive du liposome sont dans l'état conformationnel P ou F?

Une question reste à poser: est-ce que les charges positives des liposomes restent réparties régulièrement après interaction avec les filaments ou se répartissent-elles autour des filaments? On ne peut, à partir de nos résultats, répondre à cette question, mais il nous semble probable que l'interaction de l'actine avec les lipides doit entraîner une nouvelle répartition des lipides dans le liposome.

Nous avons mis en évidence une interaction directe entre l'actine et les lipides membranaires à l'aide d'un système in vitro. On peut se demander si un tel phénomène existe également in vivo et quel pourrait être son importance sur le plan biologique.

L'interaction directe entre l'actine et les lipides membranaires se produit surtout avec des lipides chargés positivement. Or, l'analyse de nombreuses membranes naturelles a montré qu'elles sont surtout composées de lipides

neutres ou chargés négativement. Ce type d'interaction est donc peu probable dans les cellules ou se trouve limité à des structures bien particulières.

Cependant, il se produit généralement une interaction entre les lipides chargés négativement et neutres et l'actine en présence de quantités millimolaires d'ions bivalents. De telles conditions peuvent prévaloir dans les cellules. En conséquence, l'existence d'une interaction actine-lipides est un phénomène à envisager in vivo.

Une telle interaction pourrait jouer deux rôles:

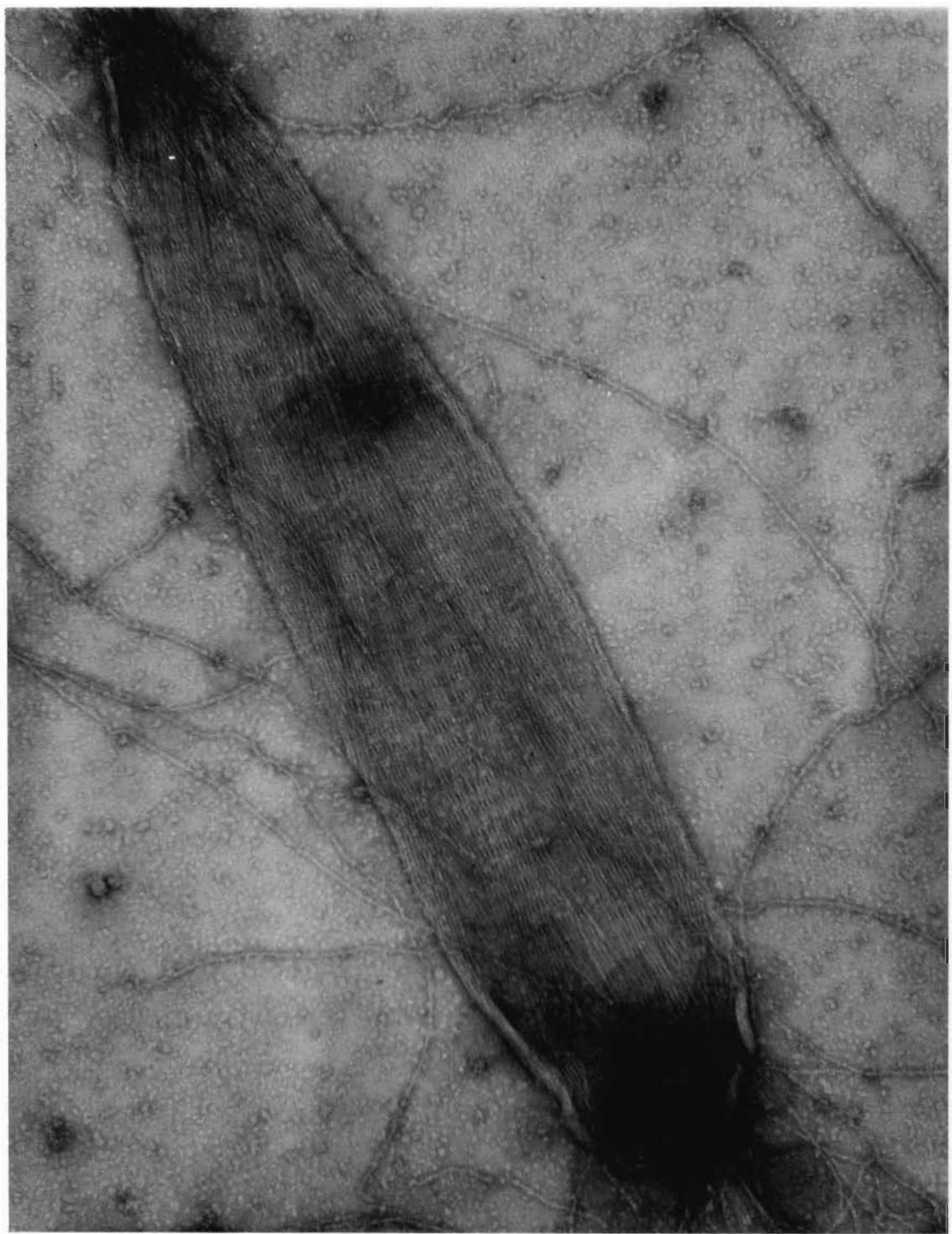
1)d'une part, l'attachement latéral de l'actine aux membranes doit augmenter la rigidité membranaire et donner aussi plus de résistance à ces membranes.

