

UNIVERSITE DU QUEBEC

MEMOIRE PRESENTE A

UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAITRISE ES SCIENCES EN BIOPHYSIQUE

PAR

JEAN-MARC POLLENDER

EFFET DES MEMBRANES PLASMIQUES DE FOIE

SUR L'ACTINE

SEPTEMBRE 1983

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.

"Les vrais philosophes, qui ne recherchent que la vérité et la connaissance, ne se considèrent jamais suffisamment informés pour ne pas accueillir des informations complémentaires de qui que ce soit et de quelque source que ce soit; pas plus qu'ils ne sont étroits d'esprit au point d'imaginer qu'un art ou une science qui nous ait été transmis par les anciens soit dans un tel état d'avancement ou de finalité que l'ingéniosité et le travail des autres ne puisse plus rien y ajouter. Au contraire, beaucoup soutiennent que tout ce que nous savons demeure une parcelle infinitésimale à côté de ce qui reste à connaître."

William Harvey (1628)

RESUME

L'actine-G (globulaire) est une protéine contractile dont la présence est déjà fermement établie dans les cellules non musculaires. Cette protéine possède en outre la faculté de polymériser en un double filament hélicoïdal (actine-F). Malgré le fait que plusieurs auteurs aient démontré, par différentes techniques microscopiques, une juxtaposition des microfilaments d'actine auprès des membranes plasmiques --suggérant ainsi une association probablement essentielle pour divers types de mouvements cellulaires-- il n'existe que peu de données biochimiques relatives aux interactions actine-membrane. En fait, la nature exacte des interactions de l'actine avec les autres composants cellulaires, de même que son rôle dans les phénomènes motiles non musculaires, ne sont pas très bien définis. De plus, une grande partie de l'actine cytoplasmique demeure sous forme monomérique malgré les conditions ioniques favorisant essentiellement sa forme F in vitro, ce qui suppose un important mécanisme de régulation cellulaire des deux différentes formes.

A la lumière de ces faits, nous avons décidé d'étudier directement l'effet des membranes plasmiques sur l'actine-G et-F des muscles squelettiques --l'utilisation du foie comme la source de nos membranes nous est apparue idéale puisque ce tissu contient principalement des hépatocytes, cellule hautement spécialisée dans les processus de sécrétion.

Nos résultats nous apportent des évidences concluantes concernant

l'effet d'inactivation de notre fraction enrichie de membranes plasmiques de foie (de rat ou de lapin) sur l'actine quant à ses propriétés de polymérisation et d'inactivation de la DNASE I pancréatique. Même si la nature exacte de l'action des membranes sur l'actine demeure difficile à cerner, l'utilisation d'un témoin approprié nous a néanmoins permis d'éliminer la possibilité d'une phosphorylation de l'actine-G ou -F par nos membranes. Ces derniers résultats sont par ailleurs en contradiction avec ceux présentés par Grazi et Magri (55) qui font état de la perte de polymérisabilité et de l'inhibition de la DNase par l'actine-G en présence de membranes plasmiques survenant suite à la phosphorylation de l'actine-G par les membranes. A cet effet, nous croyons que la phosphorylation de l'actine telle que décrite par ces auteurs représente un artefact et qu'elle peut être expliquée par la très forte concentration de membranes qu'ils ont utilisée pour leurs expériences. Les modifications des propriétés de l'actine qu'ils décrivent sont en fait imputables à la présence de NPases membranaires qui détruisent entièrement les nucléotides libres du milieu réactionnel et causent par le fait même la dénaturation irréversible de l'actine.

Nos études nous ont finalement permis de constater la co-centrifugation de l'actine-F avec les membranes, de même que la gélification de l'actine, en leur présence, ce qui permet d'obtenir une nouvelle évidence d'un lien direct de l'actine-F aux membranes.

REMERCIEMENTS

Je ne saurais présenter ce mémoire sans avoir d'abord remercié toutes les personnes qui ont pu d'une façon ou d'une autre m'apporter leur aide tout au long de l'élaboration de mon projet de recherche.

Tout d'abord, je tiens à remercier particulièrement mon directeur de thèse, le Dr Julian Gruda, pour son enseignement et sa grande disponibilité, le Dr Hélène-Marie Thérien pour sa collaboration et ses nombreux conseils de même que Mme Diane Bégin pour son excellente aide technique.

Je remercie également le Dr Guy Brisson et son assistante Mme Denise Lacroix-Sylvestre sans qui il m'aurait été difficile de réaliser toute la partie expérimentale de mon travail touchant les mesures de radioactivité.

Je me dois de remercier aussi mon actuel employeur le Dr Gordon Fisher du Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke pour sa compréhension et sa participation financière lors de la rédaction de la dernière partie de ce rapport. Sans lui, il m'aurait été impossible de terminer ce travail dans les délais requis.

Finalement, je tiens à remercier mon épouse, Andrée Turcotte pour son appui ses encouragements et sa grande patience,

TABLE DES MATIERES

	Page
RESUME	iii
REMERCIEMENTS	v
TABLE DES MATIERES	vi
LISTE DES TABLEAUX	xi
LISTE DES FIGURES	xiii
CHAPITRES	
CHAPITRE I	
1. Introduction	1
1.1 L'actine; propriétés physico-chimiques	3
1.2 Importance de l'actine dans les mécanismes de motilité	5
1.2.1 Contraction musculaire; mécanismes de régulation ...	6
1.2.2 Phénomènes motiles non musculaires	8
1.2.2.1 Interaction actine-myosine, génération de force	9
1.2.2.2 Autres protéines impliquées	12
1.2.3 Régulation de la polymérisation cytoplasmique de l'actine	15
1.2.3.1 DNase I	16
1.2.3.2 Profilin	18

	Page
1.2.4 Interaction de l'actine avec les membranes biologiques	19
1.2.5 Phosphorylation de l'actine: mécanisme de contrôle?	21
1.2.5.1 Phosphorylation de l'actine	21
1.2.5.2 Possibilité d'un mécanisme de contrôle	24
1.3 Objectif initial du présent travail	27
 CHAPITRE II	
2. Matériel et méthodes	
2.1 Produits chimiques et abréviations	30
2.2 Préparation de l'actine	32
2.2.1 Préparation de la poudre acétonique	32
2.2.1.1 Méthode I	32
2.2.1.2 Méthode II	35
2.2.2 Préparation de l'actine à partir de poudre acétonique	35
2.3 Préparation des membranes cytoplasmiques d'hépatocytes	37
2.4 Détermination de la concentration des protéines	42
2.4.1 Méthode de Biuret	42
2.4.2 Méthode du Bio-Rad	42
2.4.3 Dosage de la concentration des protéines membranaires (Méthode Folin-Lowrey)	43
2.4.4 Dosage spectrophotométrique	44

	Page
2.5 Dosage de l'orthophosphate	45
2.6 Détermination du ^{32}P	48
2.7 Séparation et identification de l'ATP et de ses dérivés adénylés	50
2.8 Dosage de la DNase I pancréatique	52
2.9 Electrophorèse sur plaque de gel de polyacrylamide ..	53
2.10 Polymérisation de l'actine	56
2.11 Marquage de l'actine-G au moyen de $\{\text{H}^3\}\text{-ATP}$	58
 CHAPITRE III	
3. Résultats	60
3.1 Mise au point des méthodes	60
3.1.1 Préparation des membranes cytoplasmiques d'hépatocytes	61
3.1.2 Détermination de l'orthophosphate	65
3.1.3 Séparation et identification des nucléotides	71
3.1.4 Dosage de la DNase I pancréatique	77
3.2 Effet des membranes cytoplasmiques d'hépatocytes sur l'actine	79
3.2.1 Essais de phosphorylation de l'actine	80
3.2.2 Hydrolyse de l'ATP par les membranes cytoplasmiques d'hépatocytes	84
3.2.3 Modification des propriétés physico-chimiques de l'actine suite à la perte de son nucléotide	90
3.2.3.1 Effet du Dowex sur les propriétés physico-chimiques de l'actine-G	91

	Page
3.2.3.2 Marquage de l'actine-G au moyen de { ³ H}-ATP	98
3.2.4 Action des membranes cytoplasmiques d'hépatocytes sur l'actine	101
3.2.4.1 Préparation et échantillonnage	102
3.2.4.2 Effet des membranes sur la polymérisabilité de l'actine	112
3.2.4.3 Effet des membranes sur la capacité d'inhibition de l'actine-G sur la DNase I pancréatique	115
3.2.4.4 Mesure du phosphore lié aux protéines du surnageant suite à la centrifugation des membranes	119
3.2.4.5 Mesure de la radioactivité totale des milieux à chacune des étapes de prise d'échantillons	122
3.2.4.5.1 Mesure du ³² P	122
3.2.4.5.2 Mesure du ³ H	127
3.2.4.6 Effet des membranes sur la nature des nucléotides présents dans les milieux réactionnels	131
3.2.4.6.1 Nature des nucléotides présents dans les milieux réactionnels à faible concentration de membranes	132
3.2.4.6.2 Nature des nucléotides présents dans les milieux réactionnels à forte concentration de membranes	139
3.2.4.7 Effet des membranes sur l'actine-G suivi par électrophorèse sur gel de polyacrylamide	143

	Page
3.2.5 Vérification par électrophorèse de l'absence de phosphorylation de l'actine-G ou -F en présence de membranes cytoplasmiques d'hépatocytes de rats..	147
 CHAPITRE IV	
4. Discussion	156
4.1 Phosphorylation de l'actine	156
4.2 Comportement de l'actine en absence de nucléotide ...	164
4.3 Conclusion	173
 BIBLIOGRAPHIE	 176

LISTE DES TABLEAUX

	Page
TABLEAU I: Contenu cellulaire en protéines contractiles (d'après Pollard)	10
TABLEAU III: Différentes classes de myosines cytoplasmiques (d'après Pollard)	11
TABLEAU III: Protéines pouvant s'associer à l'actine (d'après Schliwa)	14
TABLEAU IV: Préparation des gels de polyacrylamide pour électrophorèse	54
TABLEAU V: Préparations diverses de membranes plasmiques de foie	62
TABLEAU VI: Rendement des différentes préparations de membranes	64
TABLEAU VII: Opérations à effectuer à un temps donné pour une prise d'échantillon	103

	Page
TABLEAU VIII: Composition de chacun des milieux réactionnels ...,	105
TABLEAU IX: Prélèvement des échantillons pour les milieux sans radioactivité	107
TABLEAU X: Prélèvement des échantillons pour les milieux radioactifs	108
TABLEAU XI: Radioactivité des bandes d'actine-G et -F après électrophorèse	149
TABLEAU XII: Tentatives diverses de phosphorylation de de l'actine	162

LISTE DES FIGURES

	Page
FIGURE 1: Diagramme de l'actine-F et des systèmes majeurs de régulation musculaire de la contraction (Selon Adelstein)	7
FIGURE 2: Régulation cytoplasmique des formes -G et -F de l'actine par phosphorylation (Selon Grazi et Magri)	26
FIGURE 3: Montage à effectuer pour obtenir des conditions idéales de perfusion	40
FIGURE 4: Appareil servant au découpage des bandes d'électrophorèses	49
FIGURE 5: Effet du pré-lavage sur le dosage de l'orthophosphate	67
FIGURE 6: Effet du vieillissement du réactif sur le dosage de l'orthophosphate	69

	Page
FIGURE 7: Dosage de l'orthophosphate en présence et en absence d'actine	70
FIGURE 8: Effet de l'acidité sur le dosage de l'orthophosphate	72
FIGURE 9: Profil d'élution des nucléotides adénylés sur une colonne de Dowex-I X8	74
FIGURE 10: Position des nucléotides adénylés suite à une chromatographie sur papier	75
FIGURE 11: Test d'hyperchromicité pour le dosage de la DNase I pancréatique	78
FIGURE 12: Incubation de l'actine en présence de membranes d'hépatocytes de rats (Dosage de l'orthophosphate)	82
FIGURE 13: Hydrolyse de l'ATP par des membranes de foie de rat (histogramme)	85
FIGURE 14: Cinétique de l'hydrolyse de l'ATP par les membranes plasmiques de foie de rat	87

	Page
FIGURE 15: Effet des membranes plasmiques de lapin sur les nucléotides du tampon G (densitogramme)	87
FIGURE 16: Effet des membranes plasmiques de lapin sur les nucléotides du tampon G	89
FIGURE 17: Polymérisation de l'actine selon le temps d'incubation en présence de Dowex	92
FIGURE 18: Perte de la polymérisabilité de l'actine en fonction du temps d'incubation en présence de Dowex	94
FIGURE 19: Cinétique de l'hydrolyse acide de l'ATP	96
FIGURE 20: Effet d'une incubation en présence de Dowex sur le contenu en nucléotide de l'actine	97
FIGURE 21: Incorporation de $\{^3\text{H}\}$ -ATP sur l'actine-G-ATP à 0°C ...	100
FIGURE 22: Effet des membranes plasmiques de foie de lapin sur la polymérisabilité de l'actine-G	113
FIGURE 23: Inactivation de la DNase I pancréatique à 4°C	116

	Page
FIGURE 24: Effet des membranes plasmiques de foie de lapin sur la capacité de l'actine à inhiber la DNase I	118
FIGURE 25: Effet des membranes plasmiques de foie de lapin sur la quantité d'orthophosphate libéré dans le milieu	120
FIGURE 26: Effet de l'incubation des membranes plasmiques de foie de lapin avec l'actine-G sur la radioactivité totale en ^{32}P	124
FIGURE 27: Effet de l'incubation des membranes plasmiques de foie de lapin avec l'actine-G sur la radioactivité totale en ^3H	129
FIGURE 28: Dégradation des nucléotides d'une solution d'actine à 30°C	133
FIGURE 29: Composition en nucléotide des milieux A*-1, A*-2 et D*-1 en fonction du temps d'incubation	136
FIGURE 30: Effet des membranes à faible concentration sur la quantité de nucléotide lié à l'actine	138

	Page
FIGURE 31: Effet des membranes à forte concentration sur la composition en nucléotides du milieu E*	140
FIGURE 32: Effet des membranes à forte concentration sur la composition en nucléotide du milieu B*	141
FIGURE 33: Effet des membranes plasmiques de foie de lapin sur l'actine-G suivi par électrophorèse sur gel de polyacrylamide	145
FIGURE 34: Effet des membranes plasmiques de foie de rat sur l'actine-G et F (électrophorèse)	151
FIGURE 35: Hydrolyse de l'ATP par des membranes cytoplasmiques d'origines diverses	160

CHAPITRE I

1. INTRODUCTION

Le premier travail faisant état d'un phénomène contractile, dans des cellules autres que les muscles, date du début des années 1950 alors que Lowey (96) extrayait une protéine de type actomyosine du myxomycète Physarum polycephalum.

Mais depuis la purification quantitative d'actine et de myosine à peu près simultanément au Japon par Hatano et coll. (64, 65) et aux Etats-Unis par Adelman et Taylor (1) vers la fin des années 60, il y a eu une rapide expansion dans la compréhension de la façon par laquelle l'actine, en conjonction à d'autres protéines, peut générer une force dans les cellules non musculaires.

On sait maintenant que l'actine et la myosine fournissent la base moléculaire à de nombreux processus motiles dont l'endocytose et l'exocytose, la cytokinèse et les mouvements chromosomiques, la distribution topographique de certaines protéines de surface membranaire, le courant cytoplasmique, et mouvement amiboïde et j'en passe... D'excellents articles et articles de revue ont d'ailleurs amplement discuté de ce sujet (27, 56, 78, 79, 103, 109, 127, 129, 152, 156).

Parmi les nombreuses protéines découvertes jusqu'ici en relation a-

avec la motilité non musculaire et ses mécanismes de régulation, l'actine est jusqu'à présent celle qui se présente comme la plus abondamment caractérisée. Sa concentration varie selon les types de cellules mais elle demeure toujours une des plus, sinon la plus abondante des protéines cellulaires. Dans les cellules fortement motiles, elle peut même constituer de 10 à 15% du total des protéines cellulaires (127).

On peut en fait parler de son ubiquité car elle a été retrouvée dans toutes les cellules et tissus examinés jusqu'ici en passant même par certaines plantes supérieures, telle la tomate (159).

Malgré l'accumulation toujours croissante des données relatives à la motilité cellulaire non-musculaire, de nombreuses questions demeurent toujours sans réponse. Quelles sont, par exemple, les structures protéiques exactes nécessaires pour l'élaboration cellulaire d'un phénomène motile dans les tissus non contractiles? Comment s'effectue le mouvement s'il n'y a pas de structures comme on les connaît dans les muscles? Comment les filaments d'actine sont-ils reliés aux membranes dans les phénomènes où ils y paraissent associés? Quels sont les autres points d'ancre des diverses protéines contractiles? De quelle façon les phénomènes motiles sont-ils initiés et régularisés? On peut aussi se demander quel mécanisme de régulation est à la base de l'équilibre dynamique entre les formes -G et -F de l'actine (Ces formes seront décrites en détail un peu plus loin)?

Le présent travail ne prétend nullement répondre à ces questions du plus haut intérêt, mais c'est à la lumière des hypothèses que suscite principalement la question relative à la régulation des différentes formes d'actine cellulaire qu'il a été élaboré et mené à terme.

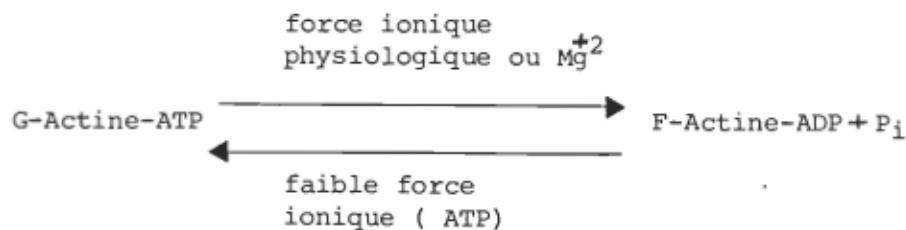
Mais avant de présenter les résultats que nos travaux nous ont permis d'obtenir, il apparaît souhaitable de rappeler brièvement les quelques points essentiels préalables à leur mise en chantier.

1.1 L'actine; propriétés physico-chimiques

L'actine-G du muscle squelettique est une protéine globulaire constituée d'une seule chaîne de 374 résidus d'acides aminés dont la séquence complète a été déterminée en 1973 par Elzinga et coll. (38) pour le lapin. Selon ces résultats, son poids moléculaire calculé est de 41 785 daltons, et, pour l'actine-G in vivo, de 42 300 daltons (ceci incluant une molécule d'ATP et un ion calcium fermement lié comme groupes prosthétiques).

La propriété la plus remarquable de l'actine-G purifiée réside en sa capacité de polymériser en un double filament hélicoïdal à force ionique physiologique.

L'addition de sels à une solution d'actine-G-ATP induit sa polymérisation simultanément à la déphosphorylation de l'ATP lié en ADP. Ce phénomène est réversible in vitro par une dialyse envers un milieu à faible force ionique contenant de l'ATP (146).



L'actine-G-ATP ainsi reformée conserve sa propriété de polymérisabilité dans les conditions appropriées.

Outre sa faculté de polymériser, le point majeur concernant l'actine est sa remarquable stabilité phylogénétique d'une source biologique à une autre. On peut citer à titre d'intérêt Ogievetskaya (120) qui calculait, à l'aide de la composition en acides aminés d'actine de plusieurs sources, un maximum de 3 changements d'acides aminés par 100 résidus et par 100 millions d'années.

La nature très conservatrice de la séquence de l'actine pourrait être expliquée par la richesse des centres biologiquement actifs situés sur cette relativement petite molécule. Nous verrons d'ailleurs un peu plus loin quelques exemples des interactions que l'actine entretient avec de nombreuses autres protéines.

Mais malgré ce conservatisme, on a pu identifier, suite aux travaux de Whalen et coll. (169) effectués en 1976, quatre types d'actine: α , β , γ et δ . (52). Même si ces différentes actines sont codées par plusieurs gènes différents (160, 161), et même jusqu'à 20 gènes pour un génome individuel humain (39), jusqu'ici, outre une légère modification de leur point isoélectrique et de leur composition en acides aminés (47, 48, 70, 76, 85, 90, 113, 160, 161), les propriétés importantes de tous les types d'actines étudiées se sont révélées très semblables, sinon identiques (4, 44, 52, 63, 162).

On peut donc considérer comme acquis le principe voulant que l'utilisation d'actine musculaire, beaucoup plus facilement disponible, soit ac-

ceptable pour les études in vitro des différentes propriétés des actines de sources diverses.

1.2 Importance de l'actine dans les mécanismes de motilité

Les premières protéines dites contractiles ont d'abord été découvertes suite à l'étude du fonctionnement du muscle. Depuis lors, ce champ d'investigation s'est étendu aux nombreuses autres activités motrices non musculaires. Il est donc peu étonnant que de nouvelles protéines aient été découvertes relativement, surtout, au contrôle de ces dernières activités.

Par contre, loin de simplifier l'explication des phénomènes eux-mêmes, ces découvertes ont ouvert toute grande la porte aux spéculations, et les hypothèses globales se raffinent de plus en plus avec les années.

Le but de cette section n'est donc pas de dresser un bilan complet de toutes les protéines jouant un rôle dans les phénomènes motiles et de leurs interactions réciproques. Mais, quoiqu'il soit utile d'en glisser un mot, une étude en profondeur de toutes ces protéines constituerait un éparpillement inutile à la compréhension des résultats qui seront présentés plus loin.

Nous limiterons ici notre approche à un très bref résumé concernant la fonction de l'actine et des quelques protéines qui lui sont directement reliées en débutant par un survol rapide du phénomène de la contraction musculaire qui, finalement, est toujours considérée comme le point de départ pour l'élaboration des hypothèses relatives aux mouvements cytoplas-

miques.

Nous verrons ensuite l'importance de l'actine dans la motilité non musculaire sous différents aspects pour en arriver de façon plus précise à l'objectif que s'est donné le présent travail.

1.2.1 Contraction musculaire; mécanismes de régulation

Les deux principales protéines impliquées dans la contraction musculaire sont l'actine et la myosine, formant chacune un type particulier de filaments. La contraction musculaire consiste en l'attachement et au détachement cyclique de la portion globulaire de la molécule de myosine aux filaments d'actine, ce qui résulte en un glissement des filaments l'un envers l'autre. L'énergie nécessaire à ce glissement actine-myosine est fournie par l'ATP.

Les mécanismes de régulation rattachés à ce processus sont de trois types, selon la provenance du muscle, mais chacun est directement relié à la concentration en calcium du milieu.

Le premier, qu'on retrouve dans les muscles squelettiques des vertébrés, consiste en l'inhibition, à faible concentration de calcium, de l'interaction de l'actine avec la myosine par le complexe protéique troponine-tropomyosine rattaché aux filaments d'actine (2) (Voir figure 1).

Un second type de régulation se retrouve dans les mollusques. Dans ce cas, une augmentation de la concentration de calcium permet l'interaction actine-myosine par le biais d'une liaison de l'ion calcium à une paire de chaînes légères de la myosine.

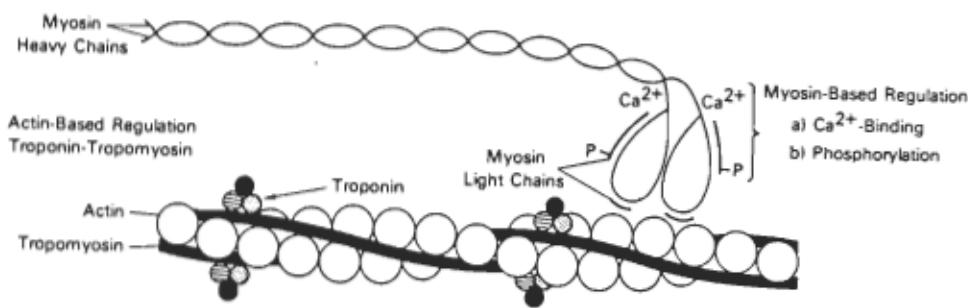


FIGURE 1: Diagramme représentant chacun des trois systèmes majeurs de régulation jouant un rôle dominant dans différents types de muscles. A noter la forme hélicoïdale en double hélice de l'actine-F et la position de la tropomyosine et du complexe troponine le long du filament d'actine. A noter aussi que la position exacte des chaînes légères de la tête de la myosine n'est pas connue. Cette figure a été tirée intégralement d'un article d'Adelstein (2) page 925.

Le troisième type de régulation est retrouvé entre autre dans les muscles lisses des vertébrés. De façon similaire au second type, une augmentation de la concentration en calcium permettra l'interaction de l'actine et de la myosine. Cette interaction se produit suite à la liaison de l'ion calcium à une protéine, la calmoduline, qui pourra ensuite se lier à la myosine kinase. Ce dernier enzyme activera finalement la myosine par une phosphorylation de ses chaînes légères.

La figure 1 nous montre un schéma représentant les différents types de régulation ainsi que la forme et la position respective des filaments d'actine et des protéines qui y sont rattachées dans les muscles.

Il aurait été bien sûr possible d'élaborer très longuement sur ce sujet à peine effleuré, mais il existe déjà d'excellentes revues générales sur la contraction musculaire (103), sur la régulation et la cinétique de l'interaction actine-myosine (2) de même que sur la phosphorylation des protéines contractiles en relation avec la fonction musculaire (149).

Ce qu'il importe de rappeler ici, c'est que toute l'activité motrice génératrice de force au niveau des muscles est basée sur l'interaction entre l'actine et la myosine, quel que soit le ou les mécanismes de régulation utilisés. Nous verrons plus loin que cette interaction est aussi perçue comme étant primordiale dans les phénomènes non musculaires.

1.2.2 Phénomènes motiles non musculaires

Plusieurs exemples de phénomènes motiles ont déjà été mentionnés plus tôt. Il est grandement intéressant de constater que plusieurs

évolutions distinctes autant par leur ultrastructure, leur biochimie que leurs mécanismes sont observables dans le domaine de la motilité cellulaire.

Notre attention ne se concentrera toutefois que sur les mécanismes concernant les mouvements à l'intérieur du cytoplasme.

Dans cette section, nous ferons un survol rapide des protéines interagissant avec l'actine de façon à percevoir la complexité de l'ensemble des interactions auxquelles elle prend part.

1.2.2.1 Interaction actine-myosine, génération de force

Contrairement aux muscles, où elle est une protéine majeure, la myosine n'est présente qu'à très faible concentration dans les cellules non-musculaires (Voir tableau I). Pollard (127) explique cette faible concentration de la myosine par la différence d'ordre de grandeur des faibles forces requises pour la motilité cellulaire par rapport à celles développées par les muscles.

Contrairement aux actines, les myosines de diverses sources non musculaires apparaissent comme étant remarquablement variables. Même dans différents muscles, où elles possèdent une forme et une grandeur équivalente, on peut observer des différences importantes au niveau de leur structure primaire ainsi que dans leur activité enzymatique (49). Les cellules non musculaires peuvent même posséder plusieurs myosines de taille et de forme différentes(Voir tableau II).

Etant donné cette diversité, Pollard (127) nous propose une définition

Tableau I

Contenu cellulaire en actine et en myosine
pour différents tissus et cellules

	Total protein	Concentra-tion ($\mu mol/kg$)	Actin: myosin ra-tio
	%		
Actin			
Rabbit muscle	19	900	6
Human platelet	10	240	110
Acanthamoeba	14	250	70
Myosin			
Rabbit muscle	35	144	
Human platelet	1	2.2	
Acanthamoeba-I	0.3	1.3	
-II	1.2	2.3	

N.B.: Ce tableau a été tiré intégralement d'un article de Pollard (127), page 157S

Tableau II
Classes de myosines cytoplasmiques

	Molecular weight	Polypeptides
Metazooan	~470,000	2 × 200,000 2 × 18,000 2 × 16,000
Slime mould	~500,000	2 × 210,000 18,000 16,000
<i>Acanthamoeba</i> myosin-I	~180,000	1 × 130,000 or 125,000 1 × 17,000 or 25,000 1 × 14,000
<i>Acanthamoeba</i> myosin-II	~420,000	2 × 175,000 2 × 16,500 2 × 17,500

N.B.: On peut voir ici le nombre de chaînes d'acides aminés ainsi que la taille de différentes myosines non musculaires. Ce tableau a été tiré d'un article de Pollard (127), page 159 S.

tion générale du terme myosine: soit la capacité de se lier réversiblement aux filaments d'actine et la possession d'une activité ATPasique induite par l'actine.

L'établissement de mécanismes généraux pour la génération de la force motile cellulaire n'est pas encore terminé. Même si la similitude des propriétés biochimiques des actines et myosines non musculaires avec leurs homologues musculaires suppose un mécanisme génératriceur de force basé sur l'interaction actine:myosine, beaucoup de travail reste à faire pour en arriver à une compréhension plus claire du phénomène.

Il semble aussi que la tropomyosine peut jouer un rôle de régulation dans les systèmes non musculaires, puisqu'elle peut interférer lors des réactions entre les filaments d'actine et certaines protéines qui peuvent s'y associer, telles l' α -actinin, la filamine, la spectrine et même la myosine (56).

Il faut de plus souligner l'importance du calcium dans la régulation de tous les phénomènes motiles. Même si la présence du complexe troponine dans le cytoplasme des cellules non musculaires suscite une certaine discussion, nous verrons que plusieurs des protéines qui peuvent s'associer à l'actine possèdent déjà une sensibilité au calcium, cette sensibilité étant en mesure de contrôler leurs effets sur l'actine.

1.2.2.2 Autres protéines impliquées

Une publication récente de Schliwa (138) nous dressé un bilan des protéines pouvant s'associer avec l'actine dans le cyto-

plasme.

Le tableau III a été tiré de cet article sans modification et nous présente en bref le résumé des connaissances ramassées au fil des vingt dernières années sur ces protéines. Aucun commentaire n'est réellement nécessaire suite à la présentation de cette table sauf pour y ajouter certaines protéines n'y figurant pas.

Les auteurs ont volontairement omis les protéines musculaires dont les interactions avec l'actine sont bien connues et qui ont été retrouvées en plus ou moins grande quantité dans les tissus non musculaires, telles la myosine et la tropomyosine.