2)d'autre part, l'interaction entre l'actine et la membrane des organites cellulaires pourrait servir à maintenir les organites attachés au cytosquelette et contribuer ainsi à maintenir la structure de la cellule.

figure 42. Arrangements parallèle et en "filet" des filaments à la surface d'un liposome chargé positivement. L'organisation en "filet" des filaments est observée à la partie supérieure du liposome. Au milieu et à l'extrémité inférieure, des filaments sont parallèles.

Coloration à l'acétate d'uranyl 1%

Grossissement: 93000X



BIBLIOGRAPHIE

1. Allen, N.S. Endoplasmic filaments generate the motive force for rotational streaming in Nitella. J. Cell Biol., 1974, 63, 270-287.
2. Andrews, P.M.; Bates, S.B. Filamentous actin bundles in the kidney. The anatomical record, 1984, 210, 1-9.
3. Aunis, D.; Perrin, D. Chromaffin granule membrane-F-actin interactions and spectrin-like protein of subcellular organelles: A possible relationship. Neurochemistry, 1984, 42, 1558-1569.
4. Barany, M., Findelman, F., Theratril-Antony, T. Studies on the bound calcium. Arch. Biochem. Biophys., 1962, 98, 28-45.
5. Barber, B.H.; Crumpton, M.J. Actin associated with purified lymphocyte plasma membrane. FEBS letters, 1976, 66, 215-220.

6. Barden, J.A.; Wu, C.S.C.; Dos Remedios, C.G.D. Actin monomer conformation under polymerizing conditions studied by proton nuclear magnetic resonance and circular dichroism spectroscopy. Biochim. Biophys. Acta, 1983, 748, 230-235.
7. Begg, D.A.; Rodewald, R.; Rebhun. The visualization of actin filament polarity in thin sections. J. Cell Biol., 1978, 79, 846-852.
8. Berl, S.; Puszkin, S.; Nicklas, W.J. Actomyosin-like protein in brain. Science, 1973, 179, 441-446.
9. Black, M.M.; Kurdyla, J.T. Microtubule-associated proteins of neurons. J. Cell Biol., 1983, 97, 1020-1028.
10. Blest. A.D., de Couet, H.G. Actin in the basement membrane of the compound eye of a blowfly. Cell Tissue Res., 1983, 231, 325-336.
11. Blikstad, I., Carlsson, L. On the dynamics of the microfilament system in HeLa cells. J. Cell Biol., 1982, 93, 122-128.
12. Blitz, A.L.; Fine, R.E. Muscle-like contractile pro-

- teins and tubulin in synaptosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1974, 71, 4472-4476.
13. Boschek, C.B.; Jockusch, B.M.; Friis, R.R.; Back, R.; Grundmann, E.; Bauer, H. Early changes in the distribution and organization of microfilament proteins during cell transformation. Cell, 1981, 24, 175-184.
14. Boxer, L.A., Hedley-White, E.T., Stossel, T.P. Neutrophil actin dysfunction and abnormal neutrophil behavior. N. Engl. J. Med., 1974, 291, 1093-1099.
15. Bradley, M.O. Microfilament and cytoplasmic streaming: Inhibition of streaming by cytochalasin. J. Cell Sci 1973, 12, 327-334.
16. Bradley, R.H., Ireland, M., Maisel, H. The cytoskeleton of chick lens cells. Exp. Eye Res., 1979, 28, 441-453.
17. Branton, D.; Cohen, C.M.; Tyler, J. Interaction of cytoskeletal proteins on the human erythrocyte membrane. Cell, 1981, 24, 24-32.
18. Bray, D., Thomas, C. Unpolymerized actin in fibro-

- blasts and brain. J. Mol. Biol., 1976, 105, 527-544.
19. Bray, D.; Thomas, C. Unpolymerized actin in tissue cells. In: Cell Motility. Goldman, R., Pollard, T., and Rosenbaum, J., eds. Cold Spring Harbor, N.Y., 1976, 461-473.
20. Bretscher, A. Molecular architecture of the microvillus cytoskeleton: In: Brush border membranes. Pitman books Ltd, London (Ciba Foundation symposium 95), 1983, 164-179.
21. Burn, P.; Rotman, A.; Meyer, R.K.; Burger, M.M. Diacylglycerol in large α -actinin actin complex and in the cytoskeleton of activated platelets. Nature, 1985, 314, 469-472.
22. Burridge, K.; McCullough, L. The association of α -actinin with the plasma membrane. J. Supramol. Struct., 1980, 13, 53-65.
23. Burridge, K.; Kelly, T.; Connell, I. Proteins involved in the attachment of actin to the plasma membrane. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., 1982, 299, 291-299.

24. Burridge, K.; Kelly, T.; Mangeat, P. Nonerythrocyte spectrins: Actin-membrane attachment proteins occurring in many cell types. J. Cell Biol., 1982, 95, 478-486.
25. Burridge, K., Phillips, J.H. Association of actin and myosin with secretory granule membranes. Nature, 1975, 254, 526-529.
26. Caron, J.M.; Berlin, R.D. Interaction of microtubule proteins with phospholipid vesicles. J. Cell Biol., 1979, 81, 665-671.
27. Chang, C.M.; 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.
28. Clark, S.E.; Moss, D.J.; Bray, D. Actin polymerization and synthesis in cultured neurons. Exp. Cell Res., 1983, 147, 303-314.
29. Clarke, M. Isolation and characterization of a water-soluble protein from bovine erythrocyte membranes. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1971, 45, 1063-1071.

30. Clarke, M.; Schatten, G.; Mazia, D.; Spudich, J.A. Visualization of actin fibers associated with the cell membrane in amoebae of Dictyostelium discoideum. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1975, 72, 1758-1762.
31. Cohen, C.M.; Jackson, P.L.; Branton, D. Actin-membrane interactions: Association of G-actin with the red cell membrane. J. Supramol. Struct., 1978, 9, 113-124.
32. Cohen, C.M.; Langley, R.C.jr. Functional characterization of human erythrocyte spectrin α and β chains: Association with actin and erythrocyte protein 4.1. Biochemistry, 1984, 23, 4488-4495.
33. Cohen, C.M.; Tyler, J.M., Branton, D. Spectrin-actin associations studied by electron microscopy of shadowed preparations. Cell, 1980, 21, 875-883.
34. Collins, J.H.; Borysenko, C.W. The 100,000-dalton actin- and calmodulin- binding protein from intestinal brush border is a myosin-like ATPase. J. Biol. Chem., 1984, 22, 4128-4135.
35. Comley, L.T. Microfilaments in Chaos carolinensis. Membrane association, distribution, and heavy meromyosin binding in the glycerinated cells. J. Cell Biol.,

1973, 58, 230-237.

36. Condeelis, J.S. Reciprocal interactions between the actin lattice and cell membrane. Neurosciences Res. Prog. Bull., 1981, 19, 83-101.
37. Condeelis, J.S. The identification of F-actin in the pollen tube and protoplast of Amaryllis belladonna. Exp. Cell Res., 1974, 88, 435-439.
38. Condeelis, J.S.; 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.
39. Cooke, R. The role of the bound nucleotide in the polymerization of actin. Biochemistry, 1975, 14, 3250-3256.
40. Cox, G. Juniper, B.E. High-voltage electron microscopy of whole, critical point dried plant cells-fine cytoskeletal elements in the moss Bryum tenuisetum, Protoplasma, 1983, 115, 70-80.
41. Davies, G.E. Association of actin with the platelet membrane. Biochim. Biophys. Acta., 1984, 772,

149-160.

42. De Couet, H.G.; Stowe, S.; Blest, A.D. Membrane associated actin in the rhabdomeral microvilli of crayfish photoreceptors. J. Cell Biol., 1984, 98, 834-846.
43. Deelers, M.; Guilmin, T.; Laduron, C.; Ruysschaert, J.M. Physicochemical properties of phosphatidylcholine liposomes containing stearylamine. J. Colloid interface Sci., 1982, 90, 229-232.
44. Del Vecchio, P.J.; Mac Elroy, K.S.; Rosser, M.P.; Church, R.L. Association of α -crystallin with actin in cultured lens cells. Current Eye Res., 1984, 3, 1213-1219.
45. De Rosier, D.J.; Tilney, L.G. The form and function of actin:a product of its unique design. Cell and muscle motility, 1984, 5, 139-169.
46. De Rosier, D.; Mandelkow, E.; Silliman, A. Structure of actin-containing filaments from two types of non-muscle cells. J. Mol. Biol., 1977, 113, 679-695.
47. Dos Remedios, C.G.; Dickens, M.J. Actin microscryystals and tubes formed in the presence of gadolinium ions.

- Nature, 1978, 276, 731-733.
48. Eaton, J.W. The red cell: A primer. In: Erythrocyte membranes : Recent Clinical and experimental Advances. Alan R. Liss, Inc. N.Y. p. 1-4.
49. Egelman, E.H.; De Rosier, D.J. Structural studies of F-actin. Actin: structure and function in muscle and non-muscle cells, 1983, 17-24.
50. Eckert, B.S.; McGee-Russel, S.M. The patterned organization of thick and thin microfilaments in the contracting pseudopod of Diffugia. J. Cell Sci. 1973, 13, 727-739.
51. Fine, R.E.; Bray, D. Actin in growing nerve cells. Nature, 1971, 234, 115-118.
52. Fisher, A.J.; Curmi, P.M.G.; Barden, J.A.; 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.
53. Forer, A. Does actin produce the force that moves a chromosome to the pole during anaphase? Can. J.