De même, la spectrine, protéine majeure associée à l'actine dans les érythrocytes, a été omise. Une excellente revue de Brandon et coll. (17) récapitule d'ailleurs les connaissances actuelles sur ce dernier sujet.

La brevine(60), protéine de 90 000 daltons récemment purifiée du sérum, peut s'ajouter à la liste du tableau III, quoiqu'elle puisse s'apparenter à la protéine dépolymérisante de l'actine (# 15 sur le tableau) et à la gelsoline(170, 171), autant en ce qui a trait à son poids moléculaire qu'à sa capacité de se lier à un bout du filament d'actine, ce qui produit des filaments de plus faible longueur.

Récemment, Glenney (50) a purifié une protéine, nommée TW 260/240 assez semblable à la fodrine(91), protéine du cerveau agissant au niveau de l'organisation sub-membranaire et interagissant avec la F-actine. La TW 260/240 se lie aussi aux filaments d'actine de même qu'elle interagit avec la calmoduline.

Tableau III

Protéines pouvant s'associer à l'actine dans le cytoplasme des cellules non musculaires

No.	Subunit MW (kd)	Native MW (kd)	Name	Gela-tion Activity	Ca ²⁺ Sensi-tivity	Isolated from	Also Pres-ent in	Actin-Bind-ing Capac-ity (protein: actin)	Proposed Function(s) and Properties	Remarks	Selected References
1	250	500 (di-mer); rod-shaped	Actin-bind-ing protein	Yes	No	Macro-phages, leukocytes	Many other cell types	1:14	Crosslinks F actin into isotropic gel; causes branching polymerization	Very similar to, but not identical with, proteins 2 and 3	Hartwig and Stossel, JBC 250, 5696-5703, 1975; Hartwig and Stossel, JMB 145, 563-581, 1981
2	250	500 (di-mer); rod-shaped	Filamin	Yes	No	Smooth muscle	Many other cell types	1:12	Crosslinks F actin into isotropic gel		Wang, Biochemistry 16, 1857-1864, 1977; Wang and Singer, PNAS 74, 2021-2025, 1977
3	250		HMW pro-tein	Yes	No	BHK cells			Crosslinks F actin into isotropic gel	Forms regular arrays along F-actin bundles	Schloss and Goldman, PNAS 76, 4484-4488, 1979
4	58		Fascin	Yes	No	Sea urchin eggs	Coelomo-cytes	1:4-5	Forms crossbanded needles with F actin		Bryan and Kane, JMB 125, 207-220, 1978
5	23, 28, 32, 38	23, 55, 64, 78	Gelation factors	Yes	No	Acantha-moeba			Causes rapid gelation of actin		Maruta and Korn, JBC 252, 399-402, 1977
6	220			Yes	No	Sea urchin			Links needles formed by fascin and F actin into a 3-D gel		Bryan and Kane, op. cit.
7	115		Actinogelin	(Yes)	Yes	Ehrlich as-cites tumor cells	Macro-phages (?)	1:10-12	Gelation factor; forms weak gels with actin filaments		Mimura and Asano, Na-ture 282, 44-48, 1979
8	95	95; globu-lar	Villin	(Yes)	Yes	Intestinal epithelial cells		1:2 in mi-cromolar Ca ²⁺ ; 1:9-12 in iso-lated brush borders	Crosslinks actin filaments in the microvillus core; bundles F actin in the absence of micromolar Ca ²⁺ ; at micromolar Ca ²⁺ it re-stricts actin polymerization and breaks F actin into small frag-ments	Promotes nucleation	Breitscher and Weber, Cell 20, 839-847, 1980; Craig and Powell, Cell 22, 739-746, 1980
9	91	91; globu-lar	Gelsolin	No	Yes	Macro-phages			Binds to and shortens F actin; inhibits gelation by actin-binding protein	Binds 2 Ca ²⁺ ; accounts for most of the Ca ²⁺ sen-sitivity of gelation in macrophage extracts	Yin and Stossel, Nature 281, 583-586, 1979; Yin and Stossel, JBC 255, 9490-9493, 1980

Tableau III
(suite)

No.	Subunit MW (kd)	Native MW (kd)	Name	Gela-tion Activity	Ca ²⁺ Sensi-tivity	Isolated from	Also Pres-ent in	Actin-Bind-ing Capac-ity (protein: actin)	Proposed Function(s) and Properties	Remarks	Selected References
10	42	42	Fragmin (AM pro-tein)	No	Yes	Physarum		1:1	Breaks F actin into small frag-ments; inhibits polymerization	Accelerates initial viscos-ity increase (promotes nucleation)	Hasegawa et al., Bio-chemistry 19, 2677–2682, 1980; Hinssen, EJCB 23, 225–240, 1981
11	28 and 31	120–160 (?) (two copies of each)	Capping protein	No	No	Acantha-moeba			Reduces low-shear viscosity of F actin; inhibits gelation by Acan-thamoeba gelation factors; blocks monomer addition at barbed end; inhibits annealing	Promotes nucleation, but inhibits rate of growth of F actin	Isenberg et al., Nature 288, 455–459, 1980
12	65 (?)			No	No	Platelets			Has cytochalasin B-like activity; reduces viscosity of F actin or F actin plus crosslinkers; blocks elongation at barbed end	Does not induce break-age of F actin	Grumet and Lin, Cell 21, 439–444, 1980
13	16	16	Profilin	No	No	Spleen, platelets	Many tis-sues and cell types	1:1	Forms a stable complex with G actin; maintains monomeric state	Does not depolymerize F actin	Karlsson et al., JMB 115, 465–483, 1977; Harris and Weeds, FEBS Lett. 90, 84–89, 1978
14	62 and 65	62 and 65 (mono-mers); globular	Actin inhibi-tor	No	No	Human PMN		1:7	Prevents actin polymerization; causes small reduction of vis-coosity when added to F actin; maintains large pool of unpoly-merized actin in PMNs	Is inactivated by 0.6 M KCl; differs from β -actinin of skeletal muscle	Southwick and Stossel, JBC 256, 3030–3036, 1981
15	92	98–110	Actin-depo-lymerizing protein	No	No	Blood plasma		1:1	Depolymerizes F actin released into plasma by cell damage; forms a stable complex with actin	Is stabilized by millimolar Ca ²⁺ ; similar factors of other species may differ in size	Norberg et al., Eur. J. Bio-chem. 100, 575–582, 1979; Harris and Gooch, FEBS Lett. 123, 49–53, 1981

N.B.: Ce tableau a été tiré intégralement d'un article de Schliwa (138), p. 588–589.

Bref, la liste impressionnante des protéines interagissant avec l'actine n'est pas encore complétée. Plusieurs autres protéines viendront probablement s'y ajouter dans les prochaines années pour finalement améliorer la vue d'ensemble qu'on possède des phénomènes motiles liés à l'actine.

1.2.3 Régulation de la polymérisation cytoplasmique de l'actine

On sait déjà que l'actine constitue la protéine majeure des microfilaments cytoplasmiques, et cela même si une grande partie de toute l'actine cellulaire est présente sous forme monomérique (14, 18, 22, 52, 61, 108, 132), et ce malgré des conditions ioniques favorisant essentiellement la forme filamenteuse in vitro.

Cette constatation est très importante, surtout si on la joint au fait que toutes les actines suffisamment purifiées, de quelques sources qu'elles soient, polymérisent complètement dans ces conditions.

On croit généralement que cette actine non polymérisée constitue une forme de réserve qui pourrait, au moment voulu polymériser en fonction des besoins physiologiques cellulaires.

Dans la présente section nous verrons deux protéines qui ont été soupçonnées de posséder ce rôle. Tout d'abord la DNase I pancréatique, sera décrite avec beaucoup d'intérêt puisqu'elle a été utilisée dans le présent travail. Nous verrons ensuite avec beaucoup moins de détails le rôle important de la profiline dans ce mécanisme de régulation.

Il est à noter qu'un article de revue récent (77) traite en profon-

deur de la polymérisation de l'actine et de sa régulation par des protéines d'origine non musculaires. On peut par ailleurs y retrouver un tableau du même type que celui présenté au tableau III, mais où les protéines sont détaillées différemment. Ce tableau de Korn pourra compléter la vue d'ensemble déjà présentée par Schliwa (138).

1.2.3.1 DNase I

La désoxyribonucléase I (DNase I) est une endonucléase participant à une variété de fonctions métaboliques telles la recombinaison génétique (133), la réparation du DNA endommagé dans les cellules procaryotes (57) ou encore la restriction de DNA étrangers (5).

Plusieurs DNases ont été identifiées de différentes sources, mais les mieux caractérisées semblent revêtir un caractère important principalement au niveau des fonctions digestives (83).

La mieux connue et isolée pour la première fois sous forme cristalline par Kunitz en 1948 (82) est la DNase I pancréatique bovine. D'un poids moléculaire de 31 000 daltons (95), cet enzyme, dont la structure primaire a été déterminée par Liao (92) possède des caractéristiques enzymatiques déjà bien établies (81).

C'est en 1950 que Cooper et coll. (34) enregistraient, à partir de nombreux types de cellules eucaryotes, la présence d'un inhibiteur protéique spécifique à l'action de la DNase I pancréatique sur le DNA.

Les travaux successifs de Lindberg et coll. à partir de 1963 (88, 93, 94, 105, 137) ont finalement permis de caractériser cet inhibiteur et de

l'identifier comme étant de l'actine monomérique.

L'interaction de ces deux protéines mène à la formation d'un complexe 1:1 (101) très stable dont la constante de liaison a été évaluée à $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. Suite à la formation du complexe, chacun des deux constituants perd ses propriétés biologiques, soit la polymérisabilité pour l'actine et la capacité d'hydrolyser le DNA pour la DNase I. De plus, mise en présence d'actine-F, la DNase I dépolymérise lentement cette dernière pour, de nouveau former le complexe actine-DNase I (101).

Contrairement à la profilactine, dont il sera question à la section suivante, le complexe actine-DNase I contient une mole d'ATP lié (17) dont le taux d'échange avec l'ATP du milieu est diminué d'environ un facteur 20 en comparaison avec celui de la G-actine (68, 100, 104).

La stabilité biologique remarquable du complexe actine:DNase I est telle que, même si Zechel (172) démontrait que l'actine pouvait être libérée d'une colonne d'affinité DNase I-agarose par un lavage avec 35 à 40% de formamide, il n'en demeure pas moins que, jusqu'à récemment, aucune méthode physiologique n'était encore connue touchant la réversibilité de la formation du complexe. Cette irréversibilité représente certainement l'objection la plus sérieuse à un mécanisme de régulation de la polymérisation de l'actine par la DNase I.

La signification physiologique de cette interaction demeure toujours obscure, et une étude récente de Lacks (83) sur la distribution de la DNase I et de sa réactivité face à l'actine a encore affaibli la double possibilité que l'actine soit l'agent régulateur de l'activité de nucléase de la DNase I, ou encore que cette dernière agisse au niveau de la ré-

gulation intracellulaire de la polymérisabilité de l'actine. En effet, les DNases cytoplasmiques de différentes sources n'interagissent avec l'actine que très peu, sinon aucunement. Il semble y avoir un lien entre l'espèce et la spécificité de la DNase I envers l'actine.

Le manque de généralité, donc, de cette interaction nous amène à la rejeter comme étant une forme répandue de régulation de l'équilibre G et F pour l'actine cytoplasmique, et ce, malgré des articles récents de Mannherz et coll. (106, 107, 136) où l'on fait état pour la première fois d'une possibilité physiologique de séparation du complexe et de la réactivation de chacun de ses constituants.

1.2.3.2 Profiline

La profiline, d'abord isolée en 1976 par Carlsson et coll. (21) sous forme d'un complexe 1:1 avec l'actine nommé profilactine (117), est une petite protéine d'un poids moléculaire de 15 220 daltons (22) dont la séquence de 142 acides aminés est connue (118). Jusqu'à présent, la profiline a été retrouvée à partir de plusieurs sources (15, 61, 108, 134, 155).

La profiline inhibe le taux de polymérisation de l'actine lorsque présente sur une échelle de concentration s'étendant de 0,3 à 1 mole de profiline par mole d'actine (77). Son action semble se situer au niveau de l'inhibition de la nucléation de l'actine (134). De plus, cette protéine inhibe l'activité ATPasique résiduelle de l'actine monomérique (157), ce qui a pour effet de préserver la cellule contre une perte d'ATP inutile.

Il est intéressant de noter qu'à l'état naturel, la profilactine ne contient que 0,02 à 0,04 mole d'ATP par mole de complexe (22) alors que le complexe synthétique en contient 1 mole par mole d'actine (110). Notons aussi que le taux d'échange du nucléotide lié à l'actine avec l'ATP libre du milieu se trouve augmenté d'un facteur 17 en présence de profiline (110).

Même s'il est difficile de réconcilier ces deux derniers facteurs, il n'en demeure pas moins que la profiline se dégage de plus en plus comme étant d'une grande importance dans le mécanisme de régulation de la polymérisation de l'actine cytoplasmique. La profiline doit constituer, par sa capacité de s'y lier réversiblement, une forme de "stockage" inactivé, pour l'actine.

Il n'est bien sûr pas exclu qu'une autre protéine, ou encore un ensemble de protéines puisse être impliqué directement ou non dans la régulation des formes polymérisée et dépolymérisée de l'actine. Le mécanisme ultime est encore loin d'être complètement élucidé.

1.2.4 Interaction de l'actine avec les membranes biologiques

Nous avons mentionné plus tôt que l'actine est une protéine contractile retrouvée dans toutes les cellules étudiées. La nature exacte de ses interactions avec les autres composants cellulaires de même que son rôle précis dans les phénomènes motiles non musculaires sont toutefois loin d'être aussi bien documentés.

Des observations utilisant diverses techniques, telle la microscopie électronique ou encore l'immunofluorescence, sur divers matériaux cellulai-

res ont par ailleurs clairement montré une juxtaposition des microfilaments d'actine et des membranes* cytoplasmiques (128, 151).

Une excellente revue non spécifique à l'actine présente à cet effet un tour d'horizon assez intéressant de l'immunochimie des protéines contractiles cytoplasmiques (56).

De plus en plus, l'idée est acceptée qu'une association directe, ou par le biais d'intermédiaires, entre l'actine et la membrane cytoplasmique doit être essentielle pour plusieurs types de mouvements cellulaires.

Du fait de l'importance que présente le point d'ancre lors de l'exercice d'une force pour produire un effet quelconque, plusieurs tentatives pour relier directement l'actine à des composants membranaires connus** ont été effectués. Mais, en dépit de la signification fonctionnelle très importante de l'attachement de l'actine aux membranes, à peu près rien n'est actuellement connu sur la base moléculaire de ce mécanisme.

A la lumière de ces constatations, une étude des effets biochimiques des membranes cytoplasmiques sur l'actine présente un intérêt certain, et ce, même si l'élément responsable d'un effet donné n'est pas immédiatement identifiable.

* Une excellente revue de Loor (1977) (97) traite des mécanismes de reconnaissance immunologique en relation avec le cytosquelette et la surface cellulaire. On pourra y retrouver une bonne description des membranes cytoplasmiques ainsi que de l'importance des structures contractiles cellulaires.

** Tel le complexe crûde spectrin des érythrocytes (28, 29, 139), l' α -actinine, composant de la ligne "Z" des muscles striés et retrouvé près des sites d'attachement membranaires de l'actine cytoplasmique (19, 35, 45, 87, 111), ou encore plus récemment la 5'-Nucléotidase (23, 106, 107, 136, 141).

La section suivante nous donnera les informations jusqu'ici disponibles de cette action biochimique des membranes cytoplasmiques sur l'actine. Sans trop empiéter sur son contenu, précisons tout de même que des études de Grazi et Magri (55) ont récemment suggéré qu'une phosphorylation de l'actine pouvait survenir dans un tel cas, amenant des modifications importantes d'autres propriétés de l'actine. C'est pourquoi la prochaine section traitera des essais menés jusqu'à présent pour l'obtention de la phosphorylation de l'actine et ce de façon à mieux comprendre l'importance que pourrait revêtir un tel mécanisme.

1.2.5 Phosphorylation de l'actine: mécanisme de contrôle?

La régulation de plusieurs chemins métaboliques par des modifications covalentes réversibles d'enzymes-clés est un mécanisme biochimique que l'on retrouve dans de nombreux processus biologiques. La phosphorylation enzymatique appartient à cette catégorie de modifications chimiques.

Dans les quelques lignes qui suivront, nous allons effectuer un rappel des travaux de différentes sources ayant apporté l'indication de la possibilité d'une phosphorylation de l'actine. Les derniers travaux à cet égard relateront une hypothèse de régulation de la polymérisation de l'actine in vivo par la phosphorylation de cette dernière.

1.2.5.1. Phosphorylation de l'actine.

Le peu de documentation maintenant disponible à l'égard de la phosphorylation de l'actine, et d'ailleurs apparemment con-

tradictoire, sera présenté sous la forme d'un court résumé de chacun des articles en cause. Nous aurons l'occasion, dans un chapitre ultérieur, de discuter ces travaux plus globalement dans l'optique de nos résultats.

Mais avant d'attaquer directement la phosphorylation de l'actine, rappelons que depuis qu'a été découverte la phosphorylation de la myosine (124) et de la troponine (40, 150) purifiées du muscle squelettique de lapin, ou encore, pour la myosine, des plaquettes sanguines humaines (89), on sait que la phosphorylation réversible joue un rôle important quoique non encore parfaitement défini dans la régulation et le mécanisme de plusieurs phénomènes motiles autant musculaires que non musculaires.

D'autres protéines jouant un rôle dans la motilité non-musculaire peuvent subir une phosphorylation. A titre d'exemple, la filamine, protéine de 250 000 daltons purifiée de sources diverses (62, 140, 164, 166, 167) et se liant à l'actine en créant des ponts entre des filaments juxtaposés, peut subir une phosphorylation dépendante de l'AMPc (163). Une autre protéine la spectrine, associée aux membranes d'érythrocytes et pouvant lier l'actine (125), subit une phosphorylation, mais indépendante de l'AMPc cette fois (13). Cette phosphorylation réversible contrôle l'interaction de la spectrine et de l'actine (126). L'intérêt de ces derniers travaux réside dans le fait que la kinase phosphorylant la spectrine est incapable de phosphoryler l'actine dans les mêmes conditions pour des érythrocytes sains.

Des travaux récents ont démontré une phosphorylation in vivo et indépendante de l'AMPc des chaînes natives de l'actine lors de la synthèse protéique dans des cellules non musculaires (144). Cette phosphorylation tou-

che environ 10% des molécules d'actine , elle semble irréversible et ne se produit plus lorsque l'actine est complètement synthétisée. Les auteurs n'ont pu produire aucune explication particulière quant à la signification physiologique de cette phosphorylation.

Une étude de Pratje et Heilmeger (131) démontrait pour la première fois en 1972 que la F-actine du muscle squelettique de lapin pouvait être phosphorylée par une protéine kinase dépendante de l'AMPc mais le niveau d'incorporation du phosphore demeurait de nouveau assez faible.

Walsh et coll. (165) ont toutefois réussi à obtenir, avec le même enzyme dépendant de l'AMPc, une phosphorylation complète de l'actine-G de muscle lisse, où 2 moles de phosphate pouvaient se lier par mole d'actine. La F-actine de même source semble par contre moins accessible à cette phosphorylation. La G-actine du muscle squelettique de lapin s'est aussi avérée un substrat moins favorable que celle provenant du muscle lisse, alors que la F-actine du muscle squelettique ne subissait aucune phosphorylation dans les mêmes conditions.

Un article de Boivin (16), publié simultanément à celui de Walsh, traite d'une phosphorylation dépendante de l'AMPc. Ici, l'actine et quelques autres protéines du complexe "crude spectrin" d'un extrait de cytosquelette sous forme hydrosoluble se sont avérées de bons substrats pour la phosphorylation dépendante de l'AMPc de la protéine kinase purifiée. Par contre, ces mêmes protéines purifiées et mises en présence du même enzyme, n'ont subi aucune phosphorylation, la purification de la "crude spectrin" en ses éléments, dont l'actine, lui ayant fait perdre sa capacité d'être phosphorylée. Boivin et coll. ont attribué la cause de cette inactivation sur-

venant suite à la séparation du complexe à une modification allostérique de la structure tertiaire des protéines en présence.

Holstein et coll. (69) font aussi état de la phosphorylation indépendante de l'AMPc d'une protéine semblable à l'actine et obtenue des synaptosomes.

Une autre expérience récente de Bailin (8) relate la phosphorylation, par la protéine kinase dépendante de l'AMPc, d'un complexe cardiaque d'origine bovine d'actine troponine-tropomyosine. Tout le ^{32}P s'était alors fixé sur le composant inhibiteur de la troponine et son composant liant la tropomyosine (TNI et TNT). Aucune phosphorylation de l'actine n'a été détectée dans ce cas.

En résumé, il semble donc que l'actine peut être phosphorylée, quoique les conditions dans lesquelles s'opère cette phosphorylation demeurent encore sujettes à caution et semblent peu reproductibles d'un laboratoire l'autre.

1.2.5.2 Possibilité d'un mécanisme de contrôle

Les deux publications dont nous parlerons maintenant ont été les instigatrices directes du choix de la direction que nous avons prise lors de nos recherches. Nous leur accorderons par conséquent une plus grande attention.

Grazi et Magri (55) trouvaient, en 1979, qu'une préparation de membranes d'hépatocytes de foie de rat pouvait phosphoryler (indépendamment de l'AMPc) in vitro l'actine G ou F du muscle squelettique de lapin. La

réaction était complétée après une heure environ et l'incorporation maximale de phosphate était de 1 mole par mole d'actine.

La grande importance de cette phosphorylation réside en ce qu'elle amenait une modification de deux propriétés fondamentales de l'actine; soit la perte de sa polymérisabilité de même que celle de sa capacité de former un complexe 1:1 avec la DNase I . Un autre point d'intérêt de ces recherches demeure l'obtention pour la première fois d'une quantité d'actine phosphorylée suffisamment grande pour permettre de nombreuses études in vitro irréalisables autrement.

Leur dernier article à ce sujet (54), publié en 1980, nous indique que l'actine phosphorylée continue d'activer l'ATPase de la myosine de même qu'elle peut s'y lier en reformant des filaments visibles en microscopie électronique.

Les conclusions de leurs résultats amenèrent Magri et Grazi à élaborer un modèle simple pouvant donner une réponse, partielle peut-être, mais intéressante par sa nouveauté, à deux des questions fondamentales déjà énoncées; soit une explication du faible taux d'actine retrouvée sous forme F dans les cellules non musculaires de même qu'une preuve moléculaire d'une liaison directe de l'actine avec un enzyme membranaire.

Le schéma de la figure 2 présenté par Grazi et coll. (54) nous suggère un mécanisme de régulation possible. On y voit que l'équilibre favorisant la forme F de l'actine dans les conditions physiologiques est, suite à une modification de l'actine par un enzyme membranaire, déplacé vers la forme G de l'actine qui peut alors former avec la myosine un complexe contractile.

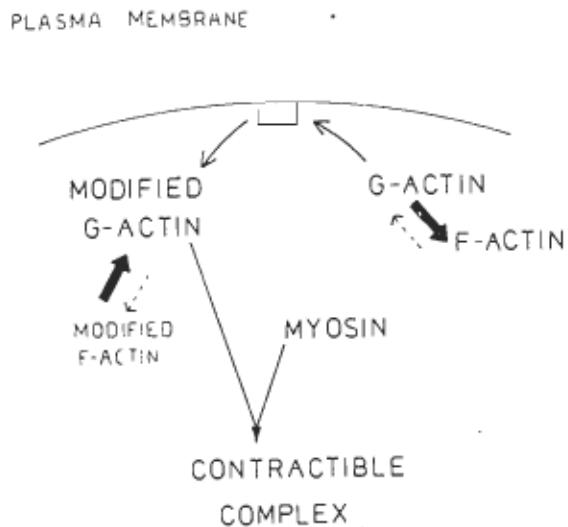


FIGURE 2: Schéma proposé par Grazi et coll. pour l'interaction de l'actine avec les membranes cytoplasmiques et la régulation des formes-G et -F de l'actine cytoplasmique par le biais de la phosphorylation. Cette figure a été tirée intégralement d'un article de Grazi et Magri (54), page 69.

Un défaut certain de ce schéma est qu'il ne prévoit pas la réversibilité du système. Mais nonobstant cette dernière constatation, une telle approche présente beaucoup d'intérêt et le tout mérite certes d'être étudié plus à fond.

Rappelons que, mise à part cette explication de Grazi et coll., aucun des auteurs qui ont observé une phosphorylation de l'actine n'a pu avancer aucune hypothèse sur la signification physiologique d'une quelconque phosphorylation de l'actine.

Il devenait donc très intéressant de tenter de compléter ces recherches en vérifiant le comportement de l'actine phosphorylée par la méthode de Grazi et coll. face aux nombreuses protéines avec lesquelles elle interagit pour ensuite préciser le modèle proposé par ces deux auteurs et peut-être aussi par la même occasion de trouver un élément de solution au problème de l'ancrage de l'actine aux membranes cytoplasmiques.

1.3 Objectif initial du présent travail

Nous avons vu dans les précédentes sections que l'actine, de par son ubiquité, ses propriétés chimiques et la multiplicité de ses interactions, se présente comme une protéine de très grande importance dans les phénomènes de la motilité.

Si la structure et le fonctionnement du muscle sont assez bien connus depuis plusieurs années, de même que les interactions et les régulations moléculaires qui sont à la base du processus global, la question du phénomène de la motilité non musculaire se présente sous un autre jour.

Plusieurs évidences nous forcent à penser que l'interaction actine-myosine est responsable de la génération de la force nécessaire aux mouvements cytoplasmiques. Mais, comme il a déjà été mentionné, la façon dont le phénomène lui-même se produit -- les points d'ancrages membranaires ou structuraux des filaments d'actine, les interactions de ces derniers avec la myosine, les microtubules ou encore avec les filaments intermédiaires du cytosquelette, leurs relations avec les autres diverses protéines pouvant s'y lier, de même que les mécanismes et les causes de la régulation des besoins cellulaires en filaments d'actine versus la réserve d'actine-G utilisable...-- est loin d'être entièrement élucidé.

Nous avons donc décidé de porter notre intérêt sur les récents travaux et sur l'hypothèse de Grazi en espérant la compléter par l'apport de nouveaux éléments concernant le comportement de l'actine modifiée face aux protéines avec lesquelles elle est normalement en mesure d'interagir.

Nous verrons donc comment, ne pouvant reproduire entièrement les résultats de Grazi et coll. (54, 55), nous avons déterminé les causes probables de nos résultats et des leurs par un processus méthodique de vérification.

CHAPITRE II

2. MATERIEL ET METHODES

2.1 Produits chimiques et abréviations

- Acétone: Classe I-B, Fischer
- Acide désoxyribonucléique: de thymus de boeuf, Type 1, Sigma (DNA).
- Acide isobutyrique: Fisher
- Acide L-aspartique: Sigma
- Acide L-glutamique: Grade Sigma
- Acide sulfochromique: Solution de lavages Fischer
- Acide trichloroacétique: (TCA), Baker Analyzed Reagent
- Acrylamide: Eastman
- Adénine: (6-Aminopurine HCL), Grade Sigma
- Adénosine: (9-β-D-Ribofuranosyladenine), Grade Sigma
- Adénosine 5' diphosphate: (ADP), sel de sodium, Grade III, Sigma
- Adénosine 5' Monophosphoric acid: (AMP), Type de "Yeast", Grade Sigma
- Adénosine 5' triphosphate:- (ATP), Grade II, sel de sodium, Sigma
 - $\{^3\text{H}\}\text{ATP}$: Sel de sodium,
 $\{2,8-^3\text{H}\}$, 27,6 Ci/mmol,
New England Nuclear
 - $\{^{32}\text{P}\}\gamma\text{ATP}$: sel de triethylammonium,
22 Ci/mmol
New England Nuclear

- L-Alanine: Grade Sigma
 - Albumine du sérum bovin: (SAB), Sigma
 - Azide de sodium: (NaN_3), Sigma
-
- Bis-Acrylamide: Eastman
 - Bleu de bromophénol: Eastman
 - Bleu de Coomassie: Coomassie Brilliant Bleu R-250, Kodak
-
- Désoxyribonucléase I: (DNase I, pancréatique), EC 3.1.4.5, DN-100 de pancréas, bovin, Sigma
-
- EDTA: (Ethylènediamine Tetraacetic acid), sel de sodium, Sigma
-
- Fructose: (β -D(-) Fructose), Sigma
-
- Glucose: (α -D(-) Glucose), Anhydre, Grade III, Sigma
 - L-Glutamine: Grade III, Sigma
 - Glycine: "Analyzed Biochemicals", Baker
-
- Héparine: de muqueuse intestinale porcine, 1000 U.S.P. unités/ml, dans Alcool-Benzyl 0,9%, Allen et Hanburgs
-
- β -Mercaptoéthanol: Type I, Sigma
-
- Para molybdate d'ammonium: ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), Fisher
 - Pentobarbital de sodium: (65 mg/ml alcoolbenzylique 1%) Somnotol, M.T.C. Pharmaceutical
 - Persulfate d'ammonium: pour électrophorèse, Fisher
 - PMSF: (Phénylméthylsulfonyl fluorure), Sigma

- POPOP: (1,4-bis{2-(5-Phenylloxazolyl)}benzène:
2,2'-p-phénylenebis(5-phenyloxazole), Sigma
- PPO: (2,5-Diphenyloxazole), pour scintillation, Sigma

- Réactifs:

- Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate:
de "Bio-Rad" Laboratories
- Biuret: Poudre commerciale de réactif Biuret, Harleco.
- Phénol: Folin & Ciocalteu, BDH Chemicals

- Scintillants:

- Bray: "Bray's Solution", New England Nuclear
- Formula-950A: New England Nuclear
- L-Sérine: Sigma
- SDS: (Sodium Lauryl Sulfate), Sigma
- Sucrose: anhydre, Grade I, Sigma
- TEMED: (N,N,N',N'-Tétraméthyléthylènediamine), Eastman
- L-Thréonine: Sigma
- Toluène: Grade "Comptage en scintillation liquide",
T.D. Baker Chemical Co.
- Vert de Malachite: Fisher.

N.B. A moins de spécification contraire, toutes les concentrations exprimées en % le sont en % P/v.

2.2 Préparation de l'actine

L'actine musculaire est préparée à partir de poudre acétonique obtenue des muscles squelettiques, principalement du dos et des cuisses, du lapin selon la méthode de Straub et coll. (145), modifiée par Spudich et Watt (142) puis finalement par Nonomura et Katayama (116).

Lors de l'élaboration des expériences qui ont permis la rédaction du présent texte, notre méthode de préparation de l'actine, à l'étape de la préparation de la poudre acétonique, a légèrement varié suite à des échanges de bons procédés avec le laboratoire du Dr. Dancker de l'institut Max Planck de Heidelberg (RFA). Il est donc utile de décrire ici les deux méthodes utilisées, tout en soulignant que la pureté des deux préparations demeure identique et excellente suite à une vérification par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en SDS.

2.2.1 Préparation de la poudre acétonique

Cette préparation est basée sur deux principes généraux. Le premier consiste en la séparation de la myosine du complexe actomyosine par extraction avec une solution à force ionique élevée. Le second étant la destruction mécanique des structures membranaires auxquelles sont reliés les filaments d'actine. On obtient ainsi une poudre riche en actine et facile à conserver.

2.2.1.1 Méthode I

Six cents grammes de muscle squelettique d'un lapin fraîchement décapité et saigné sont refroidis sur glace, nettoyés

de leur graisse, hachés, et plongés pendant 10 à 15 minutes dans 3 volumes (1800 ml) de solution Guba-Straub (KH_2PO_4 0,15M, KCL 0,3M à pH6,5) à 4°C, sous agitation mécanique, de façon à extraire les protéines solubles. Un volume (1800 ml) d'eau froide (4°C) est par la suite ajouté et la suspension musculaire résultante est aussitôt filtrée sur de la gaze.

Le filtrat est riche en myosine et on l'utilise au besoin pour purifier cette dernière. Sinon, il est rejeté. Le résidu solide est alors lavé rapidement avec 5 volumes (3,0 l) d'eau à température ambiante et de nouveau filtré sur 2 épaisseurs de gaze. On agite ensuite le résidu pendant 15 minutes dans 5 volumes (3 l) de NaHCO_3 0,4% à température ambiante puis on refiltre.

Après avoir répété cette dernière opération, suivent 2 lavages rapides avec 5 volumes d'eau (3 l) à température ambiante. Le résidu est ensuite rincé pendant 10 minutes avec 1,5 volume (900 ml) d'acétone à température ambiante, filtré sur filtre Buchner, homogénéisé par petites portions pendant 1 minute avec 1 à 2 volumes d'acétone froid à l'aide d'un Omnimixer de Sorvall, puis filtré de nouveau. Le résidu est ensuite agité de 15 à 30 minutes avec 1,5 volume d'acétone à température ambiante puis filtré de nouveau sur filtre Buchner. Cette dernière opération est répétée à 3 reprises et la dernière est suivie de la déposition, entre deux grandes feuilles de papier filtre, de la poudre obtenue qu'on laisse sécher une nuit à l'air.

On obtient ainsi 60 à 100 gr. de poudre acétonique I que l'on peut conserver à -20°C pendant une période de temps appréciable.

2.2.1.2 Méthode II

Comme il a été précisé plus tôt, cette seconde méthode n'a remplacé la première qu'en raison de son plus haut rendement (mg d'actine/gr de poudre) et d'une diminution légère du temps d'exécution, la qualité de l'actine obtenue étant équivalente.

Tout d'abord, les muscles squelettiques de 2 lapins fraîchement décapités et saignés sont trempés pendant 10 à 15 minutes dans de l'eau distillée froide. Les muscles sont ensuite essuyés, dégarnis autant que possible de leur graisse, nerfs et tendons, puis hachés menu, à l'aide d'un hachoir à viande commercial, et pesés. Les 800 à 900 grammes de viande obtenus sont dilués avec 1 litre de KCL 0,1M froid (4°C). Cette suspension est ensuite homogénéisée de 10 à 15 minutes par portion puis le volume total est complété à 4 litres en ajoutant 767 ml de KCL 3M froid et la différence en eau distillée froide de façon à obtenir une concentration finale de KCL 0,6M. Après une agitation de 30 minutes à 4°C , on centrifuge la suspension musculaire 15 minutes à 5000 rpm à l'aide d'une centrifugeuse Sorvall de type RC3 puis on rejette le surnageant.

Le résidu est ensuite rincé en complétant son volume à 4 litres avec une solution froide de KCL 0,3M et centrifugé pendant 10 minutes à 5000 rpm à 0°C . Après avoir rejeté le surnageant, on répète cette étape avec une solution froide de KCL 0,1M puis on centrifuge 4 minutes à 5000 rpm. Le résidu est ensuite lavé par 30 minutes d'agitation à température ambiante dans un volume total de 4 litres d'une solution de NaHCO_3 5mM et de KCL 0,1M. On recentrifuge ensuite à 5000 rpm pendant 4 minutes puis on rince le culot obtenu à 5 reprises avec 4 litres d'une solution de KCL

0,1M froide suivie à chaque fois d'une centrifugation de 4 minutes à 5000 rpm.

Le culot du dernier rinçage est de nouveau rincé à 5 reprises avec cette fois de l'eau froide distillée et déminéralisée. Les 2 dernières centrifugations de ces 5 derniers lavages sont prolongées à 10 minutes et la dernière s'effectue sans frein pour éviter de resuspendre la partie supérieure du culot lors de la décélération.

Après avoir évacué le surnageant, les culots (qui sont alors tout gonflés) sont soigneusement récupérés dans un grand bêcher de verre et 4 litres d'acétone leur est ajouté. Avec la main, on mélange en effritant bien toutes les grosses particules de viande.

L'étape suivante consiste à filtrer la "bouillie" obtenue sur 2 épaisseurs de gaze sans essorer. On répète 2 à 3 reprises l'étape du lavage à l'acétone et l'essorage qui s'en suit jusqu'à ce que la solution d'acétonne ne soit plus "savonneuse" au toucher puis, après une dernière filtration par gaze, on laisse sécher une nuit entre deux feuilles de papier filtre. Le lendemain, on frotte le résidu à travers une passoire en nylon en ne récupérant que la poudre fine. Le rendement est d'environ 30 grammes de poudre pour 900 gr de muscle de lapin.

2.2.2 Préparation de l'actine à partir de poudre acétonique

L'actine est extraite de la poudre acétonique à 0°C avec

le tampon G* dans une proportion de 10 gr de poudre I, ou encore 2,5 gr de poudre II, pour 180 ml de tampon glacé. Dans le cas de la poudre acétonique II, il peut être nécessaire d'homogénéiser, à l'aide d'un piston très libre, à une ou deux reprises si la poudre se mouille mal.

Pendant les 30 minutes requises pour l'extraction, il est essentiel d'agiter à la main très fréquemment ou même constamment pour l'obtention d'un meilleur rendement.

L'homogénat obtenu est ensuite filtré sur filtre Buchner, puis le résidu est lavé rapidement avec 70 ml de tampon G, et refiltré. Les deux filtrats sont combinés et centrifugés une heure à 4°C à 140 000 x g. Le surnageant (contenant la G-actine) est ajusté à KCl 0,6M (avec des cristaux de KCl), MgCl₂ 2,0mM et Tris-HCL 10mM à pH8, puis agité faiblement par agitation magnétique 90 minutes à température ambiante de façon à bien polymériser l'actine. Cette étape permet aussi la dissociation de la tropomyosine et des troponines liées à l'actine.

La F-actine obtenue est ensuite centrifugée à 140 000 x g pendant 2 heures à 4°C, puis le culot est remis en suspension dans un petit volume de tampon G (15 à 20 ml par 5 gr de poudre I, ou par 1,5 gr de poudre II) et dialysé à froid à trois reprises pendant 8 à 24 heures contre environ 10 volumes du même tampon. La dépolymérisation complète de la F-actine exige une agitation efficace et constante tout au long de la dialyse.

* Tampon G: ATP 0,2mM
Tris-HCl pH8 2,0mM
β-Mercaptoéthanol 0,5mM
CaCl₂ 0,2mM

Pour parvenir à ce résultat, le système suivant a été utilisé. Le sac à dialyse, dans lequel on a laissé une bulle d'air de 2 à 5 ml, est installé à l'intérieur d'un tube en plexiglass pouvant contenir environ 200 ml de tampon G. Ce tube est fermé aux deux extrémités par des bouchons de caoutchouc emprisonnant du même coup les bouts du sac à dialyse et le tampon. Ce tube est ensuite fixé à un support vertical relié à un moteur assurant une faible révolution au système (environ 5 rpm). A chaque demi tour, le sac se trouve à être inversé et la bulle d'air, en s'élevant, produit une agitation constante à l'intérieur du sac.

Après la période de dialyse, 15 à 20 ml de G-actine sont obtenus (3 à 6 mg/ml) et le tout est centrifugé pendant 2 heures à 140 000 x g et à 4°C dans une ultra centrifugeuse IEC/B-60. Le surnageant clair constitue une G-actine dont la pureté est démontrée par l'obtention d'une bande unique à 42 000 daltons en électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

L'ajout d'azide de sodium à une concentration de 0,02% de même que son entreposage à froid permettront de conserver l'actine-G obtenue pour une période d'environ 10 jours.

2.3 Préparation des membranes cytoplasmiques d'hépatocytes

Nous avons dû, par de nombreux essais, mettre au point une méthode de reproductible de préparation des membranes. Pour des raisons discutées au prochain chapitre, nous avons utilisé la méthode décrite ci-dessous pour la presque totalité des expériences qui seront décrites plus loin.

Pour obtenir, donc, des membranes extraites principalement d'hépato-

cytes, les foies ont été perfusés* de la manière suivante.

Tout d'abord, on anesthésie l'animal au moyen d'une injection intraperitoneale de pentobarbital de sodium à une dose d'environ 45 mg/kg du poids de l'animal. Lorsque ce dernier est bien endormi, on incise son abdomen puis on prépare deux ligatures relâchées, à une distance d'environ 2 cm l'un de l'autre, sur la veine porte préalablement bien dégagée.

A ce moment, on injecte 0,1ml d'héparine (1000 unités U.S.P./ml) dans la veine cave inférieure puis on incise légèrement la partie supérieure de la veine porte, entre les deux ligatures prêtes à être resserrées. On introduit alors rapidement la canule en direction du foie. Aussitôt que les ligatures sont effectuées et que la canule est solidement maintenue, on débute la perfusion et au même moment, on sectionne la veine cave inférieure pour permettre l'évacuation du sang et du liquide de perfusion polué.

* Milieu de perfusion: acide-aspartique 0,1mM
 L-thréonine 0,2mM
 L-sérine 0,3mM
 Glycine 0,5mM
 L-alanine 0,6mM
 acide L-glutamique 0,9mM
 L-glutamine 0,9mM
 KCl 3,0mM
 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,7mM
 MgCl_2 0,5mM
 NaHCO_3 24,0mM
 glucose 20,0mM
 fructose 20,0mM
 sucre 197,6mM

Ce milieu, dont le pH est ajusté à 7,4 avec NaOH et possédant une osmolalité de 308 m OSM/kg doit être conservé à -20°C pour un maximum de 1 mois. D'abord décrit par Berry (12), ce milieu provient des travaux de Howard et Pesh (71), de la solution de Hanks (59), de la formulation de Morgan (112), et de la solution au phosphate de Krebs-Ringer (30).

Le milieu de perfusion doit être continuellement maintenu à 37°C, saturé par une atmosphère de O₂ (à 95%) et de CO₂ et son débit doit être d'environ 15 ml/min (12). La figure 3 nous présente un schéma du montage à être effectué pour obtenir ces conditions.

Lorsque le foie est blanchi et que le liquide expulsé de la veine cave inférieure est clair, on cesse la perfusion puis on dégage le foie en prenant soin de ne pas extraire d'autres tissus que le foie. (Dans le cas d'une préparation de membranes d'hépatocytes de lapin, il est essentiel de bien enlever la vésicule biliaire). On refroidit rapidement le tissu extrait en l'immergeant avec du tampon "A"^{*} à 4°C pour au moins 15 minutes. On peut alors procéder avec diligence à la perfusion d'un autre foie qui viendra rejoindre le premier. (Dans le cas des rats, 3 ou 4 foies sont nécessaires pour obtenir suffisamment de membranes).

La masse de tissu hépatique obtenue est ensuite pesée, puis, émincée avant d'être homogénéisée par petites portions et en présence de 4 volumes de tampon A, dans un Omni-mixer de Sorvall, 1 minute à $\frac{1}{2} V_{max}$. On ajoute ensuite 5 autres volumes de Tampon A à l'homogénat, puis ce dernier est filtré sur 2 épaisseurs de gaze pour éliminer les grosses particules et ensuite centrifugé à 150 x g pendant 10 minutes à 4°C.

* Tampon "A": Sucrose 0,25 M
β-Mercaptoéthanol 10mM
Tris-acétate 5,0mM
PMSF 1mM
pH : 7,1

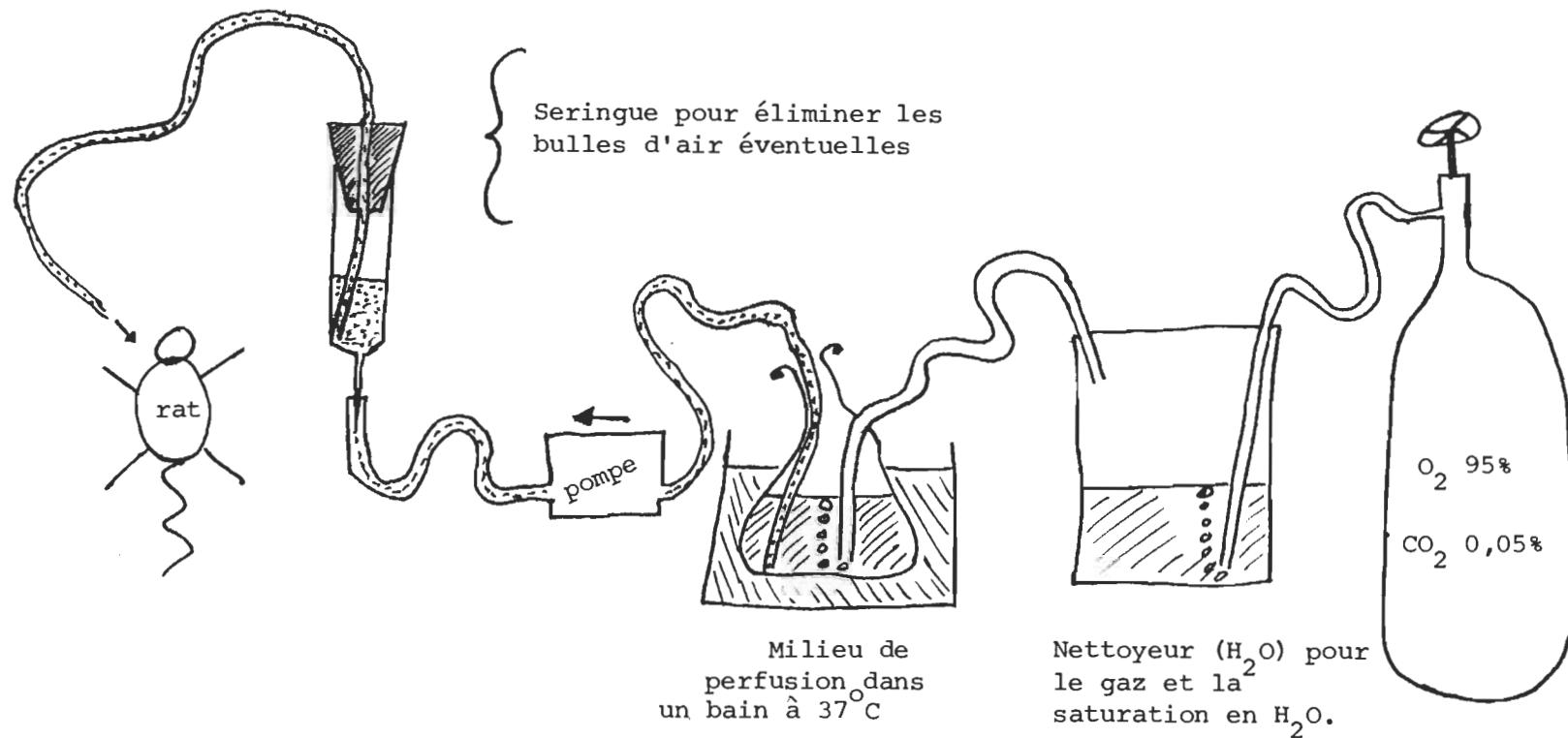


FIGURE 3: Montage à effectuer pour obtenir des conditions idéales de perfusion (Voir le texte pour plus de détails.)

Le surnageant est ensuite recentrifugé 20 minutes à 2500 x g et le culot, qui est alors très tendre, est resuspendu doucement dans 44,3 ml de tampon A au moyen de trois coups d'un piston peu serré sur un homogénéisateur de verre. Le volume d'homogénat est ensuite complété à 144 ml en ajoutant une solution de sucre 2,2M.

Douze ml de la solution obtenue (maintenant à une concentration en sucre de 1,6M) sont déposés dans 6 tubes à centrifuger, puis on leur ajoute successivement et très doucement les solutions suivantes de sucre: 10 ml de 1,37M et 10 ml de 1,20M pour finalement remplir le reste du tube avec de 2 à 3 ml de sucre 0,32M. Ce gradient discontinu de sucre est alors centrifugé dans une ultracentrifugeuse IEC-B60 pour 1 heure et demie à 65 000 x g dans un rotor du type "Swinging Bucket" (SB-110). On recueille ensuite l'interface sucre 1,37-1,20M qui contient notre fraction enrichie en membranes cytoplasmiques d'hépatocytes.

L'interface 1,37-1,20 est ensuite diluée 3 fois avec de l'eau puis centrifugée 30 minutes à 20 000 x g pour précipiter notre suspension de membranes. Les membranes seront ensuite resuspendues dans le tampon désiré (Tampon G sans ATP) et gardées à 0°C jusqu'à utilisation (avant 24 heures généralement). La possibilité de congeler cette suspension et de la réutiliser au besoin existe au même titre que l'utilisation immédiate mais nous avons préféré utiliser une préparation fraîche à chaque fois.

(Cette méthode est basée essentiellement sur les travaux de Fleischer S. et Kervina M. (1974), Meth. Enzymol. XXXI, Fleischer and Packers eds Academic Press N.-Y., pages 6-41.)

2.4 Détermination de la concentration des protéines

2.4.1 Méthode de Biuret

A 4,0 ml d'une solution commerciale de réactif de Biuret ajouter 5,0 ml d'eau et 1,0 ml de la solution de protéines à doser. Incuber 30 minutes à température ambiante et lire l' $A_{550\text{nm}}$ contre un blanc sans protéines.

La méthode a été calibrée avec l'albumine de sang bovin pour laquelle $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 3.0$. * Pour l'actine, $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2.9$.

Cette méthode peu sensible n'est en général employée que pour des solutions possédant des concentrations de protéines supérieures à 1 mg/ml et n'a été utilisée que pour déterminer la concentration de l'actine suite à sa purification.

2.4.2 Méthode du Bio-Rad

Cette méthode simple permet de doser des quantités de protéines variant de 20 à 140 μg et elle utilise le réactif concentré commercialisé sous le nom de Bio-Rad.

Dans une éprouvette, on dépose 10 à 15 μg de protéi-

* Le $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ est calculé pour la concentration en protéines du milieu réactionnel après la réaction colorimétrique. Le même calcul de $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ s'appliquera pour les deux prochaines méthodes colorimétriques.

nes dont on veut déterminer la concentration, puis 2,5 ml de réactif dilué *. Après une agitation au vortex et une incubation d'une vingtaine de minutes, on mesure l' $A_{595\text{nm}}$ des différents échantillons. La coloration démeurera fixe entre 5 minutes et 1 heure après l'ajout du réactif. On utilise l'albumine du même sérum bovin ou encore l'actine-G pour l'établissement de la courbe standard, $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 500$ pour le milieu réactionnel.

Cette méthode a été utilisée lors des essais de marquage de l'actine par ${}^3\text{H}\text{-ATP}$.

2.4.3 Dosage de la concentration des protéines membranaires (Méthode Folin-Lowrey)

Les protéines membranaires ne peuvent pas être mesurées directement. On doit tout d'abord les séparer des autres constituants membranaires avant d'effectuer leur dosage.

On dépose d'abord 0,2 ml de la suspension de membranes dans un tube conique dans lequel on ajoute 2,0 ml de TCA 10%. Après une incubation de 30 minutes sur la glace de façon à bien précipiter les constituants membranaires protéiques, le tube est centrifugé 10 minutes à 3000 rpm. Le cuillot obtenu est lavé à deux reprises avec 2,0 ml de TCA 10% pour être ensuite resuspendu dans 1,0 ml de NaOH 0,1N. (Il peut être nécessaire de chauffer pour bien dissoudre). La méthode décrite par Lowry (98) peut ensuite être appliquée.

*

Le réactif concentré est dilué 5 fois avec H_2O et ensuite filtré sur papier Whatman # 1 avant d'être utilisé. Dilué, ce réactif ne se conserve pas plus de 2 semaines à froid.

A 2,0 ml de solution A*, on ajoute 0,4 ml de la solution de culot resuspendu et on laisse incuber 10 minutes. On ajoute ensuite 0,2 ml de réactif au phénol fraîchement dilué de moitié et on mesure l' $A_{750\text{nm}}$ après avoir laissé la couleur se développer 30 minutes.

Différentes concentrations de SAB sont utilisées pour l'établissement de la courbe standard.

Cette méthode est excellente pour doser de petites quantités de protéines. Le $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ calculé est d'environ 200 dans les conditions décrites.

Un article de Lague (86) peut permettre d'obtenir plus d'informations sur cette méthode ainsi que sur la méthode du Biuret. La préparation des différents réactifs y est d'ailleurs donnée, de même que les mécanismes chimiques qui entrent en jeu.

2.4.4 Dosage Spectrophotométrique

Une méthode encore plus simple que nous avons aussi utilisée est simplement basée sur le coefficient d'extinction d'une protéine purifiée. Ainsi;

*

Solution A: 0,5 ml de tartrate de sodium et de potassium à 2% est ajouté à 0,5 ml de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ à 1% et le volume du mélange est complété à 50 ml avec une solution de Na_2CO_3 2% dans NaOH 0.1N. Cette solution doit être préparée juste avant son utilisation. Chacune des trois solutions nécessaires à sa formation peuvent néanmoins se conserver séparément au réfrigérateur pendant assez longtemps.

$E_{1cm}^{1\%}$	Longueur d'onde (nm)	Substance	Référence
12,3	280	DNAse I	(106)
11,5	280	F-Actine	(53)
11,1	280	G-Actine	(53)
6,2	290	G-Actine	(53)

et, d'après Gordon et coll. (53), la mesure de la concentration de la G-actine à 290 nm nous donne une meilleure précision que celle effectuée à 280 nm. Il est par contre difficile d'utiliser cette méthode lorsque la solution est turbide car elle pourrait nous amener à des conclusions erronées.

2.5 Dosage de l'orthophosphate

La méthode utilisée pour la détermination colorimétrique du phosphate inorganique a été élaborée par Itaya en 1966 (72) et par la suite améliorée par Tashima et Yoshimura en 1975 (153). Elle est basée sur le principe de la formation, à faible pH, d'un complexe du vert de Malachite avec le phosphomolybdate. La formation de ce complexe produit une modification importante de la longueur d'onde d'absorption maximale. Cette méthode permet d'augmenter d'un facteur de 30 la sensibilité de la méthode généralement utilisée et mise au point par Fiske-Subbarow en 1925 (46).

Pour déterminer la quantité de phosphate organique lié à l'actine lors de la phosphorylation de l'actine par les membranes cytoplasmiques d'hépatocytes, la technique de minéralisation décrite par Ames et Dubin (3)

a été appliquée après l'élimination des membranes par centrifugation à 20 000 x g.

Il s'agit donc, tout d'abord, de prélever aux temps choisis un volume de milieu réactionnel contenant 0,5 mg d'actine et de le déposer dans des tubes coniques de 1,5 ml. Ces tubes sont immédiatement refroidis sur la glace puis centrifugés à 20 000 x g pendant 30 minutes à 4°C de façon à précipiter les membranes en suspension dans le milieu réactionnel. On prélève ensuite un volume de surnageant, correspondant à la moitié du volume total centrifugé (soit 0,25 mg d'actine), qui est déposé dans un tube conique de verre* d'une capacité de 5 ml dans lequel on ajoute 1,0 ml de TCA 10% de façon à précipiter l'actine ou encore d'autres protéines s'il y a lieu.

A cette étape, on peut congeler ces échantillons et ne poursuivre la procédure que plusieurs jours plus tard, ou encore procéder immédiatement après une incubation de 10 minutes à froid. Le précipité obtenu est alors centrifugé à 3000 x g pendant 10 minutes, puis le culot est lavé à deux reprises avec 2,0 ml de TCA 10%.

La minéralisation du précipité d'actine est obtenue de la façon suivante: après avoir rejeté le surnageant du deuxième lavage, on ajoute 50 µl d'une solution de $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ à 10% (Cette solution est préparée

*

Toute la vaisselle servant à cette méthode de détermination de l'orthophosphate aura été préalablement lavée à l'acide sulfochromique et abondamment rincée de façon à éliminer toute trace de phosphate qui pourrait interférer avec les résultats du dosage (Voir résultats).

avec de l'éthanol comme solvant) de façon à bien recouvrir le culot. On évapore ensuite à sec sur une forte flamme avec une agitation rapide. On chauffe ensuite jusqu'à disparition de fumées brunes. A cette étape, tout le phosphore organique (phosphoprotéines, nucléotides, phospholipides, etc...) est transformé en pyrophosphate. L'étape suivante vise à transformer ce dernier en orthophosphate.

Lorsque le tube est refroidi, 0,3 ml de HCl 1N y sont ajoutés et après avoir déposé une bille de verre sur le tube à titre de bouchon, on plonge le tube dans un bain d'eau bouillante pendant 15 minutes.

Lorsque le tube est refroidi, on complète son volume à 2,0 ml avec H_2O , puis, suite à une centrifugation de 2 minutes à 3000 x g, le surnageant est retiré avec soin à l'aide d'une pipette Pasteur et déposé dans des tubes pré-identifiés. On peut alors doser immédiatement cette solution ou encore la congeler et procéder au dosage plus tard sans influencer les résultats.

Le dosage de l'hydrolysat obtenu, ou encore de toute autre solution non traitée et contenant de l'orthophosphate, s'effectue en ajoutant 1 volume de réactif au paramolybdate* à 2 volumes de solution à doser. On

*

Réactif au paramolybdate: Ce réactif est préparé en ajoutant lentement, en agitant, un volume d'une solution aqueuse de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ à 3% à un volume de vert de malachite 0,06% dans HCl 6N. Chacune de ces deux solutions peut se conserver quelques mois à température de la pièce. Le réactif peut se conserver 1 à 2 mois à température ambiante en prenant soin par contre de le filtrer avant son utilisation s'il n'est pas tout à fait limpide.

incube ensuite 30 minutes à température de la pièce pour permettre le développement complet de la coloration verte puis on mesure l' $A_{650\text{nm}}$.

Les courbes de calibrations obtenues sont linéaires jusqu'à $10\mu\text{M}$, une concentration en phosphate de $3\mu\text{M}$ dans le milieu auquel on désire appliquer cette méthode de dosage correspondra à une A_{650} d'environ $0,16\text{cm}^{-1}$.

2.6 Détermination du ^{32}P

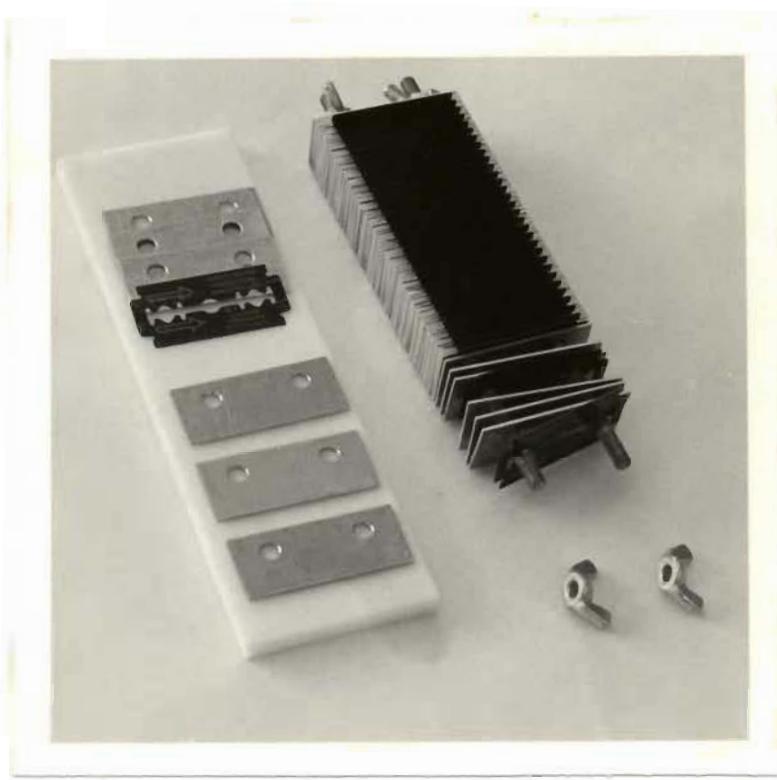
Les échantillons contenant l'isotope ^{32}P ont été traités de deux façons. La première méthode a été la déposition de $50\mu\text{l}$ de la solution aqueuse radioactive dans des fioles à scintillation de 20 ml où se trouvait au préalable 15 ml de scintillant de Bray.

La seconde méthode fut l'analyse de la radioactivité contenue dans des sections découpées de bandes d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Le découpage a été effectué à l'aide d'un appareil* de notre fabrication (figure 4). Les sections obtenues ($1\text{cm} \times 0,3\text{ cm} \times 0,2\text{ cm}$) seront ensuite déposées dans des fioles à scintillation où seront ajoutés 10 ml de scintillant Formula A-950.