- Biochem. and Cell Biol., 1985, 63, 585-598.
54. Forer, A.; Behnke, O. An actin-like component in sperm tails of a cranefly (Nephrotoma suturalis LOEW). J. Cell Sci., 1972, 11, 491-519.
55. Fowler, V.; Luna, E.J.; Hargreaves, W.R.; Taylor, D.L.; Branton, D. Spectrin promotes the association of F-actin with the cytoplasmic surface of the human erythrocyte membrane. J. Cell Biol., 1981, 88, 388-395.
56. Geiger, B. Membrane-cytoskeleton interaction. Biochim. Biophys. Acta, 1983, 737, 305-341.
57. Geiger, B. A 130K protein from chicken gizzard: Its localization at the termini of microfilament bundles in cultured chicken cells. Cell, 1979, 18, 193-205.
58. Glenney, J.R.jr; Osborn, M.; Weber, K. The intracellular localization of the microvillus 110K protein, a component considered to be involved in side-on membrane attachment of F-actin, Exp. Cell Res., 1982, 138, 199-205.
59. Goldman, R.D.; Yerxa, M.J.; Schloss, J.A. Localization and organization of microfilaments and related proteins

- in normal and virus-transformed cells. J. Supramol. Struct. 1976, 5, 155-183.
60. Goodman, S.R.; Zagon, I.S.; Kulikowski, R.R. Identification of a spectrin-like protein in nonerythroid cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1981, 78, 7570-7574.
61. Gordon, D.J.; Boyer, J.L.; Korn, E.D. Comparative biochemistry of non-muscle actins. J. Biol. Chem., 1977, 252, B300-B309.
62. Gruenstein, E. Membrane associated actin decrease following the transformation of chick embryo fibroblasts. Biophys. J., 1975, 15, 160.
63. Gruenstein, E.; Rich, A.; Weihing, R.R. Actin associated with plasma membranes from 3T3 and HeLa cells. J. Cell Biol., 1975, 64, 223-234.
64. Haest, C.W. Interactions between membrane skeleton proteins and the intrinsic domain of the erythrocyte membrane. Biochim. Biophys. Acta, 1982, 694, 331-352.
65. Hanson, J. Abstr. 7th Int. Cong. Biochem. Tokyo 1976, II-327; Sym. Biol. Hung., 8, 99 (1967).

66. Harwell, O.D.; Sweeney, M.L.; Kirkpatrick, F.H. Conformation changes of actin during formation of filaments and paracrystals and upon interaction with DNase I, Cytochalasin B, and Phalloidin. J. Biol. Chem., 1980, 255, 1210-1220.
67. Heacock, C.S.; 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.
68. Hegyi, G.; Venyaminov, S.Y. Absence of gross changes in the secondary structure of actin at G-F transition. FEBS letters, 1980, 109, 134-136.
69. Hirokawa, N.; Tilney, L.G. Interactions between actin filaments and between actin filaments and membranes in quick-frozen and deeply etched hair cells of the chick ear. J. Cell Biol., 1982, 95, 249-261.
70. Howe, C.L.; Mooseker, M.S. Characterization of the 110-kdalton actin-, calmodulin-, and membrane-binding protein from microvilli of intestinal epithelial cells. J. Cell Biol., 1983, 97, 974-985.
71. Howell, S.L.; Tyhurst, M. Actomyosin interactions with

- insulin-storage granules in vitro. Biochem. J., 1982, 206, 157-160.
72. Ireland, M.; Lieska, N. Maisel, H. Lens actin: Purification and localization. Exp. Cell Res., 1983, 37, 393-408.
73. Isenberg, G.; Leonard, K.; Jockusch, B.M. Structural aspects of vinculin-actin interactions. J. Mol. Biol., 1982, 158, 231-249.
74. Jacobson, B.S. Actin binding to the cytoplasmic surface of the plasma membrane isolated from Dictyostelium discoideum. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1980, 97, 1493-1498.
75. Jeon, K.W.; Jeon, M.S. Cytoplasmic filaments and cellular wound healing in Amoeba proteus, J. Cell Biol., 1975, 67, 243-249.
76. Jockusch, B.M.; Isenberg, G. Vinculin and α -actinin: Interaction with actin and effect on microfilament network formation. Cold Spring Harbor Symposia on quantitative biology, 1981, 46, 613-623.
77. Joniau, M.; De Cuyper, M. Tubulin interaction with