*

Cet appareil consiste en des lames de rasoir écartées régulièrement de 3 mm par des séparateurs de 1 mm d'épaisseur. Le tout monté sur 2 essieux dont les bouts sont retenus par des écrous amovibles. Ceci permet de varier la largeur entre deux lames par l'insertion d'un ou plusieurs séparateurs. Au moment de découper les gels, déjà séparés en bandes individuelles de migration, on les dépose sur une plaque de Teflon puis l'appareil à découper est pressé fermement sur le gel. On obtient ainsi des sections identiques.

FIGURE 4: Appareil servant au découpage des bandes d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Il s'agit de lames de rasoir séparées également à des distances réglables au moyen de séparateurs de 1mm. La base blanche est en téflon.



Les fioles à scintillation ont été comptées à l'aide d'un compteur à scintillation "Rack Beta 1200" de LKB et les conditions de comptage utilisées sont celles décrites pour une lecture optimale par les fabricants de l'appareil.

2.7 Séparation et identification de l'ATP et de ses dérivés adénylés

Au cours de notre expérimentation, il a été nécessaire de vérifier le rythme de disparition de l'ATP ainsi que celui de l'apparition des produits obtenus. La méthode utilisée est l'adaptation d'une technique de Magasanik (99) où la chromatographie descendante sur papier servait de support à la séparation et à l'identification des nucléotides.

A un volume déterminé de milieu réactionnel, ayant ou non subi différents traitements et contenant initialement de l' ^{3}H -ATP marqué en position 2 ou 8 du noyau adényl, on ajoute un volume égal de TCA 10% dans le but de précipiter les protéines et de détacher le nucléotide lié à l'actine-G. Cette solution est immédiatement congelée dans des tubes à centrifuger de 1,5 ml puis, au moment d'effectuer la déposition, décongelée et centrifugée à 300 x g pendant 10 minutes de façon à obtenir un surnageant libre de particules en suspension et contenant l'ATP et ses dérivés. Un volume de 50 μl de ce surnageant est ensuite déposé sur du papier à chromatographie # 1 de Whatman suite à la prédéposition de 5 μl de solution standard*.

* Solution Standard:

ATP 20mM
ADP 20mM
AMP 20mM
Adénosine 20 mM
Adénine 40 mM

Les dépôts sont faits sur une feuille de 22 cm x 46 cm à une distance de 3 cm l'un de l'autre et à 7 cm de la partie supérieure du papier. Le papier est ensuite placé dans un bain dont le réservoir supérieur ainsi que le fond contiennent un mélange d'acide isobutyrique: hydroxyde d'ammonium: EDTA 0,1M : eau dans les proportions 66:1:1:32. Après environ 16 heures de migration descendante sur une distance de 30 à 35 cm, le papier est retiré du bain et séché sous la hotte par exposition à une lampe infrarouge de 250 watts. La révélation des taches correspondant aux standards est obtenue par l'illumination du papier par une lampe U.V. lointains. Les spots obtenus sont marqués au crayon de plomb puis les distances de migration calculées.

Deux méthodes ont été utilisées pour la détermination des produits radioactifs. Tout d'abord, la bande de papier correspondant à la migration de chacun des dépôts peut être découpée en segments de 0,5 à 1,0 cm qui sont déposés individuellement dans des fioles à scintillation et recouverts de 10 ml de scintillant au toluène* (121).

La seconde méthode est, sinon plus précise, du moins plus économique en temps et en matériel. Il s'agit de ne compter que les spots contenant l'ATP et ses dérivés, en déposant chaque spot, préalablement découpés en petits morceaux, dans une fiole à scintillation. On ajoute ensuite 1,0 ml de HCL 0,1N pour permettre aux dérivés adénylés de s'extraire du papier pendant une nuit puis on ajoute 10 ml de scintillant Formula A-950.

* Scintillant au toluène: - diphenyloxazole (PPO) 1%
- POPOP 0,025%
- dans toluène grade scintillation ou "Sulfur Free"

Dans les deux cas, le comptage sera effectué sur un compteur à scintillation liquide β dans les conditions optimales suggérées par les fabricants de l'appareil.

2.8 Dosage de la DNase I pancréatique

Les conditions pour la mesure de l'activité de la DNase I pancréatique (EC 3.1.4.5) par le test d'hyperchromicité ont été décrites précédemment par Kunitz (81), de même que par Lindberg (94) en ce qui a trait à l'activité inhibitrice de l'actine sur cet enzyme. Mais la méthode que nous avons adoptée pour le présent travail s'inspire principalement des travaux de Blikstad (14).

Il s'agit tout d'abord de prélever entre 20 et 50 μl de milieu réactionnel contenant environ 1 μg de l'enzyme à doser (voir résultats) puis de les déposer dans une cuvette de 3,5 ml. On lui ajoute ensuite 3,0 ml de substrat* puis, après un brassage rapide par quelques inversions, l'augmentation de l'absorbance à 260 nm est enregistrée pendant 3 à 4 minutes. La pente de la portion droite de la courbe obtenue est directement proportionnelle à la quantité d'enzyme présent dans le milieu. On peut alors, au moyen d'une courbe standard, déterminer avec une assez bonne précision la quantité de DNase I libre. (Voir résultats)

*

Substrat: 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de DNA dans MgSO_4 4mM
CaCl₂ 2mM et Tris 1M, le pH étant ajusté à 7,5 avec HCl.

2.9 Electrophorèse sur plaque de gel de polyacrylamide

La méthode d'électrophorèse sur plaque que nous utiliserons ici est tirée d'un article de O'Farrel (119) et présente une amélioration mécanique de celle décrite par Laemmli (84) en ce qui a trait aux solutions stock et aux concentrations de gel utilisées. Toutes ces solutions stock* sont préparées et gardées au froid (4°C).

Pour préparer le gel de migration, la technique consiste à mélanger les solutions A, B ainsi que l'eau (dans les proportions indiquées à la table du tableau IV) dans une fiole à vide Erlenmeyer puis à dégazer 5 minutes avec une pompe à eau. Les solutions D et E sont ensuite ajoutées puis, après un léger brassage rapide, on dépose promptement, à l'aide soit d'une pipette ou d'une seringue, le mélange final entre les deux plaques de verre déjà montées sur leur support. Cette opération doit être effectuée rapidement mais un grand soin doit être pris pour éviter que des bulles d'air ne soient emprisonnées à l'intérieur du gel. Ce dernier, d'environ 8 cm de hauteur, sera ensuite recouvert avec précaution de 2 ml d'eau

*

Solutions Stock: Toutes ces solutions sont aqueuses.

Solution A: Tris-HCl 1,5M à pH 8,8 et SDS 0,4%

Solution B: Acrylamide 30% et bis-acrylamide 0,8%

Solution C: Tris-HCl 0,5M à pH 6,8 et SDS 0,4%

Solution D: Persulfate d'ammonium à 10%

Solution E: TEMED 5% $\frac{V}{V}$

N.B.: Les solutions D et E sont préparées juste avant leur utilisation.

Tableau IV

Préparation des gels de migration
et de compression pour électrophorèse
sur gel de polyacrylamide

Solution	Contenu de la solution	Préparation de 25,0 ml de Gel de migration à 10%		Préparation de 100 ml de Gel de compression à 3,5%	
		concentration finale	volume de solution stock (ml)	Concentra-tion finale	Volume de solution stock (ml)
A	Tris-HCl pH8,8 SDS	0,375M 0,1%	6,25	-	-
B	Acrylamide Bis-acrylamide	10% 0,27%	8,33	3,5% 0,094%	1,17
C	Tris-HCl pH6,8 SDS	- -	-	0,125M 0,1%	2,50
D	Persulfate	0,033%	0,082	0,03%	0,03
E	TEMED	0,05% V/V	0,25	0,10% V/V	0,20
H ₂ O	-	-	10,09	-	6,10

N.B.: Pour la préparation d'un gel de migration à 12 ou à 15%, seule les quantités de solution B et d'eau seront modifiées en conséquence.

La composition des solutions A, B, C, D et E est décrite au bas de la page 53.

puis laissé à polymériser pendant une heure. L'eau est alors rejetée puis remplacée par 5 ml de la solution A diluée 4 fois. On peut ici laisser pour la nuit, ou utiliser immédiatement.

L'opération suivante consiste à enlever ce tampon pour lui substituer le gel de compression (3,5%) préparé de façon identique à celle décrite plus tôt pour le gel de migration. Après une polymérisation de 30 à 60 minutes, on dépose le support de la (ou des) plaque(s) dans la cuve de l'appareil contenant déjà entre 1 et 2 litres de tampon glycine* de façon à ce que la partie inférieure du gel soit en contact avec le tampon glycine. Autant au début qu'en cours d'électrophorèse, ou devra veiller à ce qu'aucune bulle ne vienne interférer avec ce contact gel-liquide. On ajoute ensuite suffisamment du même tampon dans la cavité supérieure du support de façon à ce que le gel de compression en soit aussi recouvert. Le peigne est alors retiré doucement puis de 30 à 75 μ l des échantillons **

* Tampon glycine: Tris 0,025M, Glycine 0,192M et SDS 0,1%, le tout ajusté à un pH de 8,3 avec HCl.

**

Traitements des échantillons pour électrophorèse:

Immédiatement après leur retrait des différents milieux réactionnels, les échantillons se voient ajoutés 1/3 de leur volume de la solution suivante: Tris-HCl 0,25M, pH6,8, SDS 8%, glycérol 40% et β -Mercaptoéthanol 20%. Les échantillons sont alors bouillis 2 minutes puis congelés à -20°C jusqu'au moment choisi pour effectuer l'électrophorèse. A ce moment, on leur ajoute 0,06 volume d'une solution de bleu de bromophénol à 0,04% qui servira comme indicateur visuel pour la progression de la migration.

(20 µg de protéine) sont déposés dans les puits formés par son enlèvement et submergés par le tampon glycine. Suite à la déposition des échantillons à analyser, on applique aux bornes de l'appareil un courant continu équivalent à 40 mA par plaque de gel. Lorsque la migration du bleu de bromophénol est complétée, ce qui peut prendre de 1½ à 3 heures selon les gels, l'alimentation est coupée, les gels sont dégagés des plaques de verre et plongés dans un bain de coloration. La coloration et la décoloration sont effectuées selon la technique développée par Fairbanks et coll.
 (43). *

Après cette étape, les gels sont photographiés, passés au densitomètre ou encore découpés en sections et comptés pour la radioactivité.

2.10 Polymérisation de l'actine

La méthode utilisée pour polymériser l'actine-G en actine F est très simple. Il s'agit d'ajouter à un volume de solution d'actine-G dans son tampon normal (G) un vingt-neuvième (1/29) de volume de la solution

* Technique de coloration et de décoloration des gels:

Aussitôt qu'ils sont retirés de l'appareil, les gels sont plongés dans un bain contenant une solution aqueuse de Isopropanol 25%, acide acétique 10% et de bleu de coomassie 0,025%. Après une nuit, cette solution (qui peut être réutilisée à quelques reprises) est remplacée successivement pour des périodes de 24 heures par les 3 solutions aqueuses suivantes:

- 1) Isopropanol 10% et acide acétique 10%
- 2) acide acétique 10%
- 3) idem à 2).

Les gels pourront être gardés dans cette dernière solution quelques jours avant leur analyse. Une attente trop longue amène une diminution de l'intensité des bandes et éventuellement leur disparition.

de polymérisation*. La polymérisation de l'actine s'effectue alors rapidement.

Deux méthodes basées sur des principes entièrement différents ont permis de suivre la cinétique de cette polymérisation de même qu'elles ont été utilisées pour l'étude de la perte de polymérisabilité de l'actine.

La première de ces méthodes, la viscosimétrie, est mesurée à une température choisie dans un viscosimètre Ostwald semimicro à capillaire (type 150, Cannon Instrument Company), avec des temps d'écoulement de 30-35 secondes pour le tampon-G à 21°C (58). La viscosité spécifique est calculée à l'aide de l'expression suivante:

$$\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1 = \left\{ \frac{\text{Temps d'écoulement solution}}{\text{Temps d'écoulement solvant}} \right\} - 1$$

Cette formule ne tient pas compte ici des différences de densité entre le solvant et les solutions d'actine car ces différences sont négligeables.

La diffusion de la lumière constitue la seconde méthode. Il s'agit ici d'enregistrer la diffusion de la lumière à 90° à travers l'échantillon en utilisant comme standard l'actine-G et l'actine-F, correspondant chacune à une polymérisation de 0 et 100%, respectivement. Cette mesure

* Solution de polymérisation: Tris-HCl 0,542M à pH8 KCl 3,0M et MgCl₂ 30mM. Un vingt-neuvième de volume de cette solution ajouté à de l'actine-G permet d'obtenir les conditions optimales pour la polymérisation rapide de l'actine, soit: KCl 0,1M, MgCl₂ 1,0mM et Tris-HCl 20,0mM.

a été effectuée à l'aide d'un spectrofluorimètre (Perkin-Elmer MPF-2A) à une longueur d'onde de 400 nm à 21°C.

2.11 Marquage de l'actine-G au moyen de $\{^3\text{H}\}$ -ATP

Il nous a été nécessaire d'obtenir de l'actine-G-ATP marquée(c-à-d possédant un tritium sur le noyau adényl de l'ATP) de façon à pouvoir suivre la cinétique de l'enlèvement du nucléotide lié ainsi que les diverses formes que ce dernier peut prendre lors de son hydrolyse.

Pour procéder au marquage, il faut tout d'abord dialyser l'actine-G fraîche pendant 24 heures contre du tampon G dont la concentration en calcium a été diminuée de 4 fois* de façon à obtenir des conditions plus efficaces pour l'échange ultérieur de l'ATP lié avec l' $\{^3\text{H}\}$ -ATP du milieu (147).

A cette actine-G, on ajoute 1/6 de volume de Dowex I-X8 (200-400 mesh)** en suspension dans le tampon de dialyse sans ATP. Le mélange obte-

* Si une forte concentration d'actine n'est pas requise, on peut alors diluer la solution d'actine-G avec du tampon G sans calcium. L'effet obtenu est le même.

** Le Dowex I-X8 (200-400 mesh) est conditionné selon une procédure impliquant deux lavages successifs (le premier basique avec NaOH 1M, l'autre acide avec HCL 1M), suivis d'un rinçage intensif à l'eau. Une fois ainsi traité, on le conserve dans une suspension 1:1 avec du tampon-G sans ATP. Juste avant de l'utiliser, le Dowex est lavé à plusieurs reprises avec ce même tampon par une série de 5 centrifugations, un volume de tampon est ajouté à un volume de culot qui est alors bien agité pour obtenir une suspension homogène.

nu est agité 5 minutes à froid puis centrifugé 2 minutes à 3000 x g. Le surnageant est alors filtré par succion sur papier filtre pour éliminer toute trace de dowex. Au filtrat, on ajoute immédiatement de l'ATP enrichi de $\{^3\text{H}\}$ -ATP de façon à obtenir une concentration molaire d'ATP libre équivalant à 10% de la concentration d'actine-G.

Après 30 minutes d'incubation sur la glace, on élimine tout l'ATP libre par un autre passage rapide au dowex. La solution d'actine-G obtenue est alors rendue aux conditions normales de conservation de l'actine-G par l'ajout de Ca^{2+} et d'ATP non radioactif, puis utilisée immédiatement.

Il est à noter qu'une variante de cette méthode pourrait simplement être une incubation d'une nuit de l'actine-G en présence d' $\{^3\text{H}\}$ -ATP dans les conditions normales de Ca^{2+} . Un rapide passage au dowex permettrait ensuite l'élimination du $\{^3\text{H}\}$ -ATP libre et l'utilisation immédiate de l'actine marquée obtenue. Ces deux méthodes doivent être aussi valables l'une que l'autre quoique nous n'ayons utilisé que la première.

CHAPITRE III

3. RESULTATS

Ce chapitre sera présenté en deux sections distinctes, la première étant axée sur le travail effectué lors de la mise au point des méthodes qui n'étaient pas familières au laboratoire où il a été exécuté. Nous y verrons l'élaboration, étape par étape, des techniques finales décrites dans le chapitre précédent.

La seconde section présentera les résultats obtenus lors des expériences concernant l'effet des membranes d'hépatocytes sur l'ATP lié à l'actine et sur les nucléotides libres du milieu réactionnel.

3.1 Mise au point des méthodes

L'obtention des résultats qui seront présentés dans les deux sections suivantes n'aurait pu survenir sans un long et parfois fastidieux travail de mise au point des méthodes différentes de celles antérieurement pratiquées dans ce laboratoire. Quoique pour la plupart décrites dans la littérature scientifique, ces techniques ont dû être adaptées et même modifiées selon les besoins encourus et en accord avec le budget disponible de même qu'en fonction des appareils à notre disposition.

Cette section n'est donc essentielle que dans la mesure où l'on se doit d'expliquer le choix de telle ou telle procédure en tenant compte des facteurs limitants énoncés plus tôt et finalement surtout pour éviter à d'autres les pièges que l'élaboration des méthodes finales a nécessairement comportés.

3.1.1 Préparation des membranes cytoplasmiques d'hépatocytes

Sans vouloir anticiper la présentation des résultats de la section 3.2 sur la phosphorylation de l'actine, il est essentiel de préciser que ces résultats se sont avérés fort décevants dans le sens que non-conformes aux résultats obtenus par Grazi (55). Ce manque de phosphorylation nous a amené tout d'abord à suspecter notre préparation de membrane comme étant possiblement le, ou un des facteurs responsables de cet état de fait.

Nous avons donc tenté, et ce par diverses modifications de la préparation initiale, d'obtenir une suspension membranaire capable de phosphoryler l'actine. Les deux éléments majeurs de ces essais sont les suivants: 1) l'homogénéisation et le bris mécanique des hépatocytes et 2) les conditions de reflotaison sur gradient discontinu de sucre.

Le tableau V nous permet de comparer chacune des modifications essayées. On peut constater que toutes, sauf la méthode # 5 de Stein (143) utilisée par Grazi (54, 55) ont débuté par la perfusion du foie. Cette perfusion préalable ne pouvant qu'augmenter la pureté des membranes cytoplasmiques d'hépatocytes en éliminant au maximum toute trace de membranes d'érythrocytes, nous avons jugé préférable de la conserver dans la méthode fi-

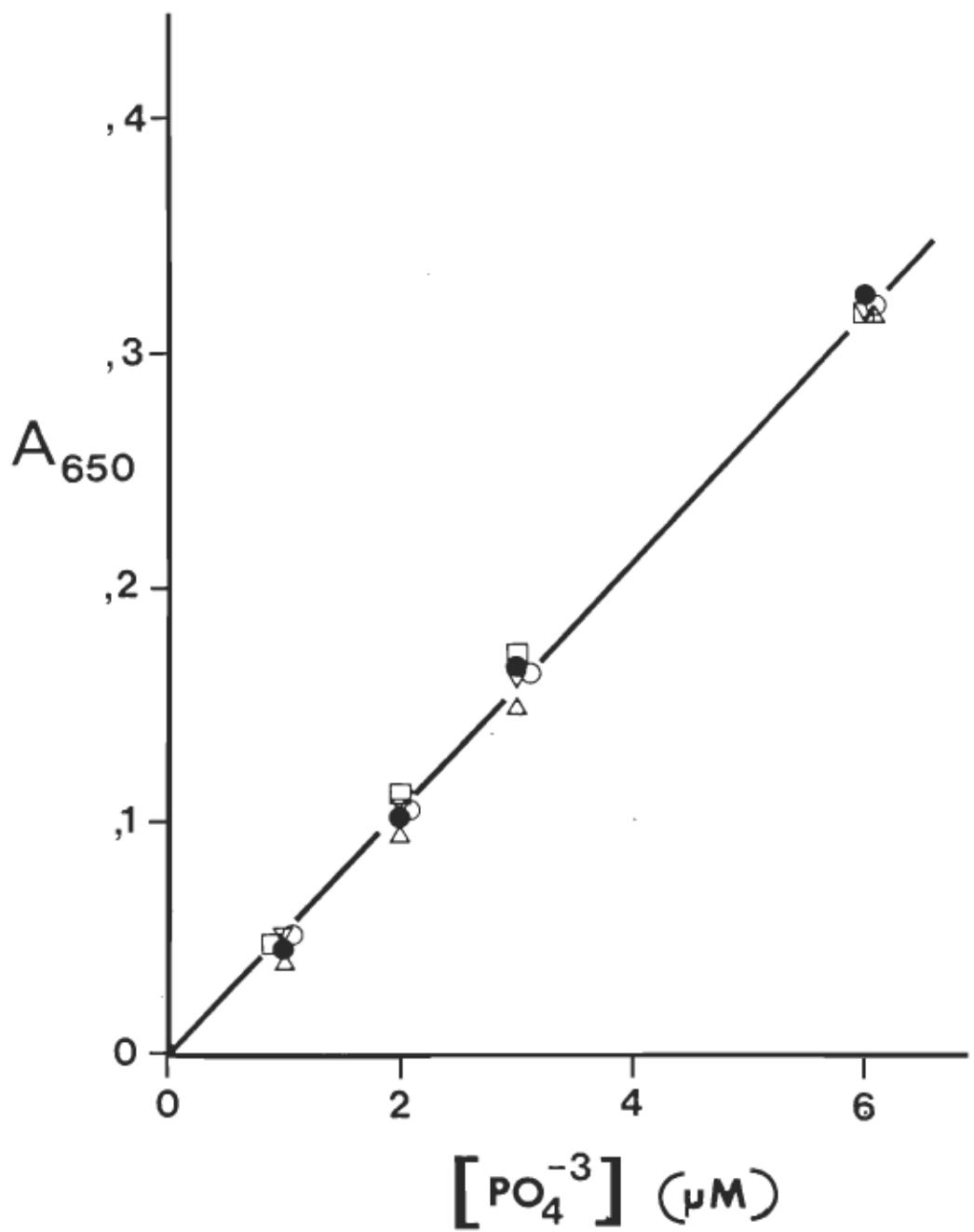


Tableau V
Préparations différentes de membranes plasmiques de foie

N° Préparation	Perfusion	Homogénéisation		Centrifugations sur gradient discontinu			Animal testé
		Tampon	Description	Phases de Sucrose (M)	Rotor #	Vitesse et temps	
1	OUI	A	Omni-mixer (Sorvall) 1 minute à 1/2 Vmax (8 volumes de tampon)	1,6--1,4--1,25--0,32	#1	23 000rpm 1,5 heure	Rats et lapin
2	OUI	A	12 coups piston teflon serré (8 vol. de tampon)	idem à 1	#1	idem 1	Rat
3	OUI	A	12 coups piston de verre serré (8 vol.)	idem à 1	#1	idem 1	Rat
4	OUI	B	idem à 3	idem à 1	#1	idem 1	Rat
5	NON	C	Omni-mixer 1 min à ½ Vmax 30sec à Vmax, (5 vol.)	2 gradients: 1) 1,6M-0,25M MgCl ₂ 2) 1,6M-0,25M (EDTA)	-	45 000rpm 45 min	Rats et lapin
6	OUI	D	Omni-mixer 1min à Vmax puis 4 à 5 coups teflon, (5 vol.)	1,6--1,37--1,25--0,25	#2	21 000rpm 1,5 heure	Lapin et rats

N.B.: - Rotor: #1 = petit "Swinging bucket" NO SB-283

#2 = gros "Swinging bucket", NO SB-110 de IEC

- La préparation N°5 a été fidèlement reproduite de Stein (143). (Méthode utilisée par Grazi)

Tampon A: NaHCO ₃ 1mM	Tampon B: Sucrose 0,25M	Tampon C: Sucrose 0,25M	Tampon D:
PMSF 1mM	MgCl ₂ 1,0mM	pH 7,5	Sucrose 0,25M
EDTA 1mM	pH 7,5		β-Mercaptoéthanol 10mM
ph 7,6			Tris-acétate pH 7,1
			PMSF 1mM

nalement adoptée (Méthode # 6) et précédemment décrite en détail à la section 2.3

Par ailleurs, on peut remarquer sur le tableau V que les tampons de même que les types d'homogénéisation ont été légèrement modifiés d'une préparation à l'autre. Mais qu'on ait utilisé une méthode autant ionique que mécanique de rupture des cellules, par exemple en favorisant le "clumping" à l'aide de $MgCl_2$ (Méthodes 4 et 5) ou encore en favorisant l'éclatement des cellules à faible pression osmotique (Méthode 1, 2 et 3) ou même par une méthode où le tampon d'homogénéisation ne devient qu'un support passif au bris mécanique (Méthode # 6), dans tous les cas les résultats de la phosphorylation de l'actine se sont avérés négatifs.

En ce qui a trait aux étapes subséquentes à l'homogénéisation, très peu de modifications par rapport à la méthode originale ont été apportées, sauf pour la méthode # 5, où les membranes sont obtenues par une série de lavages par reflotaison, ce qui rallonge la dernière étape de préparation sans modifier la préparation de membranes ou encore son rendement de purification.

La décision, donc, d'utiliser la méthode de préparation # 6 repose essentiellement sur le fait qu'elle présente une combinaison optimale de 2 facteurs, soit le meilleur rendement de toutes les méthodes (Voir tableau VI) autant pour le lapin que pour le rat, et soit une durée réduite de préparation, environ 6 heures.

Tableau VI

Rendements obtenus pour les différentes méthodes de préparation de membranes plasmiques de foie

Méthode	Animal	Poids de foie (g)	Rendement (mg de protéines membranaires / g de foie)	Temps d'exécution (heures)
1	1 rat	8,9	0,76	7
1	1 lapin	72,8	0,24	7
1	4 rats *	21,8	1,25	7
1	1 rat *	1,85	0,82	7
2	1 rat *	1,67	0,38	7
3	1 rat *	1,89	0,52	7
4	1 rat *	1,95	0,32	7
5	2 rats	8,0	1,23	8
6	1 lapin	75,0	0,79	6
6	6 rats	17,0	1,25	6

N.B.: Les astérisques indiquent que ces 4 méthodes ont été exécutées simultanément en séparant en 4 portions le foie d'un seul rat.

Mentionnons enfin que les culots récoltés après la centrifugation de la dernière étape de nos préparations étaient typiquement blancs, quoique parfois légèrement contaminés par différentes quantités d'un matériau brun, selon les différentes préparations.

La microscopie électronique de la préparation finale nous révèle la présence de grands feuillets de membranes contenant un niveau modéré de mitochondries, d'éléments de l'appareil de Golgi et de réticulum endoplasmique. Ceci correspond bien aux résultats obtenus par la caractérisation biochimique de cette préparation.*

La fraction membranaire que nous avons utilisée consiste donc en une fraction enrichie en membranes cytoplasmiques. C'est à cette préparation qu'il faudra se référer tout au long du présent travail lorsque des expressions telles: préparation de membranes, suspension de membranes ou encore membranes, seront utilisées.

3.1.2 Détermination de l'orthophosphate

La méthode de détermination colorimétrique de l'orthophosphate qui a été utilisée ici a déjà été décrite au chapitre précédent (sec. 2.5). Certains aspects d'une manipulation fréquente et dans différentes conditions n'ont toutefois pas été mentionnés par les auteurs de cette méthode (72, 153). Le but de cette section est donc de combler cer-

*

Je remercie ici le Dr. H.-M. Therien pour son travail effectué en microscopie électronique de même que pour la caractérisation biochimique des membranes utilisées lors de nos essais. Pour plus de détail, consulter Gruda et coll. (58).

tains détails d'utilisation générale qui ne sont mentionnés nulle part ailleurs mais qui pourraient causer certains problèmes ou soulever quelques questions pour un autre utilisateur.

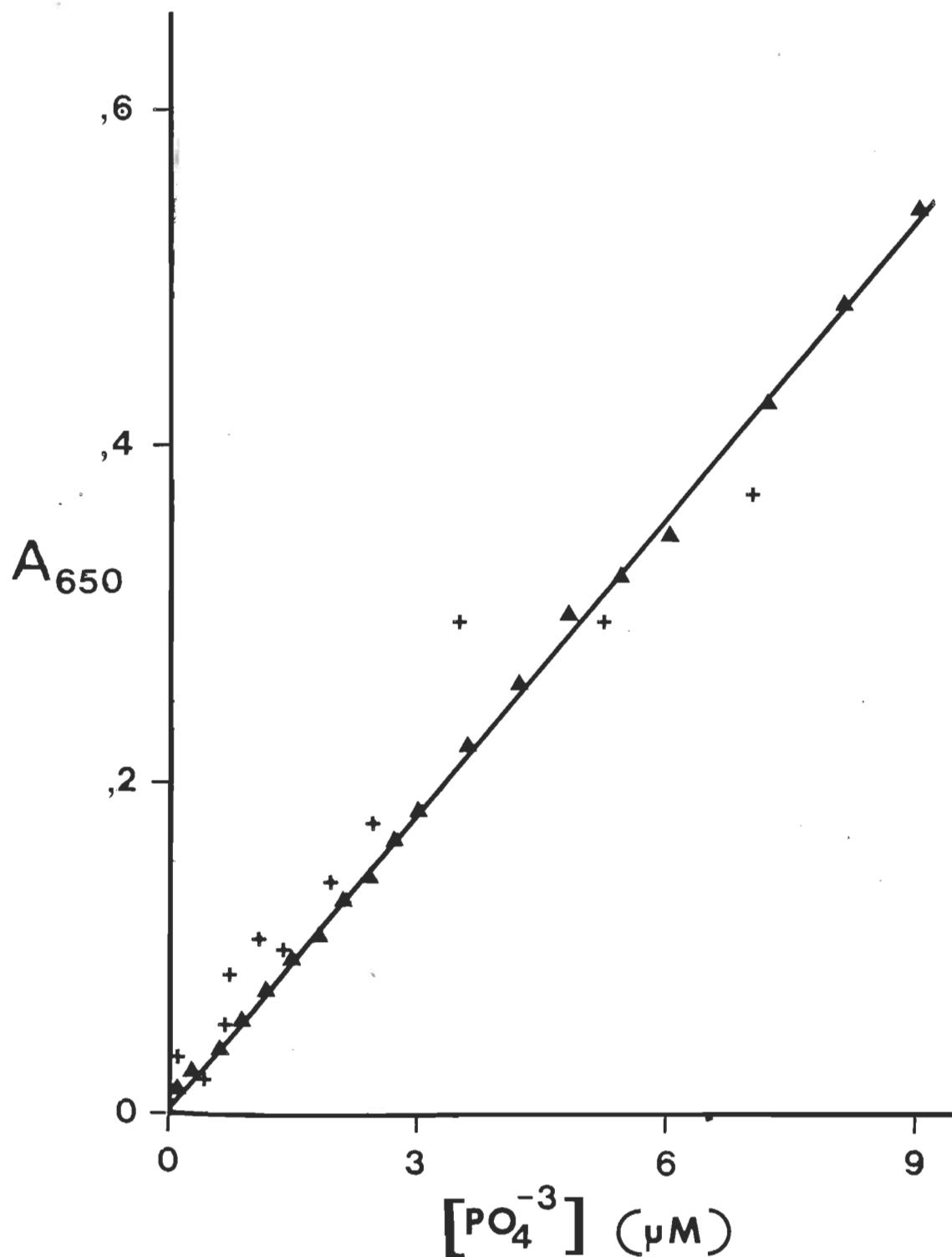
Tout d'abord, toute la verrerie qui sera en contact à un moment où l'autre avec les solutions contenant le phosphate à doser aura dû être préalablement trempée au moins 30 minutes dans une solution de lavage d'acide sulfochromique puis abondamment rincée à l'eau distillée et déminéralisée pour être finalement séchée au four.