- phospholipid vesicles measured by free-flow electro-phoresis: role of microtubule-associated proteins and polyamines. Colloids and Surfaces, 1984, 10, 233-238.
78. Kane, R.E. Actin polymerization and interaction with other proteins in temperature-induced gelation of sea urchin egg extracts. J. Cell Biol., 1976, 71, 704-714.
79. Kane, R.E. Preparation and purification of polymerized actin from sea urchin egg extracts. J. Cell Biol., 1975, 66, 305-315.
80. Kawamura, M.; Maruyama, K. Polymorphism of F-actin. I. Three forms of paracrystals. J. Biochem., 1970, 68, 885-899.
81. Kelly, W.G.; Passaniti, A.; Woods, J.W. Daisse, J.L.; Roth, T.F. Tubulin as a molecular component of coated vesicles. J. Cell Biol., 1983, 97, 1191-1199.
82. Kibbelaar, M.A.; Seltten-Versteegen, A.E.; Bloemendaal, H.; Dunia, I.; Benedetti, E.L. Actin in mammalian lens. Eur. J. Biochem., 1979, 95, 543-549.
83. Kirby, C.; Gregoriadis, G. Dehydration-rehydration

- vesicles: A simple method for high yield drug entrapment in liposomes. Bio-technology, 1984, 2, 979-984.
84. Klauser, R.D.; Kumar, N. Weinstein, J.N.; Blumenthal, R.; Flavin, M. Interaction of tubulin with phospholipid vesicles. I. Association with vesicles at the phase transition. J. Biol. Chem., 1981, 256, 5879-5885.
85. Klauser, R.D.; Kumar, N.; Weinstein, J.N.; Blumenthal, R.; Flavin, M. Interaction of tubulin with phospholipid vesicles. II. Physical changes of the protein. J. Biol. Chem., 1981, 256, 5886-5889.
86. Korn, E.D. Actin polymerization and its regulation by proteins from non-muscle cells. Physiol. Rev., 1982, 62, 672-737.
87. Korn, E.D.; Wright, P.L. Macromolecular composition of an Amoeba plasma membrane. J. Biol. Chem., 1973, 248, 439-447.
88. Kremer, J.M.H.; Esker, M.W.F.; Pathmamanohanan, C. Wiersema, P.H. Vesicles of variable diameter prepared by a modified injection method. Biochemistry, 1977,

16, 3932-3935.

89. Kumar, N.; Blumenthal, R.; Henkart, M. Weinstein, J.N.; Klausner, R.D. Aggregation and calcium-induced fusion of phosphatidylcholine vesicle-tubulin complexes. J. Biol. Chem., 1982, 257, 15137-15144.
90. Kuroda, K. Cytoplasmic streaming in characean cells cut open by microsurgery. Proceedings of the Japan Academy, 1983, 59, 126-130.
91. Lehrer, S.S.; Derwar, G. Intrinsic fluorescence of actin. Biochemistry, 1972, 11, 1211-1216.
92. Letourneau, P.C. Differences in the organisation of actin in the growth cones compared with the neurites of cultured neurons from chick embryos. J. Cell Biol., 1983, 97, 963-973.
93. Levine, J.; Willard, M. Fodrin: Axonally transported polypeptides associated with the internal periphery of many cells J. Cell Biol., 1981, 90, 631-643.
94. Luna, E.J.; Fowler, V.M.; Swanson, J.; Branton, D. Taylor, D.L. A membrane cytoskeleton from Dictyostelium discoideum. I. Identification and

partial characterization of an actin-binding activity.

J. Cell Biol. 1981, 88, 396-409.

95. Luna, E.J.; Goodloe-Holland, C.M.; Ingalls, H.M. A membrane cytoskeleton from Dictyostelium discoideum. II. Integral proteins mediate the binding of plasma membranes to F-actin affinity beads. J. Cell Biol., 1984, 99, 71-78.
96. Mabuchi, I.; Hamaguchi, Y.; Kobayashi, T.; Hosoya, H.; Tsukita, S.; Tsukita, S. Alpha-actinin from sea urchin eggs: Biochemical properties interaction with actin, and distribution in the cell during fertilization and cleavage. J. Cell Biol., 1985, 100, 375-383.
97. Mabuchi, I.; Spudich, J.A. Purification and properties of soluble actin from sea urchin eggs. J. Biochem., 1980, 87, 785-802.
98. Mac Donald, R.I.; Oku, N.; Mac Donald, R.C. Liposome formation, re-visited. Liposome letters, 1983, 63-72.
99. MacLean-Fletcher, S.; Pollard T.D. Mechanism of action of cytochalasin B on actin. Cell, 1980, 20, 329-341.

100. Mangeat, P.; Burridge, K. Actin-membrane interaction in fibroblasts: What proteins are involved in this association? J. Cell Biol., 1984, 99, 95-103.
101. Marchant, H.J. The establishment and maintenance of plant cell shape by microtubules. In: Cytoskeleton in plant growth and development. Pub: Academic Press, London, pp. 295-319.
102. Martonosi, A.; Molino, C.M.; Gergely, J. The binding of divalent cations to actin. J. Biol. Chem., 1964, 239, 1057-1064.
103. Masaki, T.; Kuroda, M.; Endo, T. Potentiel role for α -actinin and eu-actinin during Z-line assembly in differentiating muscle. Expl. Biol. Med., 1984, 9, 148-154.
104. Mayhew, E.; Chandonnet, S.; King, J.; Lazo, R.; Nidolopoulus, G.; Siciliano, A.; Vail, W.J. A high pressure continuous flow system for drug entrapment in liposomes. Communication personnelle.
105. McNutt, N.S. A thin-section and freeze fracture study of microfilament-membrane attachments in choroid plexus and intestinal microvilli. J. Cell Biol., 1978, 79,

774-787.

106. Mehradian, M.; Bame, K.J.; Rome, L.H. Interaction of rat liver lysosomal membranes with actin. J. Cell Biol., 1984, 99, 680-685.
107. Mesland, D.A.M.; Spielle, H.; Roos, E. Membrane associated cytoskeleton and coated vesicles in cultured hepatocytes visualized by dry cleaving. Exp. Cell Res., 1981, 132, 169-184.
108. Meyer, D.I.; Burger, M.M. The chromaffin granule surface: the presence of actin and the nature of its interaction with the membrane. FEBS letters, 1976, 101, 129-133.
109. Meyer, R.K.; Schindler, H.; Burger, M.M. Alpha-actinin interacts specifically with model membranes containing glycerides and fatty acids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1982, 79, 4280-4284.
110. Miki-Noumura, T.; Oosawa, R. An actin-like protein of the sea urchin egg. I. Its interaction with myosin from rabbit striated muscle. Exp. Cell Res., 1969, 56, 224-232.

111. Moore, P.L.; Bank, H.L.; Brissie, N.T.; Spicer, S.S. Association of microfilament bundles with lysosomes in polymorphonuclear leucocytes. J. Cell Biol., 1976, 71, 659-666.
112. Moore, P.B.; Ownby, C.; Carraway, K.L. Interactions of cytoskeletal elements with the plasma membrane of sarcoma 180 ascites tumor cells. Exp. Cell Res., 1978, 115, 331-342.
113. Mooseker, M.S.; 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.
114. Morii, M.; Abu-Zaid, S.S.; Takeguchi, N. Size and permeability of liposomes extruded through polycarbonate membranes. International Journal of pharmaceutics, 1983, 17, 215-224.
115. Mukherjee, T.M.; Staehelin, L.A. The fine structural organization of the brush border of intestinal epithelial cells, J. Cell Sci., 1971, 8, 573-599.
116. Murray, R.L.; 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.
117. Nachmias, V.T.; Huxley, H.E.; Kessler, D. Electron microscope observations on actomyosin and actin preparations from Physarum polycephalum and on their interaction with heavy meromyosin subfragment I from muscle myosin, *J. Mol. Biol.*, 1970, 50, 83-90.
118. Needham, D.M. Machina Carnis. Cambridge University Press eds., N.Y., 1971, 782p.
119. Neuhaus, J.M.; Wanger, M.; Keiser, T.; Wegner, A. Treadmilling of actin. *J. Muscle Res. and Cell Motility*, 1983, 4, 507-527.
120. Nonomura, Y.; Katayama, E.; Ebashi, S. Effect of phosphates on the structure of the actin filament *J. Biochem. (Tokyo)*, 1975, 78, 1101-1104.
121. Ohsawa, T.; Muira, H.; Harada, K. A novel method for preparing liposome with a high capacity to encapsulate proteinous drugs: Freeze-drying method. *Chem. Pharm. Bull.*, 1984, 32, 2442-2445.

122. Okamoto, Y.; Komatsu, I.; Kinjo, E. Sekine, T. Actin and actin-associated proteins of rabbit liver cell. J. Biochem., 1983, 94, 645-653.
123. Olson, F.; Hunt, C.A.; Szoka, F.C.; Vail, W.J.; Papahadjopoulos, D. Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. Biochim. Biophys. Acta., 1979, 557, 9-23.
124. Oplatka, A.; Borejo, J.; Gadasi, H.; Muhlrad, A. Inhibition of normal and transformed fibroblast aggregation by skeletal muscle F-actin. FEBS-letters, 1976, 2, 267-269.
125. Ostlund, R.E.; Joyce, T.L.; Kipnis, D.M. Muscle actin filament bind pituitary secretory granules in vitro. J. Cell Biol., 1977, 73, 78-87.
126. Palek, J.; Liu, S.C. Altered red cell cytoskeletal protein association leading to membrane instability. The Red Cell:5th Ann. Arbor conference. 1981, 385-402.
127. Palek, J.; Shih, C.L. Alterations of spectrin assembly in the red cell membrane: functional consequences. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1981, 41, 131-138.