La figure 5 illustre la nécessité de cette opération. On peut voir que les valeurs obtenues pour déterminer la courbe standard ne sont pas bien alignées si la verrerie utilisée n'a pas subi le lavage au sulfochromique. On peut constater que la courbe obtenue est parfaitement rectiligne sur un champ de concentration s'étendant entre 0 et 9 μM pour la solution à doser.

Un autre facteur ne possédant qu'une légère influence, celui-là, est le temps d'incubation nécessaire au développement de la coloration verte. Ainsi un même échantillon verra son A_{650} subir une modification en fonction du temps d'incubation. La variation est légère, $\approx 6\%$, mais elle est suffisante pour avoir à prendre soin de lire chacun des échantillons après un temps identique. Le temps utilisé a été de 30 ± 2 minutes pour toute la durée de ce travail.

Il devient maintenant important de mentionner nos observations concernant la conservation du réactif au vert de Malachite ainsi que des solutions servant à le préparer. Tashima et Yoshimura (153) suggéraient de

FIGURE 5: Effet du pré-lavage à l'acide sulfochromique sur le dosage de l'orthophosphate par la méthode au vert de Malachite. La concentration en phosphate indiquée en abcisse correspond à l'orthophosphate présent dans la solution échantillon avant l'ajout du réactif au molybdate: \blacktriangle — \blacktriangle vaisselle lavée à l'acide sulfochromique, $+$ — $+$ vaisselle lavée de la façon standard.



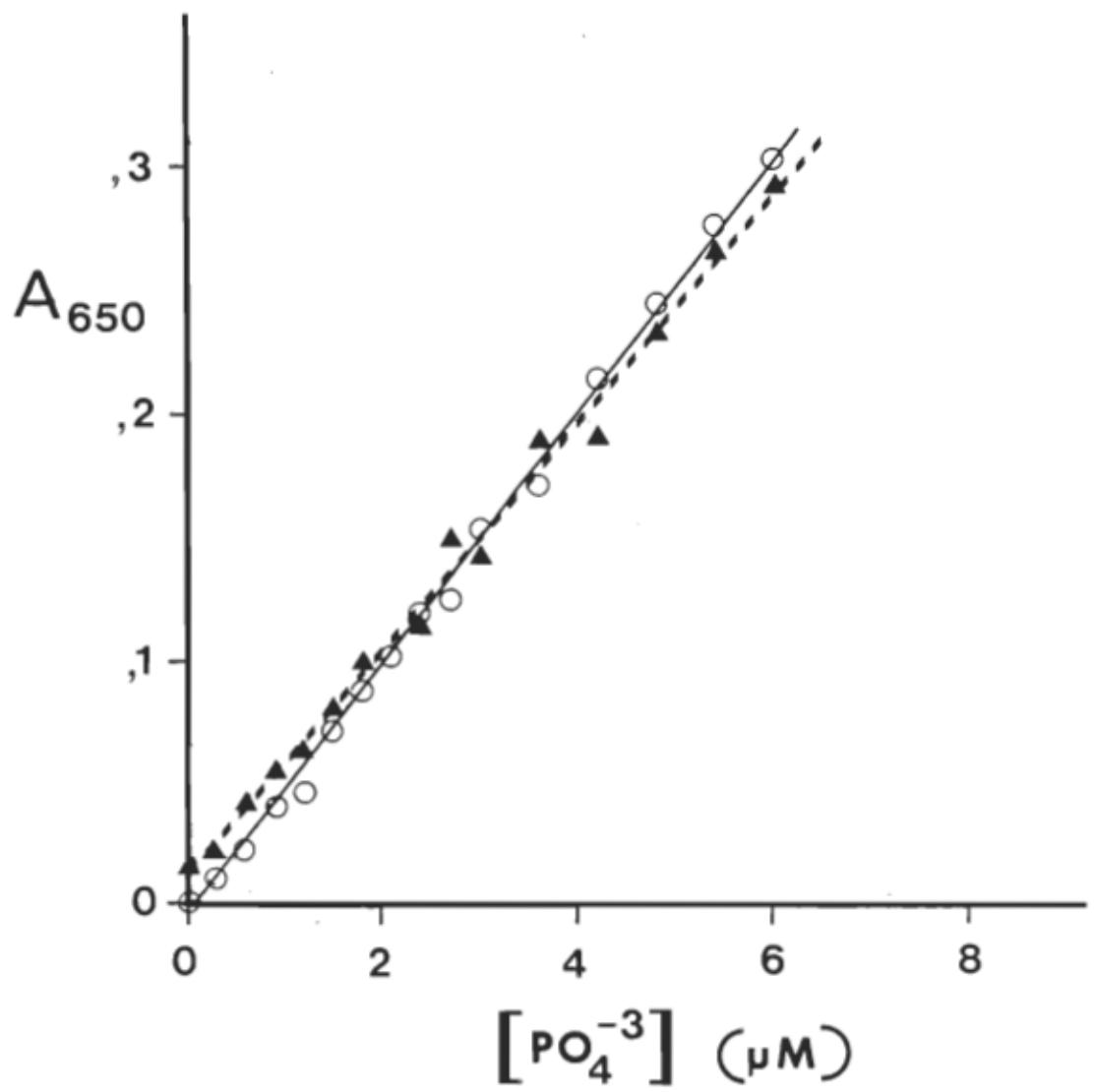
rejeter le réactif une semaine après l'avoir préparé. Les circonstances aidant, il a été possible de vérifier la nécessité de ce rejet et, comme l'indique la figure 6 un réactif au Malachite, qu'il soit frais ou âgé de 4 mois, ou encore fraîchement préparé à l'aide de l'une ou l'autre (ou les deux) des solutions stock de vert de Malachite ou de paramolybdate d'ammonium âgées de 4 mois ou fraîchement préparées, aucune différence majeure n'est apparue d'un réactif à l'autre, sauf à des concentrations dépassant largement celles où nous avons travaillé. Il semble donc que ces auteurs avaient sous-estimé le temps de conservation utile de leur réactif.

Nous n'avons jusqu'ici traité que des résultats obtenus pour des solutions standard d'orthophosphate, donc sans minéralisation de l'actine. La figure 7 représente, en comparaison avec la courbe standard normale, la courbe obtenue pour 250 μ g d'actine (5,95 nmole) précipités et lavés au TCA 10%, auxquels on a ajouté des quantités croissantes d'orthophosphate avant d'effectuer la minéralisation et l'hydrolyse. On peut voir que les deux courbes sont assez semblables, toutefois, on peut noter 2 différences significatives. La pente du standard contenant l'actine est légèrement inférieure à celle du standard d'orthophosphate, ce qui pourrait indiquer une hydrolyse incomplète du pyrophosphate formé lors de la minéralisation. Il est à noter que la réaction à la base de ce dosage est spécifique à l'orthophosphate, le pyrophosphate n'influencant pas les résultats à ces concentrations. La deuxième différence est l' A_{650} de 0,019 obtenue pour l'actine sans ajout d'orthophosphate, soit une valeur résiduelle d'environ 1 mole de phosphate inorganique pour 10 moles d'actine à l'état "hative". Il semble que l'actine "hative" soit légèrement phos-

FIGURE 6: Effet du vieillissement du réactif au vert de Malachite lors du dosage de l'orthophosphate.

●—● Réactif fraîchement préparé à l'aide de la solution stock fraîche de paramolybdate (A) et de la solution stock fraîche de vert de Malachite (B).
○—○ Réactif fraîchement préparé avec (A) agé et (B) frais. △—△ Réactif fraîchement préparé avec (A) frais et (B) agé. ▽—▽ Réactif fraîchement préparé avec (A) agé et (B) agé. □—□ Réactif agé. (Une solution agée a été préparée 4 mois auparavant.)

FIGURE 7: Courbe standard pour le dosage de l'orthophosphate suite à la minéralisation: ○—○ Sans actine
▲---▲ En présence d'actine (Voir à la section 2.5 pour des détails supplémentaires)



phorylée, puisque pour tous nos essais, on a obtenu entre 0,1 et 0,2 mole de phosphate par mole d'actine, ce qui est en accord avec les résultats déjà mentionnés de Steinberg (149).

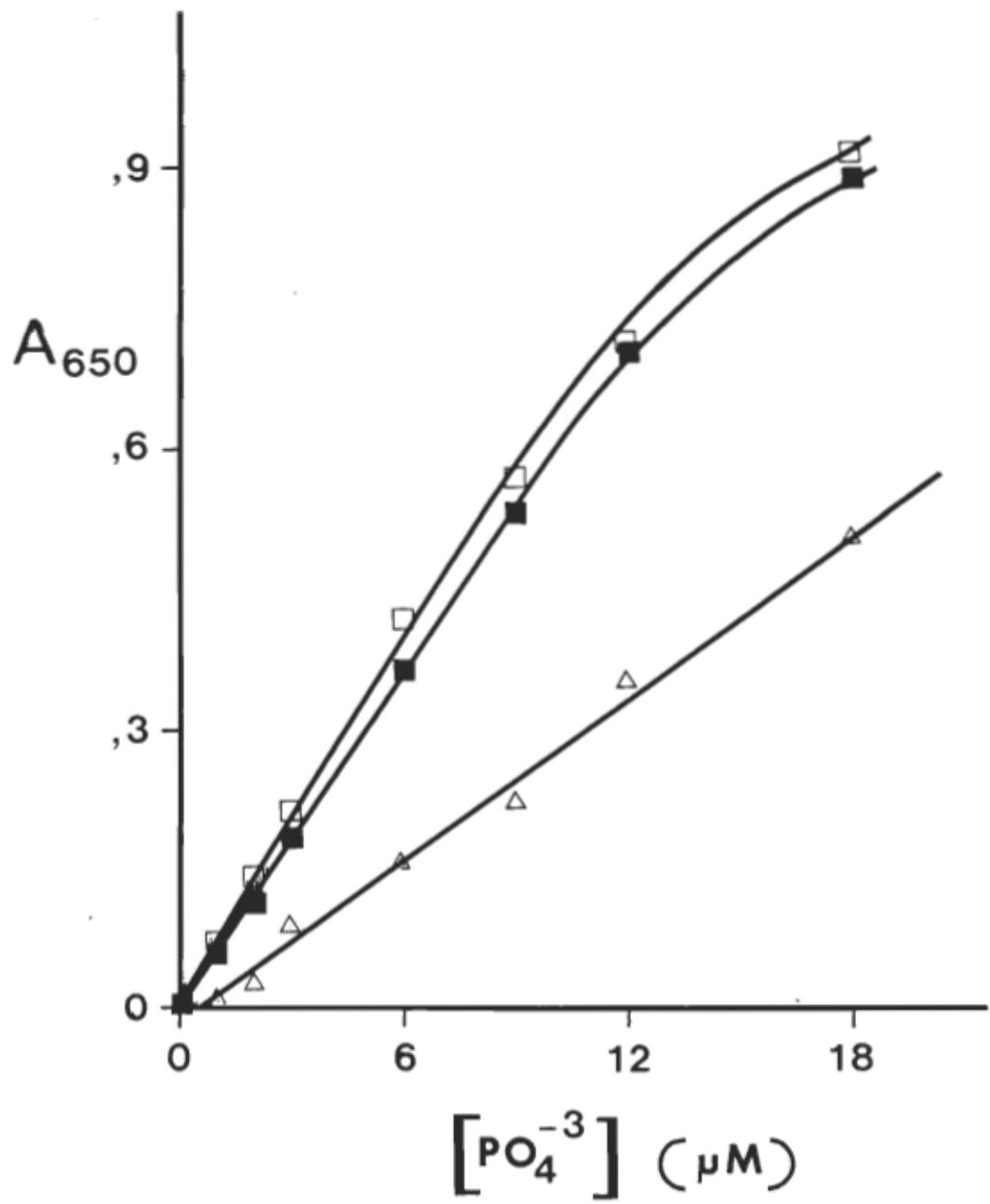
Une dernière considération découlant de l'utilisation de cette méthode doit être mentionnée: il est important de ne pas trop varier l'acidité de la solution à doser car, comme l'indique la figure 8, une variation importante de la pente peut survenir lorsque la concentration en HCl de l'échantillon passe de 0 à 675mM. Il importe donc d'établir une nouvelle courbe standard lorsqu'on utilise des échantillons d'acidité différente.

Cette méthode de dosage du phosphate inorganique est donc excellente et permet d'augmenter d'un facteur 30 environ la sensibilité de la méthode encore largement utilisée de Fiske-Subbarow (46). Elle présente aussi l'avantage d'être plus rapide et plus simple d'exécution, encore faut-il prendre plus de précautions lors de la manipulation et du lavage de la verrerie. A ce sujet, il est avantageux, lorsqu'elles sont disponibles, d'utiliser des éprouvettes, ainsi que des cellules pour spectroscopie visible, neuves et jetables après usage, ceci évite la fastidieuse opération du lavage à l'acide.

3.1.3 Séparation et identification des nucléotides

Il a été nécessaire de mettre au point une technique pour séparer et identifier les nucléotides présents, autant à l'état libre que liés à l'actine, dans nos milieux réactionnels. La méthode de chromatographie descendante sur papier qui a été décrite au chapitre pré-

FIGURE 8: Effet de l'acidité sur le dosage de l'orthophosphate.
A un volume d'échantillon, on ajoute un volume de réactif, puis on lit l' A_{650} après 30 minutes d'incubation. L'échantillon qui contient l'orthophosphate est préparé dans: ■—■ H_2O pure, □—□ HCl 0,225M et △—△ HCl 0,675M.



cédent n'a finalement été adoptée que suite à l'essai non-concluant d'une chromatographie sur résine échangeuse d'anions (Dowex I- 8X, 50 mesh) à l'aide d'un système de solvants décrit par Cohn (31) en 1950. Cette méthode demeure tout de même applicable dans des circonstances différentes de celles où nous devions travailler.

La figure 9 représente le profil d'élution d'un mélange équimolaire (1mM de chacun) d'ATP et d'AMP. Même s'il est possible d'obtenir une séparation raisonnable des différents constituants d'un mélange donné, cette méthode s'applique à une préparation plutôt qu'à l'analyse quantitative de très faibles quantités, et ce surtout si la méthode de détection utilisée est la mesure de l'absorbance à 257nm. L'utilisation d'ATP radioactif et de ses dérivés permet une détection de quantités beaucoup plus faibles, mais il est assez difficile de quantifier exactement la surface réelle de chacun des pics et de déterminer avec précision leurs rapports réciproques. Le dernier argument, et non le moindre, en défaveur de cette méthode est son temps d'exécution. Le passage successif de 100 à 200 échantillons aurait à lui seul nécessité plusieurs mois de travail.

La méthode de chromatographie descendante sur papier à l'aide de matériel tritié nous est alors apparue comme pouvant combler avantageusement toutes les failles que nous avons pu détecter lors de l'usage de la première méthode. La figure 10 nous permet de constater que la migration des différents spots représentant les standards d'ATP, d'ADP, d'AMP, d'adénosine et d'adénine correspond parfaitement aux densités de radioactivité mesurées pour une solution d' $[^3H]$ -ATP présentant une pureté de 95%. L'ordre d'élution des différents nucléosides est le suivant: adénine, adénosine,

FIGURE 9: Profil d'élution d'un mélange équimolaire d'ATP et d'AMP sur une colonne de 1 ml de Dowex-I-X8 (50 mesh).
Dépôt: 6 ml d'un mélange équimolaire d'ATP et d'AMP à 1mM à un pH de 7,5; vitesse du dépôt de 8 ml/heure.
L'élution se fait à 120 ml/heure à l'aide successivement des solutions "C": HCl 3,0mM, "D": HCl 10,0mM et NaCl 20,0mM et "E": HCl 20mM et NaCl 200,0mM.
Les flèches indiquent le moment du changement d'une solution pour une autre. L'AMP est élué par la solution "C", l'ADP (ainsi que l'AMP) par la solution "D" et l'ATP (ainsi que l'ADP et l'AMP) par la solution E.

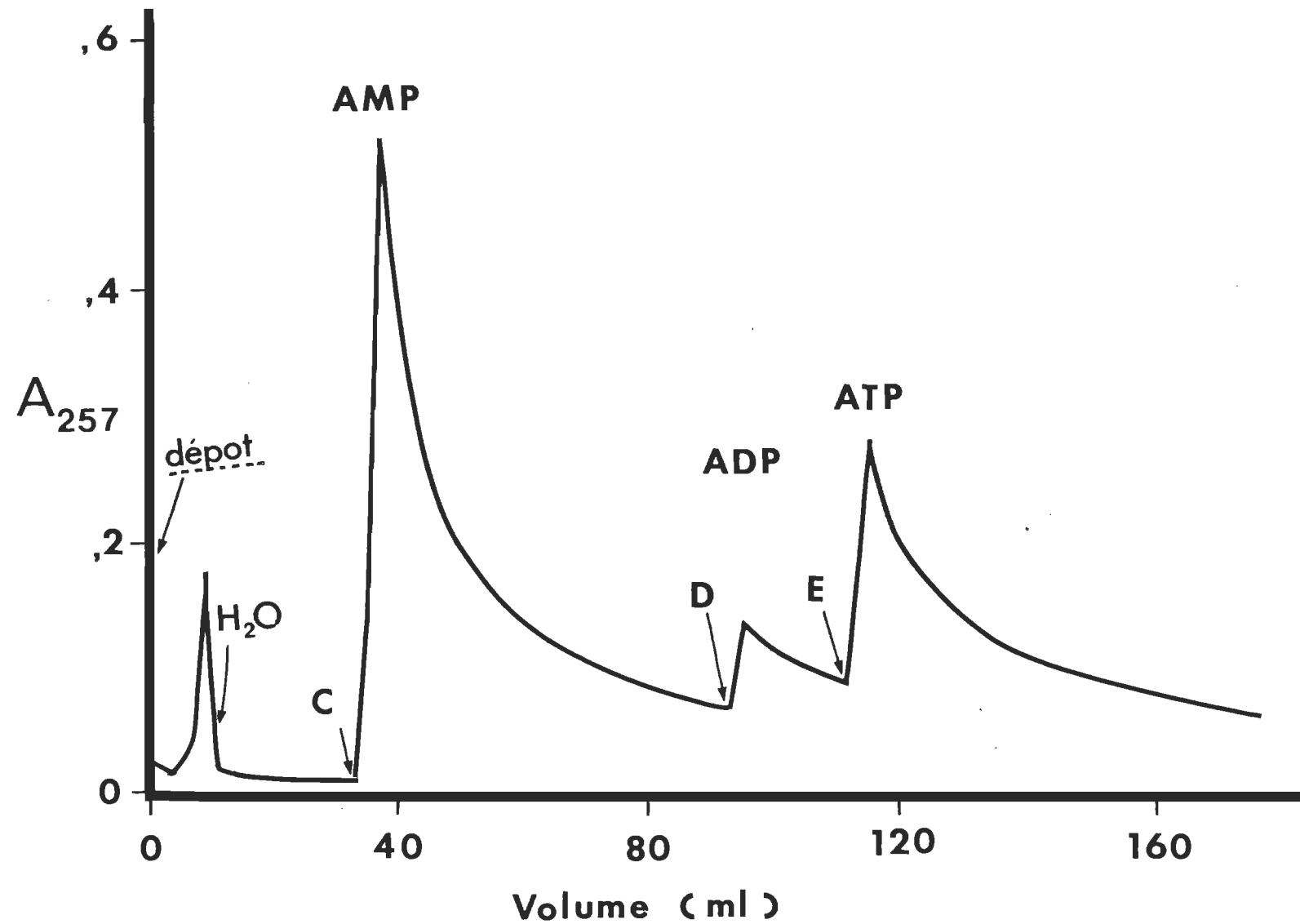
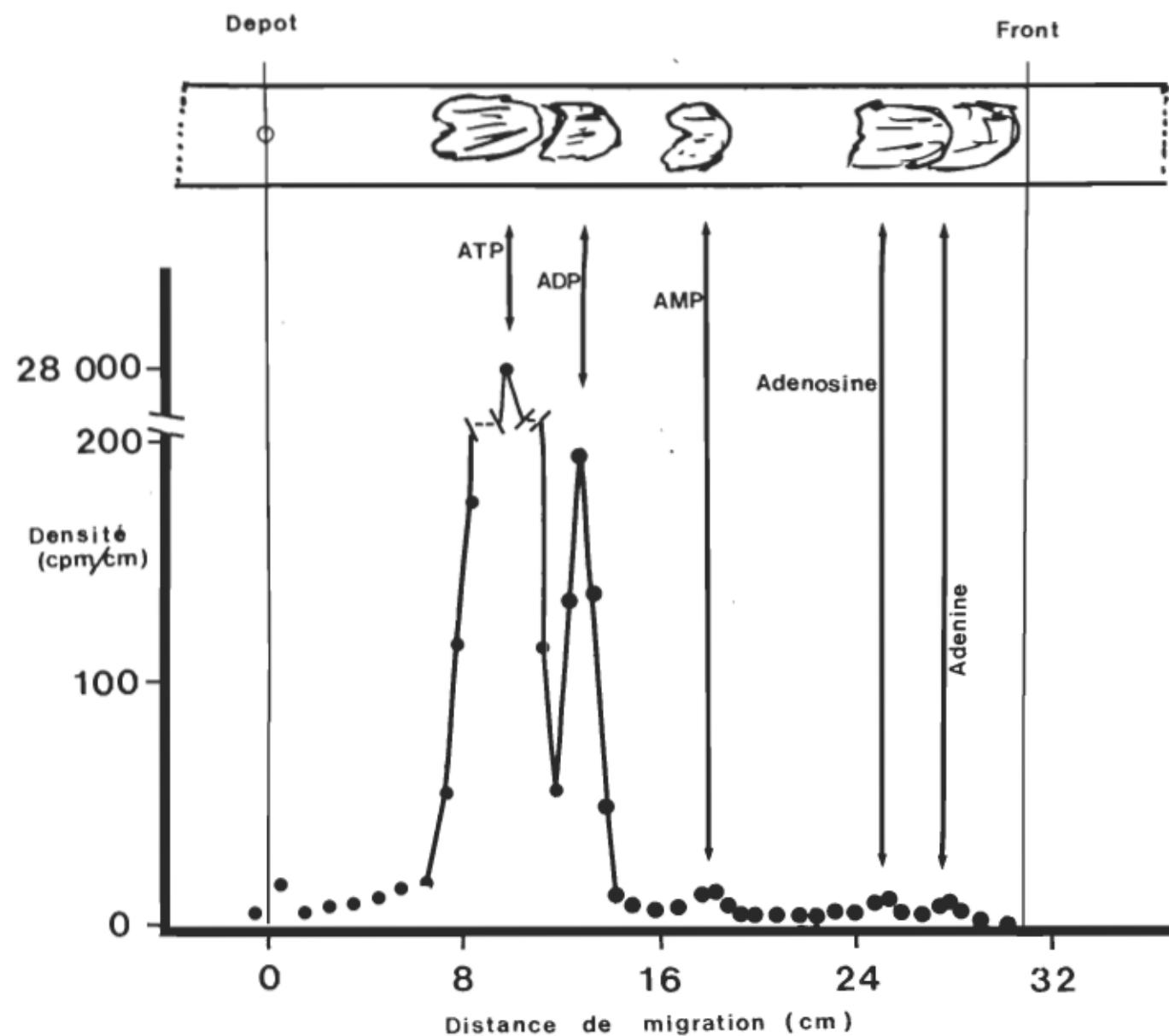


FIGURE 10: Position des nucléotides adenylys suite à une chromatographie descendante d'une durée de 16 heures sur papier Whatman # 1. La partie supérieure de la figure nous indique la position sur le papier des spots déterminée par irradiation U.V. Le graphique de la partie inférieure nous permet d'observer la densité de radioactivité (cpm/cm) obtenue suite au découpage du papier. On peut ainsi observer une bonne corrélation entre les spots obtenus en U.V. et les pics issus du comptage du papier. Déposition: 5 μ l d'ATP (pur à 95%) possédant une activité spécifique de $1,5 \times 10^8$ dpm/ml et 5 μ l de la solution standard d'ATP, d'ADP, d'AMP, d'adénosine et d'adénine (Voir page 50)



AMP, ADP et ATP avec respectivement les facteurs de rétention relatifs suivants: 0,91, 0,82, 0,60, 0,42 et 0,32.

Il est à noter ici que les deux pics correspondant à la radioactivité de l'adénine et de l'adénosine sont beaucoup plus distincts en comptage de radioactivité que par la visualisation des spots sur le chromatogramme. Dans ce dernier cas, ces deux dérivés ne présentaient même parfois qu'un seul spot assez large et diffus. Il semble que les variations de l'état de conservation du tampon d'élution, l'étanchéité du bain ainsi que de la distance totale de migration ont été à l'origine de ces variations.

Enfin, la correspondance des facteurs de rétention autant par la visualisation des spots que pour la densité de radioactivité obtenue après le comptage nous a permis d'acquérir une bonne certitude que le comptage unique des spots permettait d'obtenir une aussi bonne précision que le découpage systématique de toute la longueur de la migration en petites portions. Cette méthode du comptage unique des spots permet de réaliser une bonne économie de temps et de matériel.

Quant au rendement de comptage, il se situait initialement aux alentours de 5 à 6% pour les résultats obtenus lors du découpage intégral du papier avec le scintillant au toluène. Ce rendement a pu être augmenté à environ 40% par l'utilisation du scintillant Formula A-950 suite à une extraction préalable du papier découpé avec 1 ml de HCl 1N pendant une nuit.

Cette dernière méthode nous a donc donné satisfaction quant aux résultats qu'elle a permis d'obtenir. Mais avant d'entamer la poursuite des travaux présentés ici, une analyse de la possibilité d'effectuer la séparation quantitative de l'ATP et de ses dérivés par une technique différente,

telle la chromatographie sur couche mince ou encore par HPLC, devra être sérieusement envisagée. Car, quoique ponctuellement plus onéreuses, ces techniques devraient pouvoir permettre de réaliser une importante économie de temps, et par là même, éventuellement, d'argent.

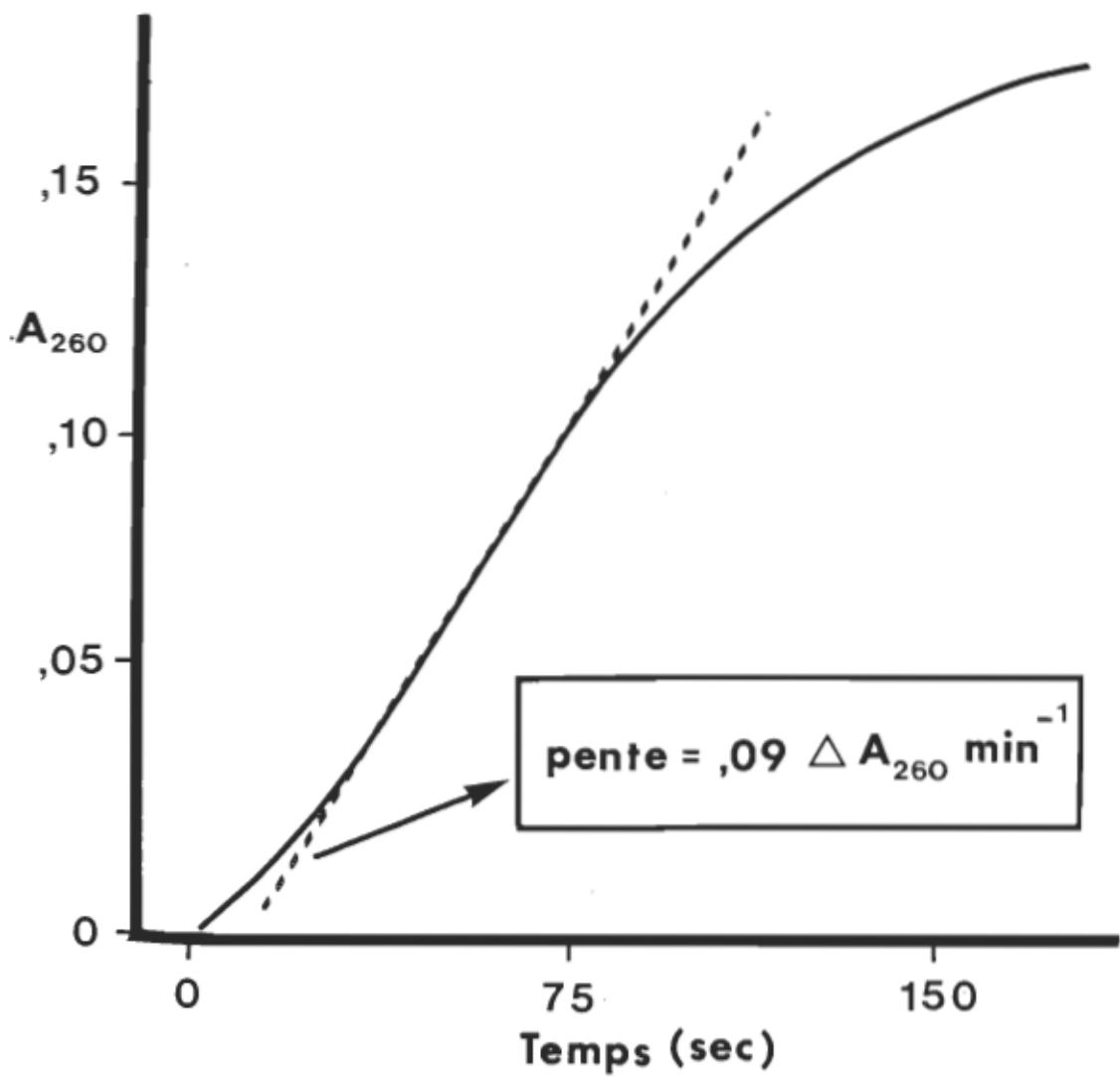
3.1.4 Dosage de la DNase I pancréatique

Etant donné les caractéristiques de perte d'activité de la DNase I suite à sa liaison équimolaire avec l'actine-G, cet enzyme peut être utilisé avec succès pour un dosage précis de la polymérisation de l'actine en partant d'échantillons très réduits (14). La brève description de cette méthode donnée au chapitre précédent demande toutefois certaines précisions et une explication graphique un peu plus détaillée.