128. Palevitz, B.A.; Ash, J.F.; Hepler, P.K. Actin in the green alga Nitella, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1974, 71, 363-366.
129. Palevitz, B.A.; Hepler, P.K. Identification of actin in situ at the ectoplasm-endoplasm interface of Nitella. J. Cell Biol., 1975, 65, 29-38.
130. Pardee, J.D.; Spudich, J.A. Mechanism of K⁺-induced actin assembly. J. Cell Biol., 1982, 93, 648-654.
131. Parthasarathy, M.V.; Muhlethaler, K. Cytoplasmic filaments in plant cells. J. Ultrastruct. Res., 1972, 38, 46-62.
132. Philippot, J.; Mutaftschiev, S.; Liautard, J.P. A very mild method allowing the encapsulation of very high amounts of macromolecules into very large (1000 nm) unilamellar liposomes. Biochim. Biophys. Acta, 1983, 734, 137-143.
133. Pinder, J.C.; Ohanian, V.; Gratzer, W.B. Spectrin and protein 4.1 as an actin filament capping complex. FEBS letters, 1984, 169, 161-164.

134. Pollard, T.D. A falling ball apparatus to measure filament cross-linking. In Methods in Cell Biology, Vol. 24A, 1982, pp. 301-311.
135. Pollard, T.D.; Korn, E.D. Electron microscope identification of actin associated with isolated amoeba plasma membranes. J. Biol. Chem., 1973, 248, 448-450.
136. Pollard, T.D.; Shelton, E.; Weihing, R.R.; Korn, E.D. Ultrastructural characterization of F-actin isolated from Acanthamoeba castellanii and identification of cytoplasmic filaments as F-actin by reaction with rabbit heavy meromyosin. J. Mol. Biol., 1970, 50, 91-97.
137. Puisieux, F. Les liposomes, Ann. Pharmaceutiques françaises, 1983, 41, 3-13.
138. Puszkin, S.; Berl, S. Actomyosin-like protein from brain. Separation and characterization of the actin-like component. Biochim. Biophys. Acta, 1972, 256, 695-709.
139. Puszkin, S.; Nicklas, W.J.; Berl, S.; Actomyosin-like protein in brain: Subcellular distribution. J. Neurochem., 1972, 19, 1319-1333.

140. Rogalski, A.A.; Singer, S.J. An integral glycoprotein associated with the membrane attachment sites of actin microfilaments. J. Cell Biol., 1985, 101, 785-801.
141. Rohman, A. Receptor and non-receptor-mediated activation of blood platelets. Effect on membrane-cytoskeleton interaction. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1984, 120, 898-906.
142. Rouyarenc, J.F.; Travers, F. The first step in the polymerization of actin. Eur. J. Biochem., 1981, 116, 73-77.
143. Roustan, C.; Benyamin, Y.; Boyer, M.; Bertrand, R. Audemard, E.; Jauregui-Adell, J. Conformational changes induced by Mg^{2+} on actin monomers. FEBS-letters, 1985, 181, 119-123.
144. Saibil, H.R. Actin in squid retinal photoreceptors. J. Physiol., 1978, 28, P17.
145. Schollmeyer, J.V.; Goll, D.E.; Tilney, L.; Mooseker, M.; Robson, R.; Stromer, M. Localization of α -actinin in non-muscle material. J. Cell Biol., 1974, 63, 304a. (abstr.)

146. Schroeder, T.E. Actin in dividing cells: Contractile ring filaments bind heavy meromyosin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1973, 70, 1688-1692.
147. Sheetz, M.P.; Painter, R.G.; 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.
148. Singer, S.J. The molecular organization of membranes. Ann. Rev. Biochem., 1974, 43, 805-833.
149. Small, J.V.; Celis, J.E. Filaments arrangements in negatively stained cultured cells: The organization of actin. Cytobiology, 1978, 16, 308-325.
150. Small, J.V.; Isenberg, G.; Celis, J.E. Polarity of actin at the leading edge of cultured cells. Nature, 1978, 272, 638-639.
151. Small, J.V. Geometry of actin-membrane attachments in the smooth muscle cell: The localisations of vinculin and α -actinin. EMBO J., 1985, 4, 45-49.
152. Smith, P.R. Towards an alignment of the actin molecule

- within the actin filament. Ultramicroscopy, 1984, 13, 113-123.
153. Spudich, J.A. Biochemical and structural studies of actomyosin-like proteins from non-muscle cells. II. Purification, properties, and membrane association of actin from amoebae of Dictyostelium discoideum. J. Biol. Chem., 1974, 249, 6013-6020.
154. Spudich, J.A.; Cooke, R.. Supramolecular forms of actin from amoebae of Dictyostelium discoideum, J. Biol. Chem., 1975, 250, 7485-7491.
155. Spudich, J.A.; Watt, S. The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. J. Biol. Chem., 1971, 246, 4866-4871.
156. Strzelecka-Golaszewska, H.; Prochniewick, E.; Drabikowski, W. Interaction of actin with divalent cations. 1. The effect of various cations on the physical state of actin. Eur. J. Biochem., 1978, 88, 219-227.
157. Strzelecka-Golaszewska, H.; Prochniewick, E.;