La figure 11 nous présente le tracé obtenu suite à l'ajout de 3,0 ml de substrat DNA à 1 μ g de DNase en solution dans environ 35 μ g d'un milieu donné. On peut voir se développer en fonction du temps une courbe d'aspect sigmoidal. La pente au point d'inflexion est directement proportionnelle à la quantité d'enzyme présent et nous permet de déterminer avec une assez bonne précision son activité. La DNase I utilisée ici possède une activité d'environ $0,09 \Delta A_{260}^{-1} \text{min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$, ce qui est semblable aux valeurs précédemment obtenues par Lindberg (94).

Il est à noter que la DNase I subit une baisse d'activité en fonction de son vieillissement en solution. (Voir figure 23) Même si cette baisse demeure relativement faible à 4°C, il n'en demeure pas moins nécessaire d'en tenir compte lors de l'analyse de résultats obtenus pendant une période de temps prolongée.

FIGURE 11: Test d'hyperchromicité pour le dosage de la DNase I pancréatique. A 3,0ml de DNA 40 μ g/ml, MgSO₄ 4,0mM, CaCl₂ 2,0mM et Tris-HCl 1,0M à pH 7,5, on ajoute 35 μ l de DNase I (environ 1 μ g). On agite rapidement puis on mesure l'augmentation de l'A₂₆₀ en fonction du temps. La perte au point d'inflexion est proportionnelle à la quantité d'enzyme présent.



Un autre facteur important agit sur la longévité de l'activité de cet enzyme: sa pureté. Nous avons noté qu'une préparation très purifiée obtenue de Sigma (# DN-CL) perd son activité beaucoup plus rapidement que la DN-100 moins pure (Résultats non montrés). Suite à cette constatation, notre action ne s'est limitée qu'au choix évident de n'utiliser que la DNase I pancréatique DN-100, plus stable et heureusement moins onéreuse.

3.2 Effet des membranes cytoplasmiques d'hépatocytes sur l'actine

Rappelons d'abord que le but initial de ce travail était d'obtenir de l'actine phosphorylée par les membranes cytoplasmiques d'hépatocytes pour ensuite étudier les propriétés de cette actine modifiée.

La présente section traitera donc directement des effets obtenus à l'aide de nos préparations de membranes cytoplasmiques d'hépatocytes sur l'actine G et F. Pour faciliter une meilleure vision d'ensemble de ces résultats, cette section se présentera en cinq parties relativement distinctes.

Nos résultats préliminaires de phosphorylation de l'actine-G au moyen des membranes constitueront la première partie. La seconde démontre-ra la disparition rapide de l'ATP dans tous les milieux réactionnels en présence de membranes. La troisième partie traitera des effets de l'"arrachage" du nucléotide de l'actine à l'aide du Dowex-I. Nous y verrons l'existence d'un certain "parallélisme" entre ces effets et ceux obtenus en présence de membranes.

La quatrième partie, présentera un aperçu global de l'action des membranes cytoplasmiques d'hépatocytes sur l'actine à l'aide de plusieurs pa-

ramètres suivis simultanément lors d'une expérience unique. La dernière partie nous montrera finalement, par électrophorèse, l'absence définitive de phosphorylation autant sur l'actine-G que sur l'actine-F par notre fraction enrichie de membranes cytoplasmiques d'hépatocytes.

Avant d'entreprendre la première de ces sections, il est nécessaire de préciser ici que le choix et l'élaboration de ces divisions relèvent plus d'un ordre chronologique que d'une stricte logique. La décision de choisir cette voie a été prise dans le but de rendre la lecture du présent chapitre sinon plus facile, du moins plus agréable. Il est évident qu'une telle façon de procéder serait difficilement compatible à la rédaction d'un court article pour une revue scientifique sérieuse, et cela surtout à cause des répétitions qu'elle engendre inévitablement. Mais étant donné la nature du présent document et surtout du fait que la majorité des résultats ont déjà été publiés ailleurs (58, 154), nous avons cru utile d'insister davantage sur l'aspect historique. Il va sans dire que l'aspect logique du travail n'est aucunement négligé lors du traitement ponctuel de chaque résultat. Il devient même peut-être encore plus évident puisque le choix d'une expérience donnée se voit en fait motivé par les résultats obtenus pour la précédente.

3.2.1 Essais de phosphorylation de l'actine

Cette section nous montrera les résultats obtenus lors de nos nombreuses tentatives de phosphorylation de l'actine-G. Puisqu'il serait superflu de tous les présenter, nous concentrerons notre attention sur quelques expériences-types choisies en fonction de leur représentation d'u-

ne image réaliste de la tendance générale observée lors de ces essais.

La figure 12 nous permet tout d'abord de constater que la quantité de phosphore que l'on retrouve lié aux protéines du surnageant sans membranes et précipité au TCA subit une augmentation en fonction du temps d'incubation de l'actine en présence de membranes cytoplasmiques d'hépatocytes.

L'échelle du % de phosphorylation de l'actine^{*} est utilisée de façon à simplifier davantage l'interprétation des résultats.

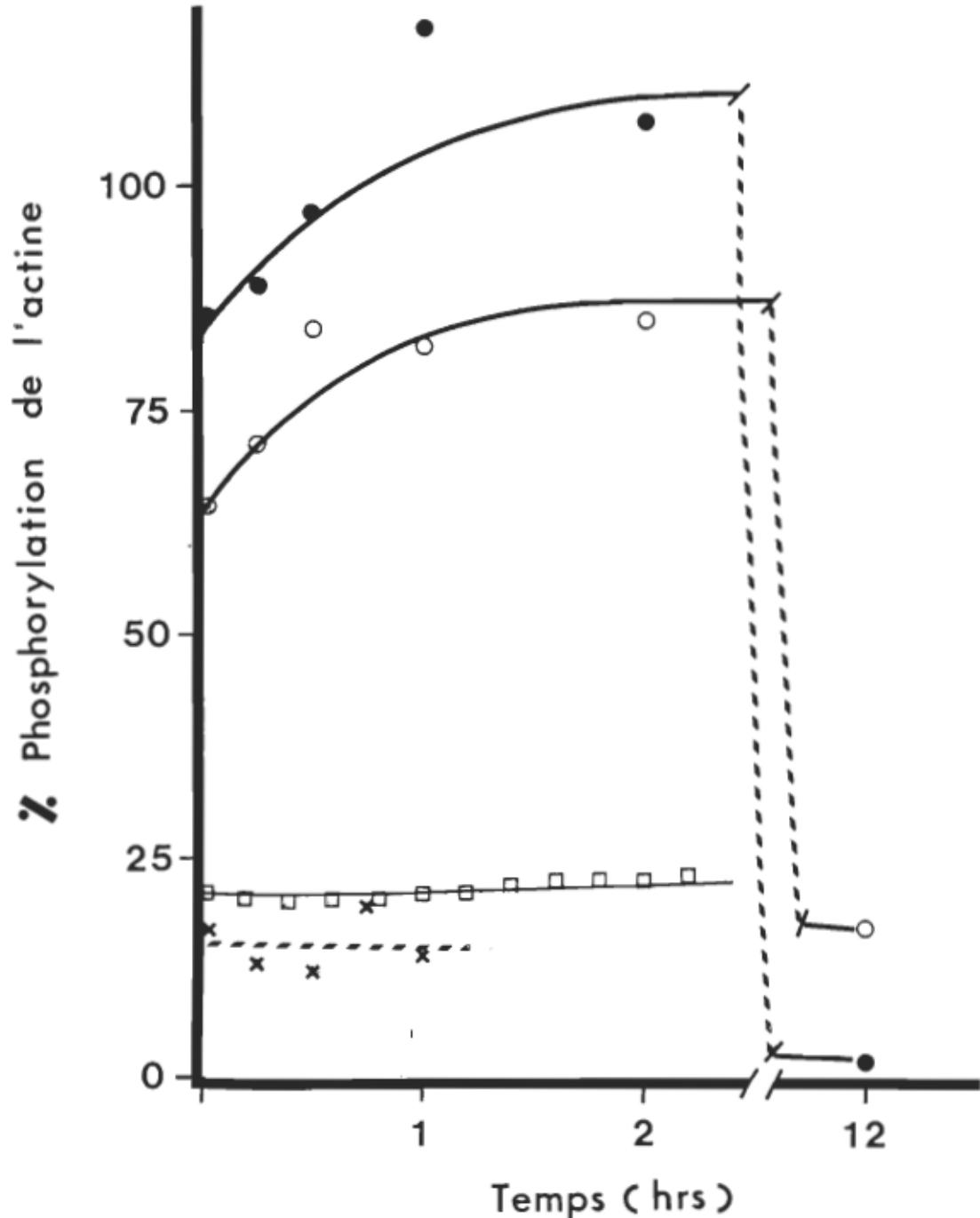
Quelques observations peuvent être tirées de l'analyse de ce premier résultat. Tout d'abord, on peut voir que, parallèlement à la hausse du phosphore lié à l'actine, on observe une hausse similaire du témoin ne comportant que des membranes sans actine. Sans les résultats obtenus pour le témoin, la première courbe aurait pu signifier l'obtention d'une phosphorylation complète de l'actine en moins d'une heure. Ce qui aurait alors été en parfaite correspondance avec les résultats de Grazi et coll. (55), et ce, malgré le fait que la concentration de notre préparation de membranes ait été environ 10 fois inférieure à la leur.

On peut voir que le témoin de membranes sans actine subit lui aussi une hausse du phosphate des protéines qui ne sont pas précipitées avec les membranes lors de la première centrifugation. Cette hausse est tout à fait

* L'échelle donnée en % de phosphorylation sur la figure 12 a été calculée sur la base qu'un rapport molaire de 1 phosphate incorporé par molécule d'actine-G nous donne une phosphorylation théorique de 100%. Ce qui signifie en d'autres termes, qu'une concentration de 2,96 µM d'orthophosphate retrouvée dans la solution traitée (Voir section 2.5) correspondrait exactement à la quantité de phosphate qui se serait liée dans un rapport 1:1 à toute l'actine-G du milieu, soit 100% de phosphorylation.

FIGURE 12: Variation de la quantité de phosphate retrouvée dans le précipité au TCA 10% en fonction du temps d'incubation de l'actine avec des membranes plasmiques d'hépatocytes de rats à 30°C; concentration d'actine: 0,5mg/ml, concentration de membranes: 0,27mg/ml (Préparées selon la méthode 1, voir tableau V). L'échelle donnée en % de phosphorylation est expliquée au bas de la page 81.

●—● Milieu réactionnel au complet,
○—○ Milieu sans actine,
□—□ soustraction algébrique des deux premières courbes.
X---X actine sans membranes.



similaire à celle observée pour le milieu réactionnel. Tellement, en fait, que la soustraction algébrique des deux courbes nous donne la phosphorylation réelle de l'actine qui, elle, ne subit aucune modification en fonction du temps d'incubation avec les membranes.

Si on prélève des échantillons d'actine-G native maintenue dans les mêmes conditions, mais en absence de membranes, on peut retrouver un % de phosphorylation résiduelle qui variera entre 10 et 20% d'un essai à l'autre. La figure 12 nous présente aussi les résultats d'un essai où l'on a retrouvé un % moyen de phosphorylation résiduelle de 15,5%. Ce qui peut indiquer la présence d'une forme d'actine-G native phosphorylée dans les muscles squelettiques (à partir desquels était préparée notre actine-G).

La présence de ce phosphate dans l'actine n'est cependant pas encore une preuve indéniable de la phosphorylation résiduelle de l'actine. Le traitement au TCA pourrait ne pas avoir entièrement extrait l'ATP lié à l'actine et il se pourrait que l'on ait alors en fait mesuré les phosphates de cet ATP, ce qu'il est impossible de savoir à ce stade-ci. (Notons aussi que 2 lavages supplémentaires du précipité au TCA n'ont aucunement modifié l'ampleur de ces résultats.)

Suite à de nombreuses tentatives de phosphorylation de l'actine à l'aide de diverses préparations de membranes cytoplasmiques d'hépatocytes, nous sommes arrivés à la conclusion, devant la répétition systématique de résultats semblables à ceux décrits à la figure 12, que notre préparation de membranes ne phosphorylait pas l'actine; conclusion qui aurait été inversée si le contrôle "membranes-tampon-G" avait été omis.

L'augmentation de la quantité de phosphate retrouvé dans le surnageant de la centrifugation du milieu réactionnel devait donc provenir d'éléments membranaires phosphorylés et solubilisés lors de l'incubation du milieu réactionnel. Ce phosphate pouvant initialement être fourni par l'ATP du milieu, il nous a semblé logique d'examiner beaucoup plus en détail l'effet des membranes sur le milieu réactionnel déjà étudié, mais en absence d'actine cette fois. Ces résultats sont présentés à la section qui suit.

3.2.2 Hydrolyse de l'ATP par les membranes cytoplasmiques d'hépatocytes

De façon à mieux comprendre les raisons de la non-phosphorylation de l'actine dans les conditions décrites, nous avons voulu vérifier l'effet exact de notre fraction enrichie de membranes cytoplasmiques d'hépatocytes sur l'ATP du milieu réactionnel en absence d'actine.

La figure 13 présente à cet égard des résultats très significatifs. On peut y voir une détérioration rapide de l'ATP du tampon G mis en présence de membranes à 21°C. On peut y voir qu'une incubation de 30 minutes à peine avec une concentration de membranes aussi faible que 0,31 mg/ml suffit pour libérer l'équivalent de près de 3 moles de phosphate inorganique par mole d'ATP présente initialement. Le même phénomène se produit pour le tampon F mais à un rythme légèrement supérieur, ce qui laisse supposer une activité plus importante des enzymes membranaires en présence d'ions magnésium et d'une force ionique plus élevée. Un contrôle constitué de la même suspension de membranes dans du tampon G ou F en absence d'ATP n'a démontré aucune augmentation du phosphate libre après 30 minutes, ni suite à une période additionnelle de 20 heures à 4°C.

FIGURE 13: Hydrolyse de l'ATP contenu dans les tampons G et F par les membranes plasmiques de foie de rat. Suite à une incubation à 21°C, on précipite le milieu réactionnel au TCA 10% puis on dose l'orthophosphate du surnageant par la méthode au vert de Malachite. Concentration de membranes; 0,31 mg/ml. □ Témoin sans membranes, ▨ Milieu complet, au temps d'incubation de 0 min. ▨ Milieu complet après 30 minutes d'incubation. ▨ Milieu complet avec 30 min à 21°C et 20 heures à 4°C.

FIGURE 14: Cinétique de l'hydrolyse de l'ATP par les membranes plasmiques de foie de rat; concentration d'actine à 1,0 mg/ml, membranes à 0,0325 mg/ml, l'incubation se fait à 21°C. Après un temps d'incubation donné, des échantillons de milieu réactionnel sont prélevés, centrifugés pour éliminer les membranes et précipités au TCA. ●—● Dosage du phosphate du surnageant du milieu sans actine, ○—○ Dosage du phosphate du surnageant du milieu avec actine et ▲—▲ dosage du culot du milieu avec actine.

Fig. 13

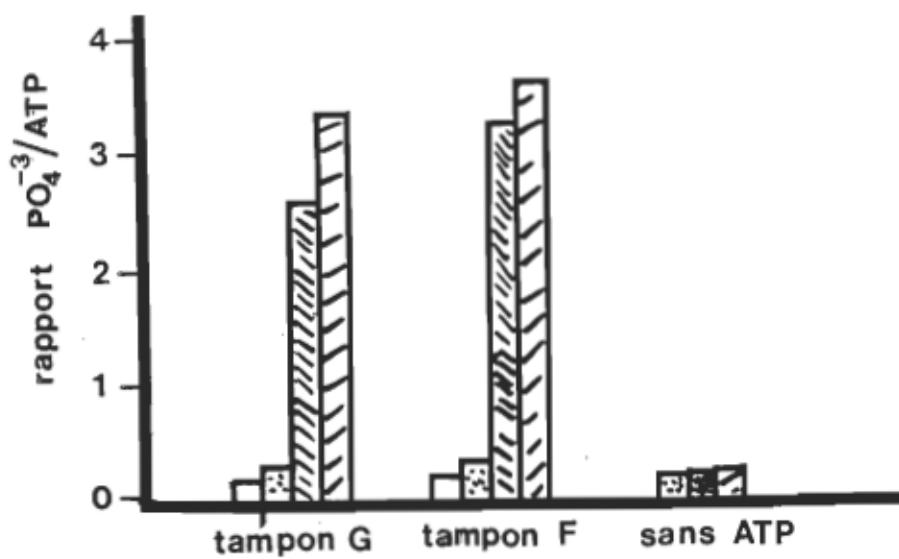
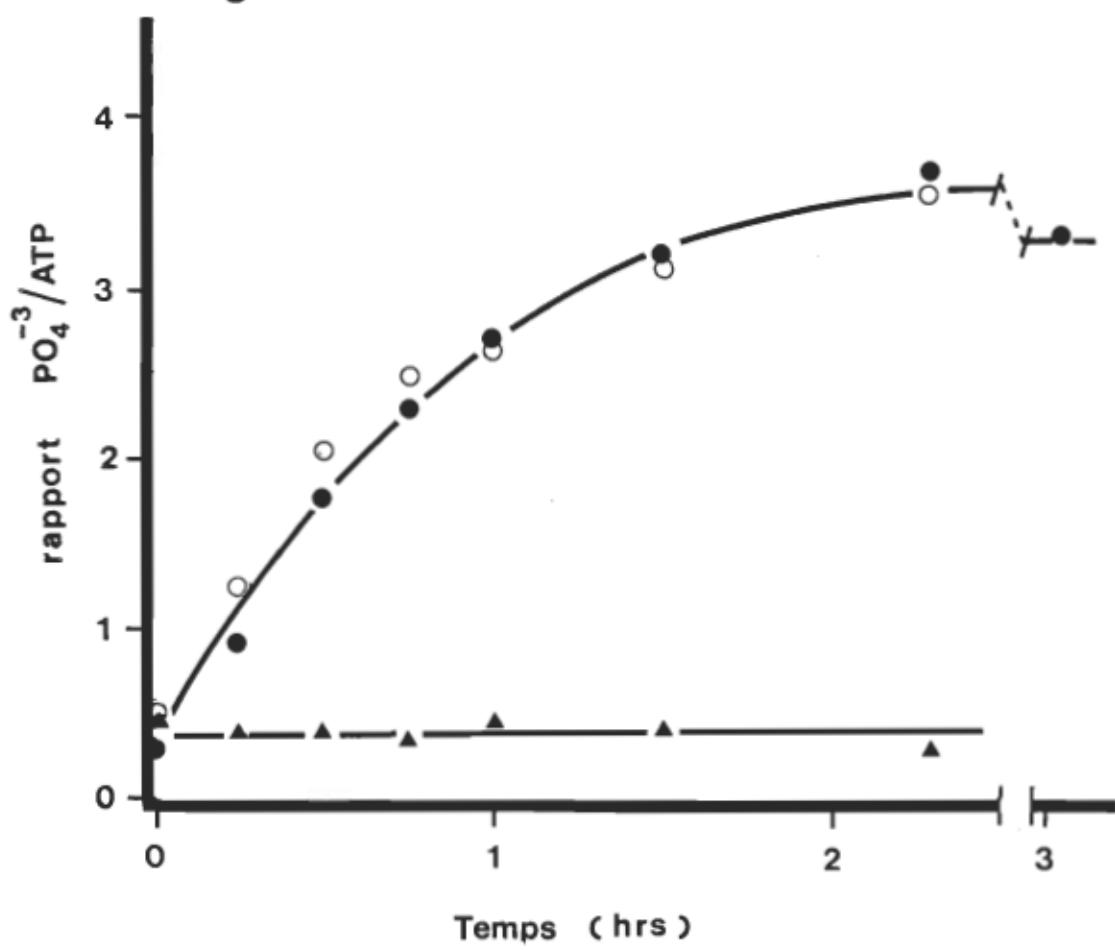


Fig. 14



Il semble donc que nos membranes, qui ne peuvent pas phosphoryler l'actine, sont capables de détruire entièrement l'ATP d'un milieu réactionnel sans actine, et ce très rapidement.

Le même phénomène est obtenu en présence d'actine. On peut voir à la figure 14 que 3 moles de phosphate sont obtenues par mole d'ATP après environ 1 heure d'incubation à température de la pièce, et ce en présence d'actine-G et d'une concentration de membranes près de 10 fois inférieure à celle utilisée pour l'expérience relatée à la figure 13. La cinétique d'apparition de l'orthophosphate demeurant ici encore très rapide, on peut imaginer facilement une destruction totale de l'ATP du milieu réactionnel s'inscrivant à l'intérieur d'un très court laps de temps lorsque la concentration des membranes est de l'ordre de 3,0 mg/ml.

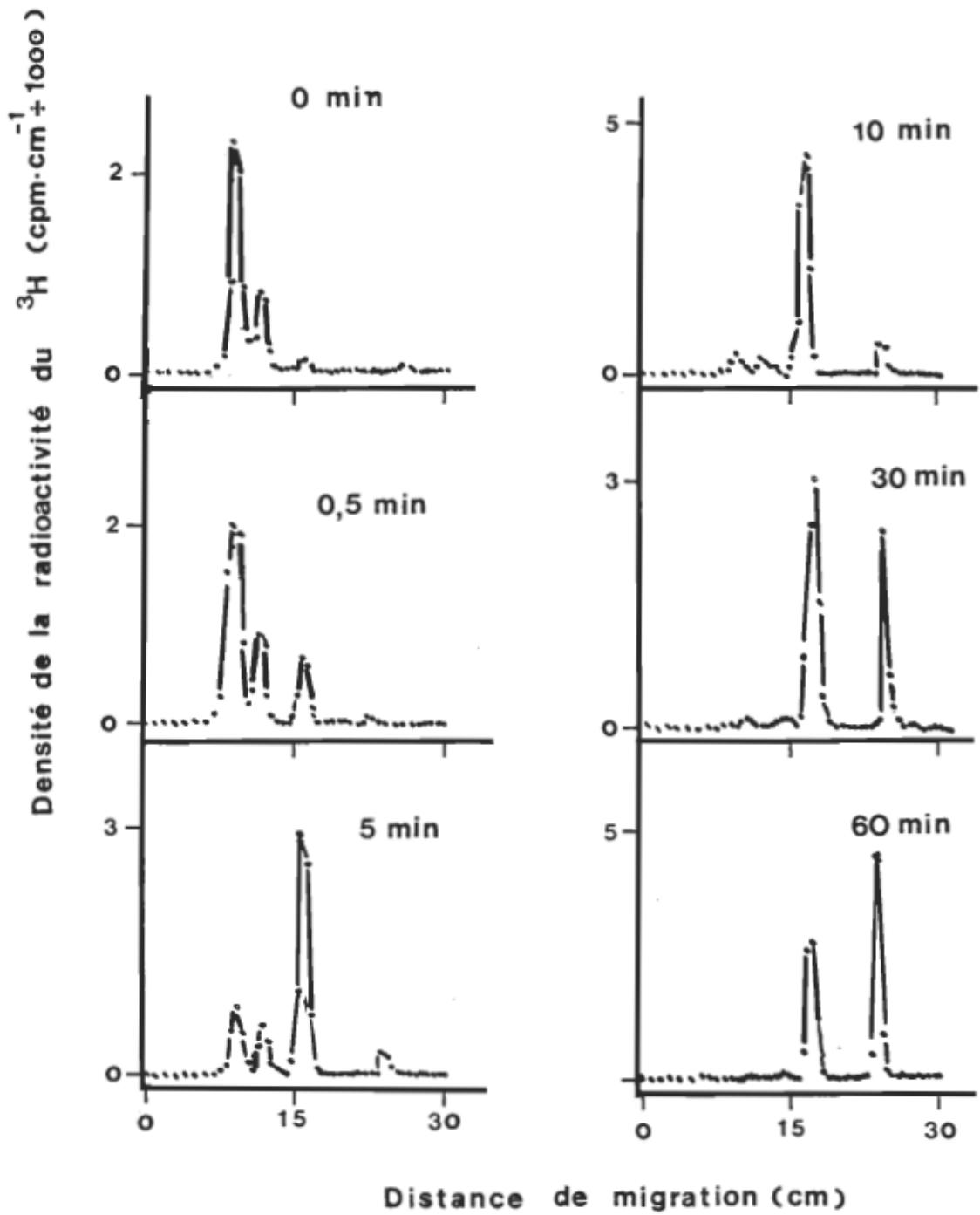
Sur la même figure 14, une courbe du phosphate lié aux protéines, suite à la précipitation au TCA et à la minéralisation du culot, est aussi présentée. On peut noter dans ce cas aussi qu'aucune phosphorylation ne se produit en fonction du temps.

A ce point, il devenait très intéressant de jeter un coup d'œil plus éclairé sur la disparition de l'ATP, de même que sur l'identité des nucléosides formés suite à son hydrolyse. Après quelques tentatives infructueuses de séparation et d'identification de ces produits sur résine échangeuse d'anions (Voir section 3.1.3), nous avons pu obtenir toutes les informations désirées grâce à la chromatographie descendante sur papier et à l'utilisation d'un isotope tritié du noyau adényl de l'ATP.

La figure 15 nous donne les densitogrammes obtenus suite au découpage en bandes des chromatogrammes effectués à partir d'échantillons préle-

FIGURE 15: Effet des membranes plasmiques de lapin sur la composition en nucléotides du tampon G. Chaque densitogramme représente un temps différent d'incubation à 25°C. La concentration des membranes est de 0,1 mg/ml. (Voir aussi la figure 16)

N.B.: La position des pics a été définie à la figure 10.



levés à différents temps lors de l'hydrolyse de l'ATP du tampon G par des membranes cytoplasmiques d'hépatocytes de lapin. La faible concentration de membranes utilisée, soit 0,1 mg/ml, nous a permis de ralentir suffisamment la réaction afin d'obtenir une bonne visualisation de l'ensemble du phénomène.

Tout d'abord, la correspondance entre les pics obtenus sur les densitogrammes et les divers produits de dégradation de l'ATP est la suivante; le premier pic avec une migration d'environ 10 cm est l'ATP, l'ADP suit à 13 cm, puis l'AMP à 17 cm, et finalement l'adenosine à 25 cm.

L'identification de chacun de ces pics a déjà été discutée à la section 3.1.3

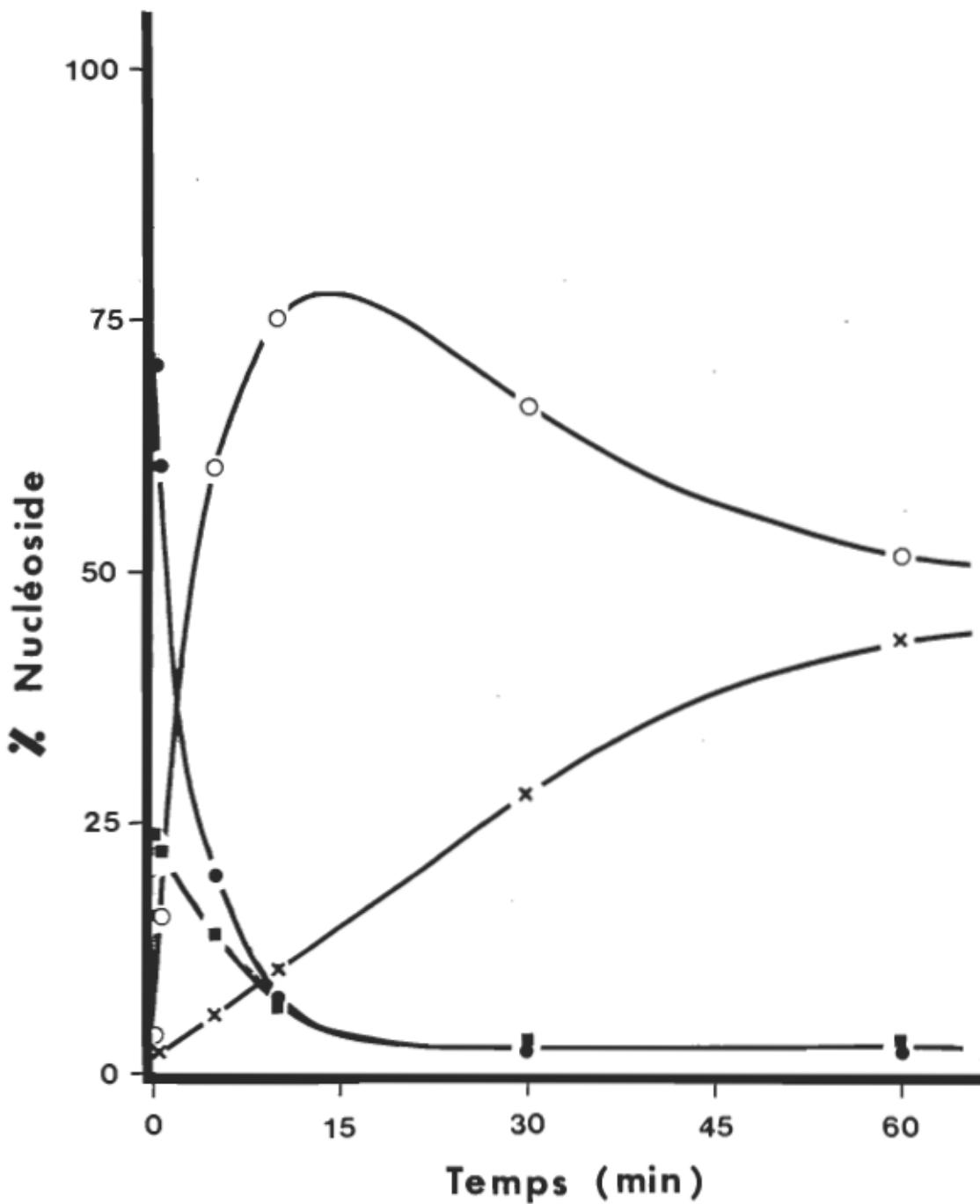
La figure 16 nous présente la quantification en pourcentage des différents produits de dégradation de l'ATP exprimée en fonction du temps d'incubation du tampon G en présence des membranes. Cette figure permet une meilleure appréciation de l'ensemble du phénomène en jeu que la figure 15. Tout d'abord, on peut constater que l'ATP, de même que l'ADP disparaissent presqu'entièrement en l'espace d'une dizaine de minutes au profit de l'AMP. L'AMP est ensuite à son tour dégradé en adénosine à un rythme cependant plus lent que lors de la première partie du phénomène.