- Drabikowski, W. Interaction of actin with divalent cations. Characterization of protein-metal complexes. Eur. J. Biochem., 1978, 88, 229-237.
158. Szoka, F. Papahadjopoulos, D. Procedures for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse phase evaporation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1978, 75, 4194-4198.
159. Taylor, D.L.; Condeelis, J.S.; Moore, P.L.; Allen, R.D. The contractile basis of amoeboid movement. J. Cell Biol., 1973, 59, 378-394.
160. Taylor, D.G.; Williams, V.M.; Crawford, N. Platelet membrane actin: solubility and binding studies with ¹²⁵I-labelled actin. Biochem. Soc. Trans., 1976, 4, 156-160.
161. Tilney, L.G. The polymerization of actin. II. How non-filamentous actin becomes nonrandomly distributed in sperms: evidence for the association of this actin with membranes. J. Cell Biol., 1976, 69, 51-72.
162. Tilney, L.G. Actin filaments in the acrosomal reaction of Limulus sperm motion generated by alterations in the packing of filaments. J. Cell Biol., 1975, 64,

289-310.

163. Tilney, L.G.; Detmers, P. Actin in erythrocytes ghosts and its association with spectrin. J. Cell Biol., 1975, 66, 508-520.
164. Tilney, L.G.; Jaffe, L.A. Actin, microvilli, and the fertilization cone of sea urchin eggs. J. Cell Biol., 1980, 87, 771-782.
165. Tilney, L.G.; Mooseker, M.S. Actin filament-membrane attachment: Are membrane particles involved? J. Cell Biol., 1976, 71, 402-416.
166. Traas, J.A. Visualization of the membrane bound cytoskeleton and coated pits of plant cells by means of dry cleaving. Protoplasma, 1984, 119, 212-218.
167. Trifaro, J.M.; Bader, M.F.; Doucet, J.P. Chromaffin cell cytoskeleton: its possible role in secretion. Can. Biochem. and Cell Biol., 1985, 63, 661-679.
168. Tsukita, S.; Tsukita, S.; Ishikawa, H. Sato, S. Nakao, M. Electron microscopic study of reassociation of spectrin and actin with the human erythrocyte membrane. J. Cell Biol., 1981, 90, 70-77.

169. Tsilibary, E.C.; Williams, M.C. Actin in peripheral rat lung: S-1 labeling and structural changes induced by cytochalasin. J. Histochem. Cytochem., 1983, 31, 1289-1297.
170. Tsilibary, E.C.; Williams, M.C. Actin and secretion of surfactant. J. Histochem. Cytochem., 1983, 31, 1298-1304.
171. Uyemura, D.G.; Brown, S.S.; Spudich, J.A. Biochemical and structural characterization of actin from Dictyostelium discoideum. J. Biol. Chem., 1978, 253, 9088-9096.
172. Vandekerckhove, J.; Weber, K. Actin amino acid sequences. Comparaison 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.
173. Vandekerckhove, J.; 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.
174. Walker, J.H.; Boustead, C.M.; Witzemann, V. The 43-K

- protein, 1, associated with acetylcholine receptor containing membrane fragments is an actin-binding protein. EMBO J., 1984, 3, 2287-2290.
175. 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.
176. Weidenmann, B.; Mimms, L.T. Tubulin is a major protein constituent of bovine brain coated vesicles. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1983, 115, 303-311.
177. Weihing, R.R.; Korn, E.D. Acanthamoeba actin; composition of the peptide that contains 3-methylhistidine and a peptide that contains -N-methyllysine. Biochemistry, 1972, 11, 1538-1543.
178. Weissmann, G.; Claiborne, R. In: Cell membranes: Biochemistry, Cell Biology and Pathology, G. Weissman and Robert Clairbrone eds. N.Y., 1975, 283p.
179. Wickus, G.; Gruenstein, E.; Robbins, P.W.; Rich, A. Decrease in membrane-associated actin of fibroblasts after transformation by Rous sarcoma virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1975, 72, 746-749.

180. Wohlman, A; Allen, R.D. Structural organization associated with pseudopod extension and contraction during cell locomotion in Diffugia. J. Cell Sci., 1968, 3, 105-114.
181. Yamamoto, K. Yanagida, M. Dawamura, M. Maruyama, K. Noda, H. A study on the structure of paracrystals of F-actin. J. Mol. Biol., 1975, 91, 463-469.
182. Yu, J.; Branton, D. Reconstitution of intramembrane particles in recombinants of erythrocyte protein band 3 and lipid: Effects of spectrin-actin association. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1976, 73, 3891-3895.