Les deux dernières figures démontrent hors de tout doute raisonnable la disparition totale de tout l'ATP du milieu réactionnel en seulement quelques minutes.

La destruction rapide des nucléotides constitue une preuve additionnelle et indiscutable de l'impossibilité d'une phosphorylation qui s'éten-

FIGURE 16: Effet des membranes plasmiques de lapin sur les nucléotides du tampon G. On peut voir ici une représentation plus claire des résultats déjà présentés à la figure 15. La concentration de membranes est de 0,1 mg/ml et l'incubation s'effectue à 25°C;

●—● ATP, ■—■ ADP, ○—○ AMP
et X—X Adénosine.



drait sur une période d'une heure comme c'était le cas chez Grazi (55). Néanmoins, nous obtenons tout comme lui une perte graduelle de la polymérisabilité de l'actine (résultats non montrés ici, voir figure 23) accompagnant son incubation en présence de membranes.

Cette destruction rapide de l'ATP pourrait-elle être responsable de toutes les modifications que l'actine a subi dans ses propriétés? La section suivante nous permettra de vérifier cette possibilité. Nous y verrons l'effet de la disparition de l'ATP sur la propriété intrinsèque la plus importante de l'actine; sa polymérisabilité.

3.2.3 Modification des propriétés physico-chimiques de l'actine suite à la perte de son nucléotide

Dans la présente section, nous avons voulu recréer artificiellement l'effet de la disparition de l'ATP sur le comportement de l'actine-G en solution dans son tampon. Nous verrons ici que l'actine-G-ATP se sépare lentement de son nucléotide lié suite à l'action prolongée du Dowex I et perd ensuite graduellement et irréversiblement sa polymérisabilité.

Nous verrons par ailleurs comment il est possible d'utiliser le Dowex I pendant une courte période de temps de façon à obtenir une actine-G-ATP intacte dans un milieu dépourvu d'ATP auquel on peut ajouter du $\{^3\text{H}\}$ -ATP pour finalement obtenir de l'actine-G- $\{^3\text{H}\}$ -ATP utilisable.

3.2.3.1 Effet du Dowex sur les propriétés physico-chimiques de l'actine-G

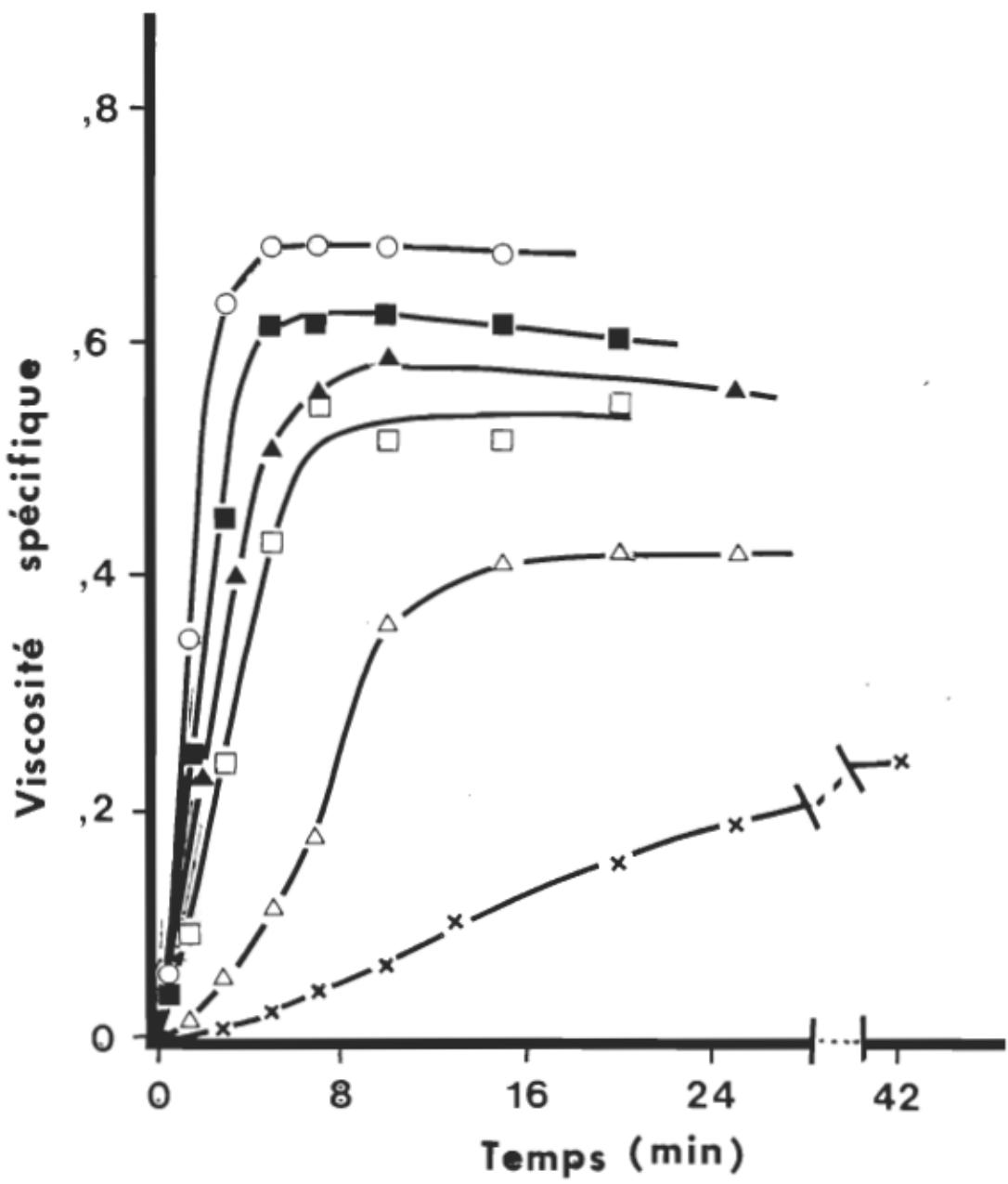
Grazi (55) a déjà décrit la perte de polymérisabilité de l'actine comme étant le résultat direct de la phosphorylation de l'actine par les membranes cytoplasmiques d'hépatocytes de rats. Nos expériences nous ont d'autre part permis de vérifier que des membranes du même type ne produisaient dans notre cas aucune phosphorylation tout en détruisant la polymérisabilité de l'actine. De plus, nos membranes ont montré une forte activité pour hydrolyser complètement les nucléotides du milieu de réaction et ce même à de très faibles concentrations.

A la lumière de ces faits, on peut émettre l'hypothèse selon laquelle la perte de polymérisabilité de l'actine, suite à l'action de nos membranes, serait reliée à l'élimination de l'ATP libre du milieu réactionnel, et non pas à une phosphorylation dont l'évidence nous a jusqu'ici cruellement fait défaut.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé le Dowex I-X8. Cette résine échangeuse d'anions peut enlever les nucléotides du milieu sans pour autant opérer une destruction directe de l'actine (80, 148).

Nous avons donc incubé de l'actine-G avec du Dowex I-X8 à 4°C. À différents temps, des échantillons de milieu étaient prélevés, centrifugés pour éliminer le Dowex, puis déposés dans un viscosimètre où on leur ajoutait une solution de polymérisation. Pour chaque échantillon, une courbe de viscosité a été obtenue en fonction du temps de polymérisation (Voir figure 17). Le maximum de viscosité spécifique obtenue pour un échantillon donné peut être exprimé en terme de % du maximum de viscosité spécifique

FIGURE 17: Polymérisation de l'actine en fonction du temps d'incubation en présence de Dowex I-X8. A un temps donné, on retire 1,0ml de milieu réactionnel qu'on centrifuge 3 minutes à 3000 x g. On dépose 0,5ml du surnageant obtenu dans un viscosimètre, auquel on ajoute 0,47ml de tampon G sans ATP puis on débute la polymérisation par l'ajout de 35 μ l de la solution de polymérisation (solution 1/29). Temps d'incubation: ○—○ 0 minute, ■—■ 30 minutes, ▲—▲ 60 minutes, □—□ 150 minutes, △—△ 380 minutes et X---X 680 minutes.



atteint en absence de Dowex.

La courbe supérieure de la figure 18 représente ainsi les % de polymérisabilité obtenus pour l'expérience décrite à la figure 17. On peut voir que l'élimination initiale des nucléotides libres dans le milieu provoque la perte graduelle de la polymérisabilité de l'actine. Si bien qu'après environ 300 minutes, on ne peut plus obtenir que 60% de la polymérisabilité initiale (Points noirs). De plus, même si la polymérisation est démarrée après avoir ajouté de l'ATP dans le viscosimètre jusqu'à concurrence de 0,2mM, on peut voir que la courbe de polymérisabilité demeure inchangée (cercles). Ainsi, le 40% d'actine qui ne peut plus polymériser, après 300 minutes d'incubation dans un milieu dépourvu d'ATP, semble donc avoir perdu définitivement cette propriété, et cela même si on la pourvoie à nouveau en ATP frais.

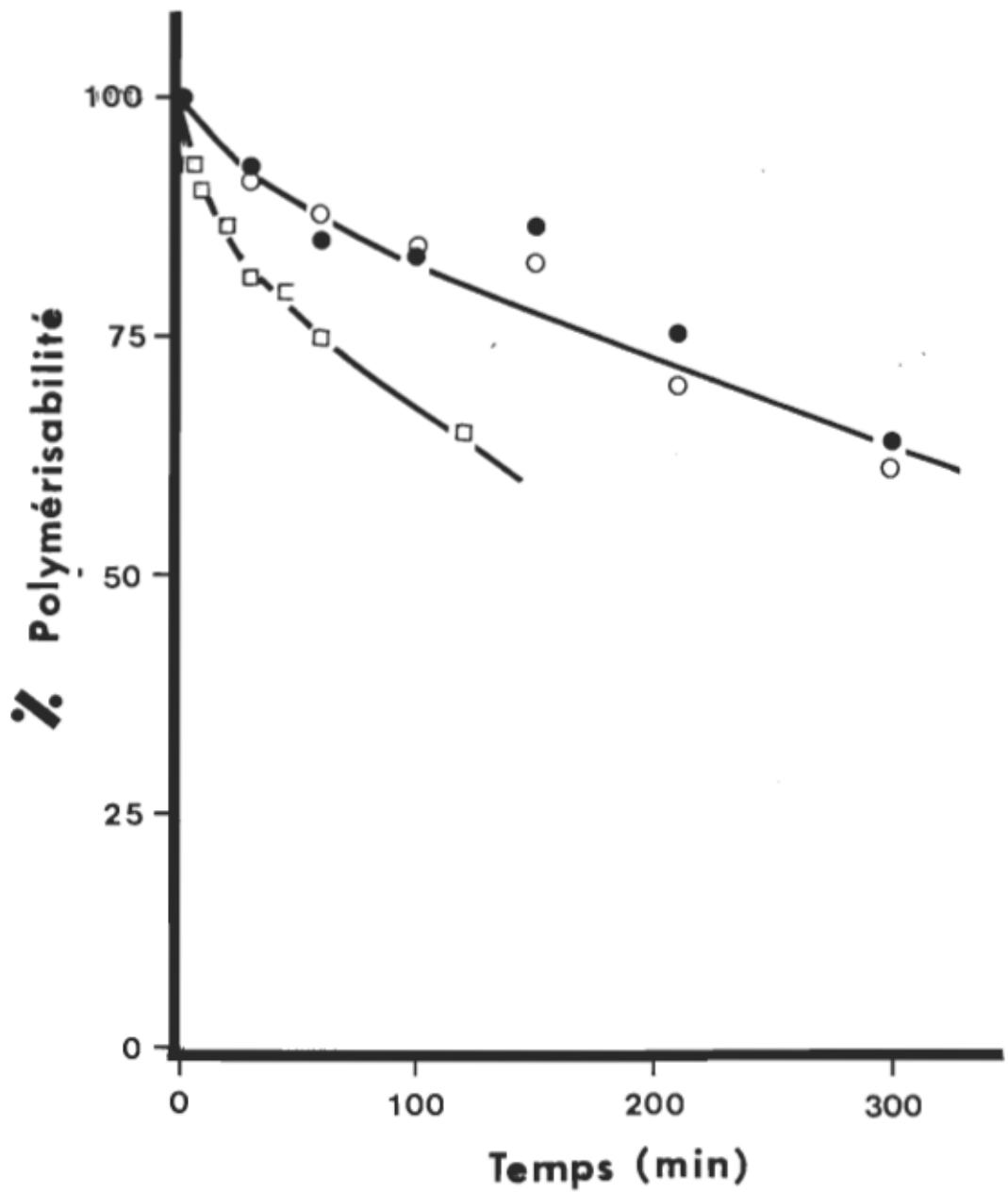
Ces résultats étaient en fait prévisibles, puisque l'on sait déjà que l'ATP lié à l'actine s'échange relativement facilement avec l'ATP du milieu (147). Si on élimine l'ATP du milieu, l'actine doit graduellement perdre son nucléotide et une dénaturation irréversible s'ensuit automatiquement.

On sait de plus qu'une faible concentration de calcium favorise d'autant plus cet échange de l'ATP lié avec les nucléotides libres. Donc, si on réduit de moitié la concentration de calcium, on devra s'attendre à ce que l'actine-G-ATP perde encore plus rapidement son nucléotide et si cette perte est directement responsable de la baisse de polymérisabilité de l'actine incubée en présence de Dowex, on assistera à une diminution de la polymérisabilité de l'actine en fonction du temps d'incubation. Ceci

FIGURE 18: Perte de la polymérisabilité de l'actine en fonction du temps d'incubation en présence de Dowex. La méthode utilisée a été décrite à la figure 17. Le % de polymérisabilité se définit comme suit:

$$\frac{\eta_{sp} \text{ max au temps "t"} }{\eta_{sp} \text{ max au temps "0"} } \times 100\%$$

pour un temps d'incubation donné. ●—● Courbe correspondant aux résultats de la figure 17
○—○ on ajoute 0,2mM en ATP dans le viscosimètre et □—□ la concentration en calcium est diminuée de moitié (soit 0,1mM) sans ajout d'ATP.



est exactement ce que la figure 18 nous permet de constater lorsque la concentration en ion calcium passe de 0,2mM (points noirs) à 0,1mM (carrés vides).

De façon à obtenir une preuve encore plus explicite que la perte de polymérisabilité est reliée à l'enlèvement du nucléotide de l'actine, nous avons mesuré la quantité d'ATP lié à l'actine pendant une incubation en présence de Dowex. A différents temps on a prélevé un échantillon du milieu réactionnel qu'on a ensuite centrifugé pour le débarrasser de son Dowex. Une partie du surnageant a été utilisée pour le test de polymérisabilité par la méthode déjà décrite alors qu'une seconde partie (0,5 ml) a servi à mesurer la quantité d'ATP liée à l'actine. Pour ce faire, on lui ajoute 0,5 ml de TCA 10% de façon à précipiter l'actine tout en lui détachant son nucléotide lié. Après une incubation de 30 minutes à 4°C, on centrifuge à 3000 × g pendant 10 minutes. On récupère alors 0,9 ml de surnageant libre d'actine auquel on ajoute 0,9 ml de HCl 2N pour ensuite hydrolyser le tout 20 minutes à 100°C. Le tube est ensuite refroidi, son volume est ajusté à 2,0 ml avec de l'eau puis on dose l'orthophosphate qu'il contient par la méthode du vert de Malachite. (La figure 19 nous montre la cinétique bien connue de cette hydrolyse acide à 100°C. On peut constater que 2,25 moles d'orthophosphate sont formées par mole d'ATP après environ 20 minutes.)

On peut voir à la figure 20 qu'il existe pour l'actine une certaine correspondance entre le % de la perte de polymérisabilité et celui de la perte de son ATP lié. Ces derniers résultats démontrent clairement que les deux phénomènes sont directement reliés l'un à l'autre. La perte de l'ATP

FIGURE 19: Cinétique de l'hydrolyse acide de l'ATP. A une série de tubes contenant 0,45 ml d'une solution d'ATP 30 μ M, on ajoute 0,45 ml de TCA 10%, puis 0,9ml de HCl 2N. Les tubes sont plongés dans de l'eau bouillante puis retirés à des temps prédéterminés et refroidis rapidement. Le volume est ensuite ajusté à 4,0 ml et un dosage direct de l'orthophosphate est pratiqué par la méthode du vert de Malachite. La quantité de phosphate retrouvée est exprimée en terme de nombre de mole d'orthophosphate libéré par mole d'ATP ($\text{PO}_4^{3-}/\text{ATP}$).

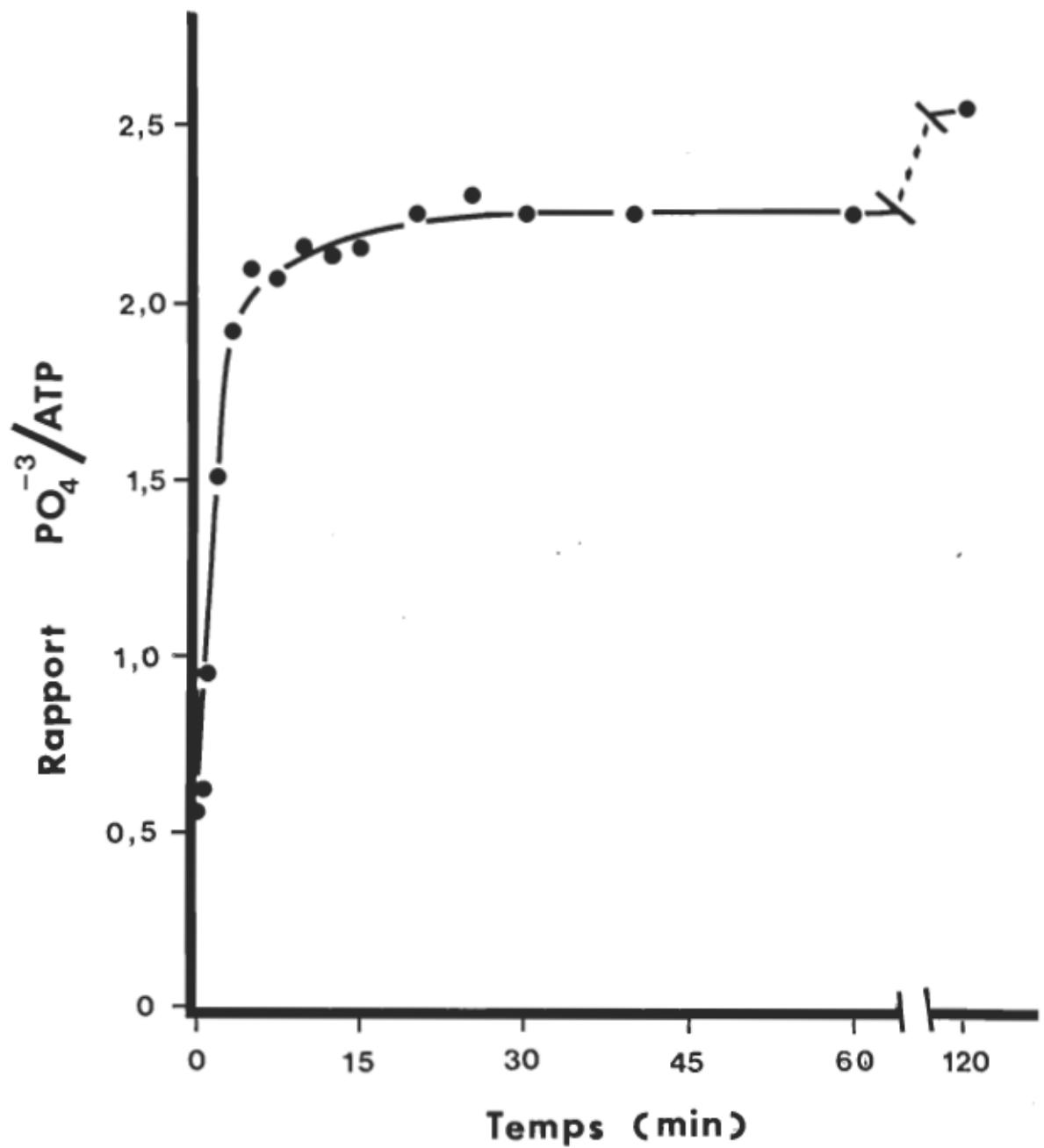
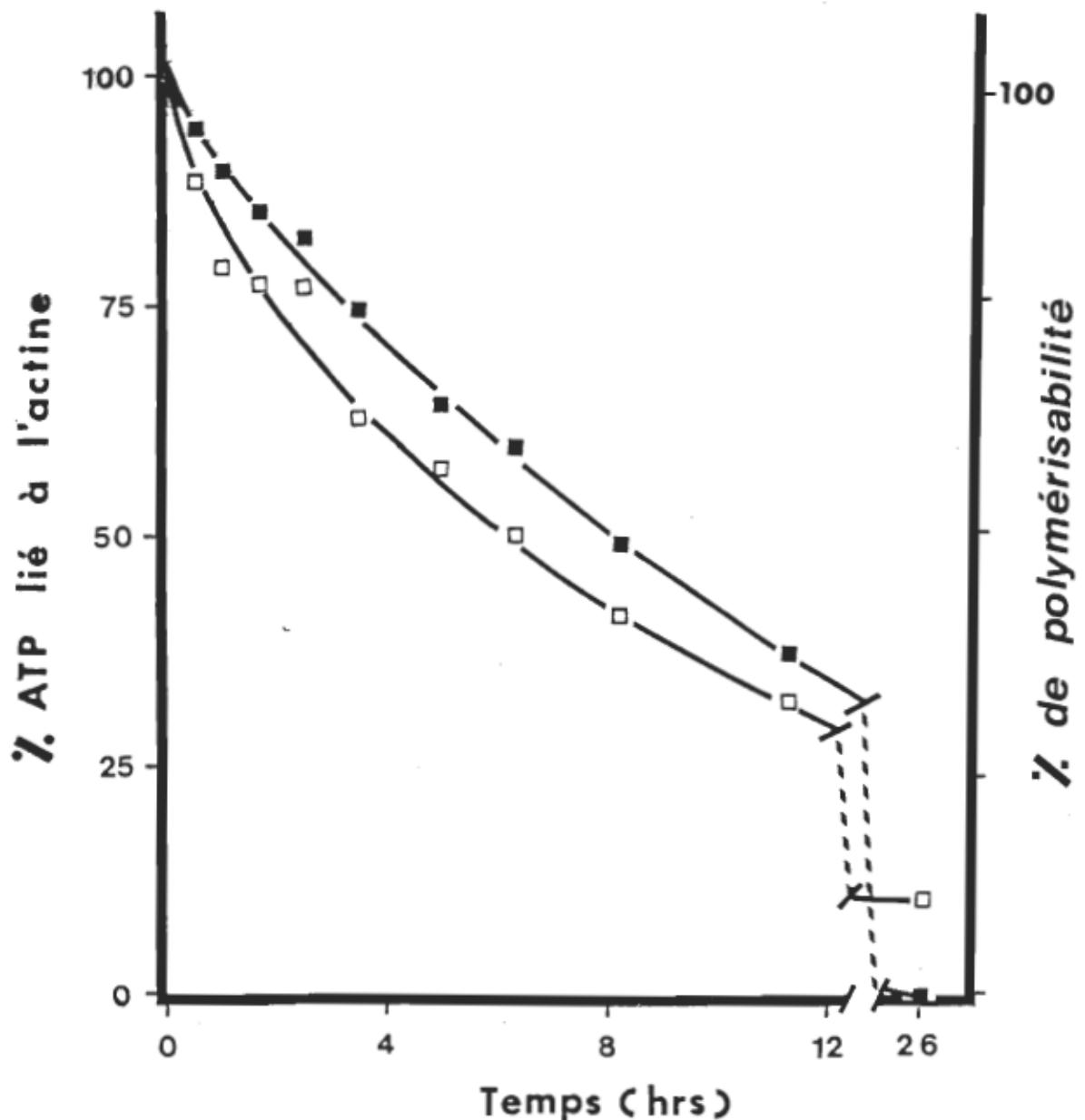


FIGURE 20: Effet d'une incubation à 4°C en présence de Dowex sur le contenu en nucléotide de l'actine. Le % d'actine contenant de l'ATP est calculé suite à 20 minutes d'hydrolyse acide du surnageant obtenu après la précipitation au TCA 10%. Le 100% d'ATP lié à l'actine correspond à la quantité de phosphate retrouvée au temps zéro: □—□ % d'actine contenant de l'ATP, ■—■ % de polymérisabilité de la même actine suivi en parallèle.



de l'actine entraîne donc sa dénaturation. De plus cette dénaturation semble irréversible puisque l'addition d'ATP au milieu débarrassé de Dowex n'a pu faire réintégrer à l'actine sa polymérisabilité perdue.

A la lumière de ces faits, notre hypothèse selon laquelle la perte des propriétés de l'actine, suite à l'action de nos membranes cytoplasmiques d'hépatocytes, pourrait être due, en bonne partie du moins, à la disparition rapide des nucléotides du milieu se retrouve renforcée. On a pu voir, en effet, que l'enlèvement des nucléotides par le Dowex I produit le même effet sur la polymérisabilité de l'actine que son exposition en présence de membranes (dont l'une des caractéristiques est justement d'éliminer très rapidement tout l'ATP du milieu réactionnel). Il est bien sûr impossible d'affirmer que c'est là l'unique action des membranes, puisque la baisse de la polymérisabilité de l'actine est beaucoup plus rapide en présence d'une forte concentration de membranes qu'en présence de Dowex, mais cette perte joue certainement un rôle très important dans l'inactivation des propriétés de l'actine.

Dans la section qui suit, nous verrons comment on peut utiliser les propriétés du Dowex I-X8 pour échanger rapidement l'ATP lié à l'actine par de l'ATP tritié. Ce qui nous permettra plus tard d'observer directement le nucléotide lié à l'actine lors d'une incubation avec nos membranes.

3.2.3.2 Marquage de l'actine-G au moyen de $\{^3\text{H}\}$ -ATP

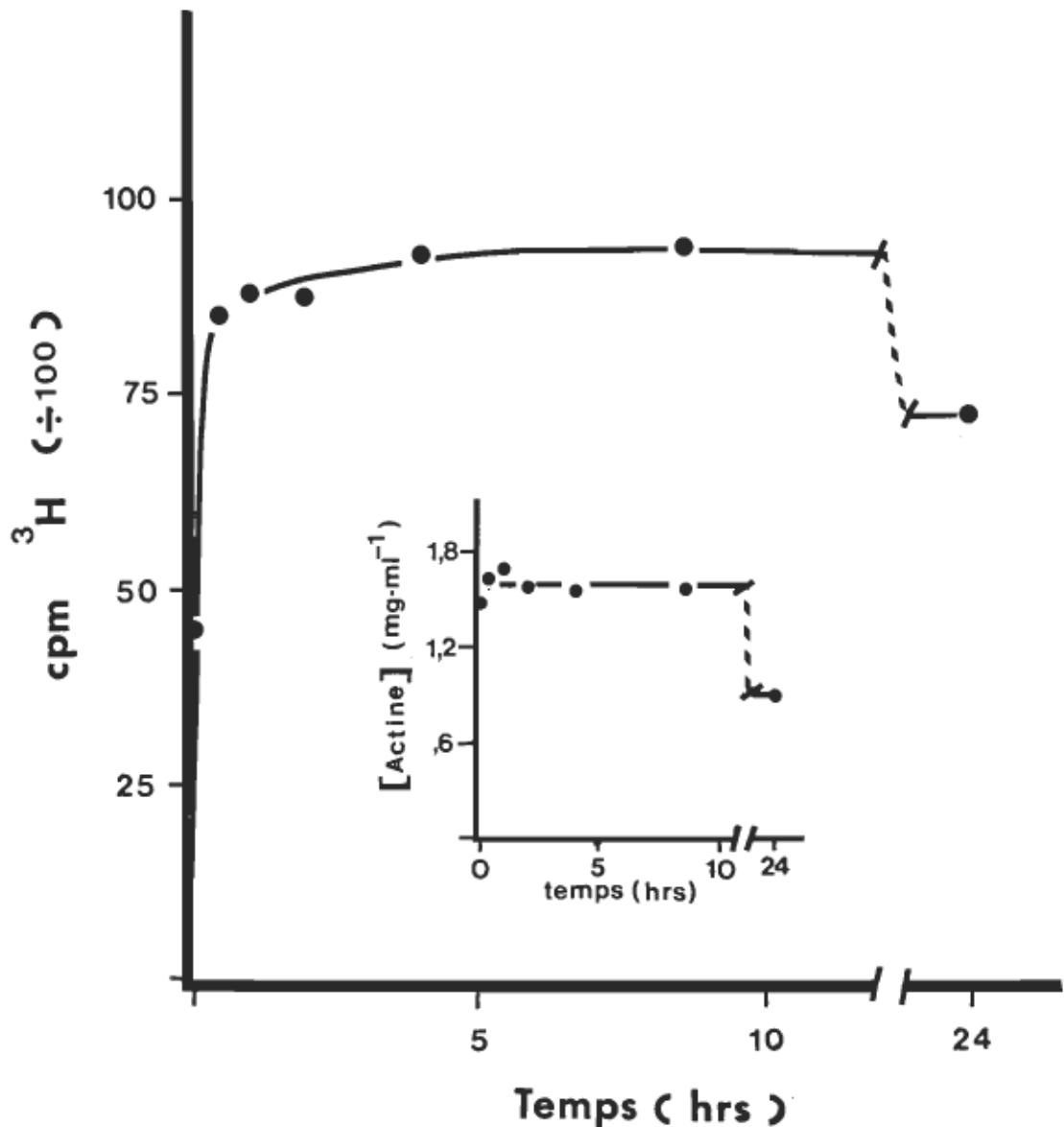
L'étude de l'effet du Dowex I-X8 sur l'actine-G nous a permis de mettre au point une technique rapide (voir section 2.11) de marquage de l'actine par le biais de son nucléotide lié.

Nous avons vu plus tôt que l'actine mise en contact avec le Dowex I ne subit que très peu d'altération dans les premières minutes alors que tous les nucléotides ont déjà été virtuellement échangés par le Dowex. Ainsi, si on enlève tout l'ATP libre d'une solution d'actine-G par une rapide incubation (5 min à 0°C) avec du Dowex I et que l'on retire ensuite entièrement cette résine échangeuse d'anions, l'actine n'aura pas le temps d'être dénaturée. Si on ajoute aussitôt une solution d'ATP (enrichie d' $\{\text{^3H}\}$ -ATP) de façon à obtenir 1 molécule d'ATP libre pour 10 molécules d'actine-G-ATP et ce dans un milieu où la concentration en calcium est de 4 fois inférieure à celle du tampon-G standard, l'ATP de l'actine pourra facilement s'échanger avec l'ATP tritié libre.

Après seulement 30 minutes de ce traitement, on obtient une incorporation d'ATP tritié sur l'actine pouvant aller jusqu'à 90%. (Voir figure 21). Il est toutefois nécessaire de ne pas prolonger induemment la période de marquage car passé quelques heures, l'actine pourra se dénaturer. Il ne faut pas oublier que les conditions en ATP et en calcium utilisées ici ne sont pas tout-à-fait favorables à une conservation optimale de l'actine-G.

On voit donc qu'il est relativement facile d'obtenir de l'actine-G marquée. Mais il faut toutefois garder en tête que cet ATP tritié sera lui aussi susceptible de s'échanger avec l'ATP non marqué du milieu ambiant et qu'il serait sage d'utiliser l'actine marquée peu de temps après son traitement.

FIGURE 21: Incorporation de $\{^3\text{H}\}$ -ATP sur l'actine-G-ATP en fonction du temps d'incubation à 0°C . A un temps donné on prélève 0,5ml du milieu réactionnel qu'on traite au Dowex I-X8. Le filtrat est ensuite compté directement dans une fiole à scintillation contenant 15 ml de scintillant de Bray. Milieu d'incubation: Tris-HCl 2,0mM, β -Mercaptoéthanol 0,5mM, CaCl_2 0,05mM, actine 36,6 μM et ATP libre 3,95 μM et possédant une activité spécifique finale de 16,7mCi/mmol. Le petit graphique représente la concentration d'actine mesurée par la méthode du Bio-rad à divers temps d'incubation.



3.2.4 Action des membranes cytoplasmiques d'hépatocytes sur l'actine

Nous avons démontré plus tôt l'existence de NPAses membranaires pouvant détruire en quelques minutes tout l'ATP, ainsi que ses autres dérivés moins énergétiques, d'un milieu réactionnel donné. On sait aussi que l'actine-G incubée dans un milieu sans nucléotide se dénature lentement alors qu'elle perd son nucléotide lié.

De plus, nous avons vu que l'utilisation d'un témoin approprié (membranes + tampon G) permet de conclure à l'inexistence d'une phosphorylation de l'actine lorsqu'incubée en présence de membranes cytoplasmiques d'hépatocytes.

Ces trois faits peuvent nous amener à conclure que la phosphorylation de l'actine observée par Grazi (55) pourrait être en fait un artéfact expérimental. Nous ne possédons toutefois pas encore suffisamment d'élément pour être en mesure d'affirmer sans contredit que ce soit le cas. De plus, la grande importance que présente la possibilité que la phosphorylation soit l'un des mécanismes importants de la régulation intracellulaire des formes -G et -F de l'actine, a nécessité une vérification plus approfondie et encore plus méthodique de cette absence de phosphorylation.

C'est dans cette optique que la présente section relatera les résultats divers obtenus lors d'une expérience unique où nous avons tenté d'observer simultanément le maximum de facteurs possibles.

Rappelons que nous possédions déjà plusieurs des informations que cette expérience à multiples facettes pouvait nous apporter. Nous avons

toutefois choisi d'exposer intégralement tous les résultats qu'elle nous délivre et cela même s'il en découle certaines répétitions, telles l'absence de phosphorylation et la destruction des nucléosides du milieu réactionnel.

La raison bien évidente de ce choix est de pouvoir comparer entre eux tous les éléments disponibles en éliminant le facteur de variabilité survenant d'une préparation de membrane à une autre.

Nous pourrons ainsi avoir un aperçu plus juste de la séquence réelle des événements survenant lorsque l'actine est mise en présence d'une fraction enrichie de membranes cytoplasmique d'hépatocytes.

Mentionnons enfin que nous nous bornerons dans cette section à présenter nos résultats en ne les commentant principalement que pour leur valeur ponctuelle, préférant réserver nos déductions générales pour le chapitre ultérieur de discussion.

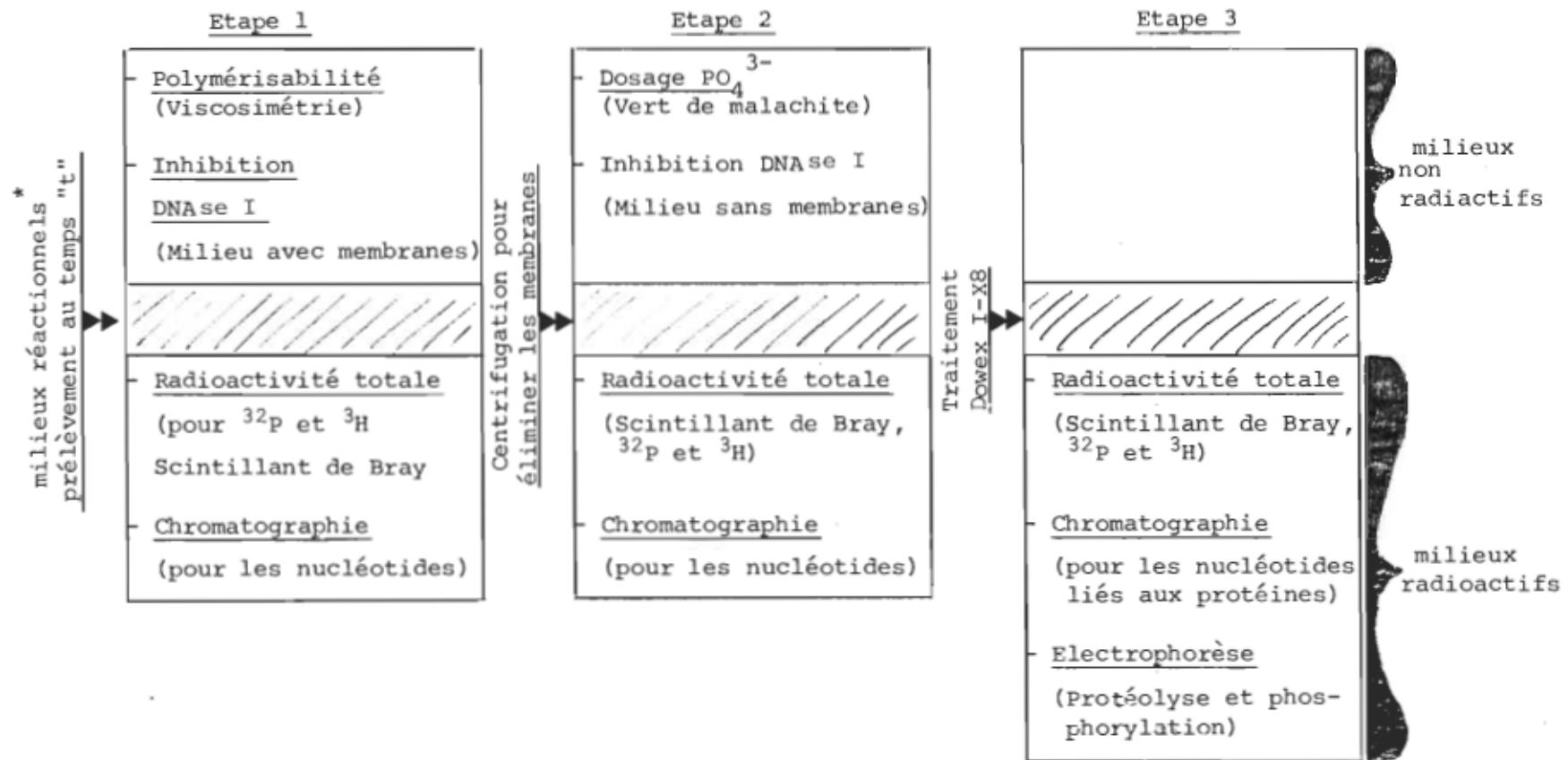
3.2.4.1 Préparation et échantillonnage

La préparation de l'expérience dont nous décrirons les résultats ici a exigé une planification exhaustive. Chaque méthode d'analyse a dû être simplifiée au maximum tout en nécessitant une technique de manipulation rapide et tout à fait au point.

On peut voir sur le tableau VII que jusqu'à 11 paramètres ont pu être étudiés simultanément pour un type de milieu réactionnel donné. On est à même de constater que, suite à la prise d'un échantillon, l'étude de ces paramètres s'est effectuée en 3 étapes. La première consistait en une

Tableau VII

Opérations à effectuer à un temps donné pour une prise d'échantillon



* Plusieurs milieux ont été étudiés simultanément (Voir tableau VIII)

N.B.: A un temps d'incubation donné, on effectue un prélèvement à partir duquel chaque étape sera faite.

mesure directe d'un ou plusieurs facteurs sur le milieu réactionnel n'ayant subi aucun traitement préalable. La seconde étape est survenue après l'élimination des membranes par une centrifugation à 4°C alors que la troisième subissait, en plus de l'élimination des membranes, un retrait des nucléotides libres par un passage rapide au Dowex I. Il faut ajouter à cela que la majorité de ces paramètres ont été étudiés pour plusieurs milieux réactionnels différents.

On peut voir sur le tableau VIII que jusqu'à 10 milieux réactionnels différents ont été préparés. De façon à minimiser les différences expérimentales d'un milieu à l'autre, ces préparations ont été effectuées à l'aide des mêmes solutions stock d'actine-G-ATP à 3 mg/ml (marquée ou non), de suspension homogène de membranes cytoplasmiques de lapin, de tampon G sans ATP et d'une solution à 2,67mM ATP contenant, ou non, du $\{^3\text{H}\}$ -ATP libre ainsi que du $\{^32\text{P}\}\gamma$ -ATP libre. On peut constater que 5 de ces milieux ne possédaient aucune radioactivité et qu'ils se définissaient comme suit: A et B contenaient de l'actine-G (1 mg/ml) et deux concentrations différentes de membranes, D et E correspondaient à leur témoin respectif sans actine alors que C représentait le témoin d'actine-G sans membranes.

Les 5 autres milieux (A*, B*, C*, D* et E*) étaient essentiellement identiques aux premiers sauf qu'ils possédaient de l' $\{^3\text{H}\}$ -ATP et du $\{^32\text{P}\}\gamma$ -ATP libres et que l'actine-G ayant servi à leur préparation avait préalablement été marquée au tritium suivant la méthode précédemment écrite. Ainsi, le milieu A* était l'exacte réplique radioactive de A, et ainsi de suite, on a pu ainsi éliminer la manipulation de matériel radioactif lorsqu'elle n'était pas essentielle, de même qu'on a pu abaisser le

TABLEAU VIII: Dans tous les cas, les conditions suivantes ont été respectées: Actine-G-ATP 1,0 mg/ml (lorsque présente), CaCl_2 0,1mM, Tris-HCl pH8 2,0mM, β -Mercaptoéthanol 0,1mM et ATP 0,2mM. Pour les milieux contenant de la radioactivité, les différences suivantes s'appliquent; l'actine-G-ATP était remplacée par de l'actine-G- $\{\text{H}^3\}$ -ATP fraîchement préparée et possédant une activité spécifique de $8,6 \times 10^4$ dpm/mg d'actine, et tous ces milieux radioactifs contenaient aussi de $1\cdot\{\text{H}^3\}$ -ATP libre, à $4,05 \times 10^5$ dpm/ml, et du $\gamma\{\text{P}^{32}\}$ -ATP libre à $6,5 \times 10^5$ dpm/ml (au moment de la lecture dans ce dernier cas)

Tableau VIII

Composition de chacun des milieux réactionnels

a) Milieux sans radioactivité

Solution	Actine-G-ATP	Membranes cytoplasmiques d'hépatocytes de lapin	
		0,1 mg/ml	2,0 mg/ml
A	OUI	OUI	-
B	OUI	-	OUI
C	OUI	-	-
D	-	OUI	-
E	-	-	OUI

b) Milieux avec radioactivité

Solution	Actine-G-{ ³ H}-ATP	Membranes cytoplasmiques d'hépatocytes de lapin	
		0,1 mg/ml	2,0 mg/ml
A*	OUI	OUI	-
B*	OUI	-	OUI
C*	OUI	-	-
D*	-	OUI	-
E*	-	-	OUI

coût final de l'expérience.

Le dernier élément, et non le moindre, dont nous parlerons se rapporte au prélèvement des échantillons. Les tableaux IX et X nous indiquent les temps d'incubation à 30°C de l'actine-G-ATP, et ceux de l'actine-G-{³H}-ATP respectivement, en présence de membranes avant la prise d'échantillon. On peut d'abord y constater qu'un certain choix préalable a dû être effectué et que les témoins ne subissent pas les opérations à la même fréquence que les milieux A, B, A* et B*. Ceci s'explique facilement si on tient compte des facteurs temps et argent qui ont contribué à l'élimination de certaines mesures d'une importance jugée moindre initialement.

Nous allons maintenant procéder à un exemple réaliste de l'utilisation que nous avons faite des tableaux VIII, IX et X de façon à mieux comprendre l'enchevêtrement de chacune des nombreuses étapes, à partir de la prise d'un échantillon à un temps donné jusqu'à la réalisation de la mesure de tous les paramètres.

A titre d'exemple, utilisons le temps "zéro", soit le moment qui suit immédiatement la préparation finale des différents milieux réactionnels (Voir tableau VIII). En se référant au tableau IX, on peut voir que, à l'étape 1, les deux milieux A et B ainsi que leurs témoins (C, D et E) se sont vu retirer sans traitement préalable 40µl pour le test immédiat d'inhibition de la DNase I pancréatique (Voir section 2,8). Par contre, au même temps "zéro", seulement les milieux A, B et C, les seuls possédant de l'actine-G-ATP, ont fourni 1,0 ml chacun pour le test immédiat de polymérisabilité (Voir section 2,10 pour méthode).

TABLEAU IX: Les compositions exactes des milieux A, B, C, D et E sont décrites au tableau VIII. L'étape 1 signifie une mesure directe d'un paramètre à partir du milieu réactionnel n'ayant subi aucun traitement. L'étape 2 indique une centrifugation de 30 min à 0°C pour éliminer les membranes avant d'effectuer les mesures. Pour l'étape 3, le milieu centrifugé de l'étape 2 est débarrassé des nucléotides libres par un passage au Dowex I-X8.

Tableau IX

Prélèvement des échantillons pour les milieux sans radioactivité

Etape	1	1	2	2
Temps de prélevement (min)	Polymérisabilité (1,0 ml dans viscosimètre)	DNAse I (Inhibition par l'actine-G, 40µg)	DNAse I (Inhibition par Actine-G, 40µg)	Dosage PO ₄ ³⁻ (0,25 ml précipité avec 0,25 ml de TCA puis congelé)
0	ABC	ABCDE	ABCDE	ABCDE
10	AB	-	ABC	ABC
17	-	ABC	-	-
30	AB	ABC	AB DE	AB DE
60	AB	ABC	ABC	ABC
120	AB	ABC	ABC	ABC
285	-	ABCDE	ABCDE	ABCDE
300	ABCDE	-	-	-
540	-	ABC	-	-
1020	C	ABC	-	-

Tableau X

Prélèvement des échantillons pour les milieux radioactifs

Etape	1	1	2	2	3	3	3
Temps de prélèvement (min)	<u>Radio-activité totale,</u> ^3H et ^{32}P (50 μg , par scintillant Bray)	<u>Chromato des nucléotides</u> (50 μg 50 μl de TCA 10% et congeler)	<u>Radio-activité totale,</u> ^3H et ^{32}P (par Bray, 50 μl)	<u>Chromato des nucléotides</u> (50 μl 50 μl de TCA 10% et congeler)	<u>Radio-activité totale,</u> ^3H et ^{32}P (50 μl , par Bray)	<u>Chromato des nucléotides</u> (50 μl 50 μl de TCA 10% et congeler)	Electro-phorèse (100 μl 100 μl tampon électro. 2X, bouillir et congeler)
0	ABCDE	AB DE			ABCDE		
5	-	AB DE			AB DE		
15	-	-			AB		
30	-	AB DE			AB DE		
55	-	-			AB		
105	-	-			AB		
200	-	AB DE			ABCDE		
340	ABCDE	-			AB		
600	-	AB DE			AB		
900	-	-			ABCDE		

N.B.: Pour les détails se référant aux diverses étapes, voir la légende du tableau IX.

Au même moment, toujours au temps "zéro", 0,5 ml de chacun des milieux A, B, C, D et E était rapidement refroidi sur de la glace puis centrifugé à 20 000 x g 30 minutes à froid pour précipiter les membranes. Cette centrifugation constitue le traitement préalable à étape 2 de la prise d'échantillons. Ainsi, pour chaque milieu réactionnel, (A, B, C, D et E), 0,25 ml de surnageant seront précipités avec 0,25 ml de TCA à 10% puis immédiatement congelés de façon à pouvoir faire plus tard le dosage au vert de Malachite du phosphore lié à l'actine (Voir méthode à la section 2.5). Quarante microlitres du même surnageant seront retirés au même moment pour le test immédiat d'inhibition de la DNase I pancréatique de l'étape 2.

On peut considérer que les étapes 1 et 2 correspondent à peu près au même temps d'incubation réel à 30°C pour chaque milieu réactionnel. En effet, la réaction enzymatique est presque stoppée lors du refroidissement précédent la centrifugation, de même que cette centrifugation, à 20 000 x g retire rapidement la suspension membranaire du milieu.

Nous n'avons toutefois parlé jusqu'ici que des milieux réactionnels sans radioactivité. Le processus de prise d'échantillons pour les milieux avec radioactivité suit exactement le même principe, mais on utilise alors le tableau X, et la situation est légèrement plus complexe.

Au temps zéro, toujours, 50 µg des milieux A* et B* ainsi que leurs témoins C*, D* et E* sont déposés dans une fiole à scintillation contenant déjà 15 ml de scintillant de Bray (Voir section 2.6) pour la détermination du ^{32}P et du 3H total présents dans chaque milieu. Au même moment, 50 µl des milieux A* B* D* et E* sont précipités, lorsqu'on les ajoute à une quantité

égale de TCA 10%, puis immédiatement congelés pour l'étude subséquente de leur contenu en ATP et en ses dérivés adénylés par chromatographie descendante sur papier (Voir section 2.7).

Ces deux dernières manipulations se sont effectuées sans aucun traitement préalable des milieux réactionnels et constituent l'étape 1 de la prise d'échantillon.

Au même temps "zéro", 0,5 ml de chacun des milieux radioactifs sont refroidis rapidement sur glace, puis centrifugés à froid pour éliminer les membranes. Suite à ce traitement de 30 minutes, l'étape 2 débute par le retrait de 50 μ l de surnageant qu'on dépose directement dans des fioles à scintillation contenant déjà 15 ml de scintillant de Bray pour la détermination du ^{32}P et du 3H présent dans chaque milieu à ce moment.

A la même étape 2 on effectue le retrait d'un autre 50 μ l de chaque milieu réactionnel (A*, B*, C*, D* et E*) qui sera précipité par une quantité égale de TCA 10% et congelé en préparation de sa chromatographie pour l'identification des nucléosides présents après l'élimination des membranes.

Du même surnageant de la centrifugation de 30 minutes, on prélève 300 μ l que l'on traite avec 1/6 de volume (Voir section 2,11) d'une suspension de Dowex I-X8 de façon à éliminer les nucléotides non liés aux protéines du surnageant. Les prises d'échantillons qui suivront vont constituer l'étape 3 où l'on a, idéalement, le milieu réactionnel initial sans membranes ni ses nucléotides libres ainsi que leurs dérivés adénylés.

De la solution obtenue suite à ce passage au Dowex I, on prélève

100 μ l qu'on ajoute à 100 μ l de tampon d'électrophorèse 2X (Voir section 2.9), puis, après avoir fait bouillir 2 minutes, on congèle le tout jusqu'au moment de procéder à l'électrophorèse.

Toujours, donc, au temps zéro et à l'étape 3, les 5 milieux (A*, B*, C*, D*, E*) se voient ensuite retirer 50 μ l pour une lecture directe du ^{32}P et ^{3}H avec le scintillant de Bray puis finalement un dernier 50 μ l est ajouté à 50 μ l de TCA 10% en prévision de la chromatographie descendante sur papier des nucléotides liés à l'actine.

Toutes ces opérations décrites pour le temps zéro devant être effectuées au même moment, il est compréhensible que nous ayons dû décaler de quelques heures le début des expériences en radioactivité par rapport à celles n'en contenant pas. Nous avons toutefois jugé ce délai insuffisant pour altérer la valeur du parallélisme des résultats obtenus d'une expérience par rapport à l'autre. (Rappelons ici que l'actine radioactive a quand même été préparée dans les quelques minutes précédent son utilisation.)

Tous les résultats qui ont été compilés suite à l'analyse individuelle de chaque échantillon seront présentés dans les prochaines sections. Toutefois, chacun des aspects de cette "monstrueuse" expérience sera traité de façon relativement isolée, de manière à en simplifier la compréhension. Nous garderons nos commentaires généraux quant à l'interrelation de chacun de ces facteurs pour le chapitre de discussion.

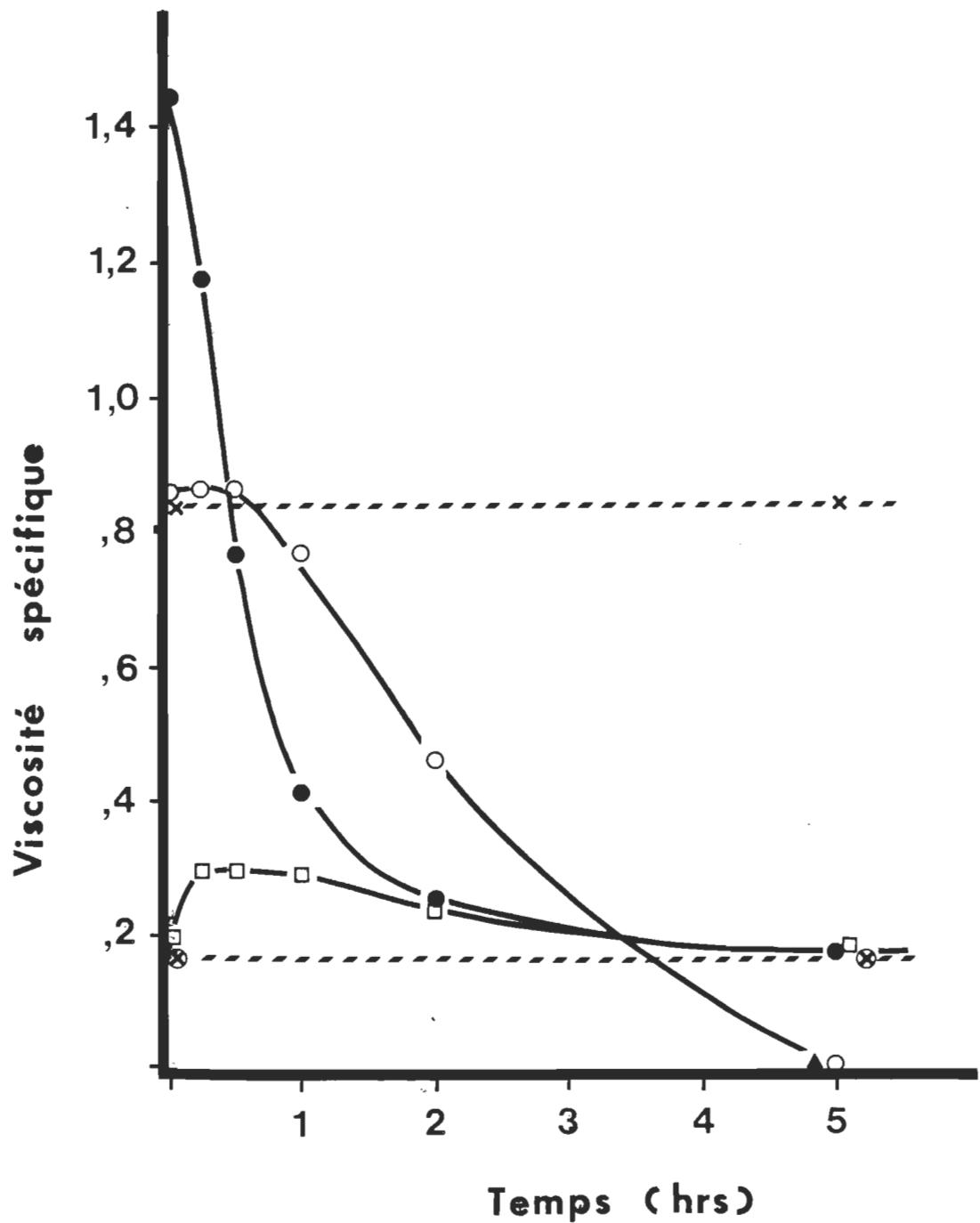
3.2.4.2 Effet des membranes sur la polymérisabilité de l'actine

L'effet des membranes cytoplasmiques d'hépatocytes sur la polymérisabilité de l'actine-G a été vérifié directement à partir du milieu réactionnel sans enlever préalablement les membranes. La figure 22 nous présente, pour chaque milieu réactionnel, la viscosité spécifique maximale du plateau atteinte suite à l'ajout de la solution de polymérisation en fonction du temps d'incubation de l'actine avec les membranes à 30°C.

On peut y voir que la viscosité spécifique maximale du plateau de polymérisation est restée stable à une valeur moyenne de 0,84 tout au long des 5 heures d'incubation pour le témoin d'actine-G sans membranes. De même, on peut voir que le témoin de membranes à 0,1 mg/ml (sans actine) possède une viscosité spécifique de zéro dans nos conditions de mesure et cela avec ou sans l'ajout de la solution de polymérisation (solution 1/29).

Puisque la viscosité spécifique maximale du plateau de polymérisation nous procure une bonne image de la polymérisabilité de l'actine à un temps d'incubation donné, on peut constater que l'actine-G mise en présence d'une faible concentration de membranes cytoplasmiques d'hépatocytes de lapin perd entièrement sa propriété de polymérisabilité en l'espace de 5 heures. La valeur légèrement supérieure à celle de l'actine seule que l'on remarque cependant pour l'actine en présence de membranes à faible concentration au début de la période d'incubation ne devient significative que si l'on prend en considération les fortes valeurs initiales de viscosité obtenues pour l'actine en présence de membranes à forte concentration

FIGURE 22: Effet des membranes plasmiques de foie de lapin sur la polymérisabilité de l'actine-G à 20°C. La polymérisation de l'actine est démarrée dans un viscosimètre par l'ajout de 35 μ l de la solution 1/29. L'incubation de l'actine à 1,0 mg/ml s'est effectuée en présence de membranes à 30°C. Les conditions exactes ainsi que la méthode sont décrites à la section 2.10 et au tableau VIII: ○—○ Milieu A (Membranes 0,1 mg/ml), ▲—▲ Milieu D (Membranes 0,1 mg/ml sans actine), ●—● Milieu B (Membranes 2,0 mg/ml) ⊗—⊗ Milieu E (Membranes 2,0 mg/ml sans actine) □—□ Milieu B sans faire polymériser avec la solution 1/29 et finalement, X-----X Milieu C (Actine témoin).



(2,0 mg/ml).

En effet, on peut voir que, malgré une perte de polymérisabilité plus rapide dans ce dernier cas, soit environ 2 heures pour l'obtention d'une viscosité minimale équivalent à celle obtenue pour le témoin de membranes sans actine, la viscosité maximale au temps zéro est de 1,45. Par un calcul simple, le rapport de la différence du surplus de la viscosité des milieux A et B par rapport à l'actine seule est d'environ 20, ce qui correspond tout à fait au rapport des concentrations de membranes utilisées dans ces deux milieux.

Il est tentant à ce point de proposer, à partir de cette relation assez directe, une hypothèse selon laquelle un facteur membranaire quelconque produirait un effet tel sur l'actine que cette dernière serait en mesure de subir une certaine forme de gélification. Les limites du sujet du présent travail ne nous ont cependant pas permis de vérifications plus poussées quant à cette possibilité, mais ce fait demeure toutefois très intéressant. Quoiqu'il en soit, les résultats présentés à la figure 22 nous fournissent la preuve indiscutable de la perte de la polymérisabilité de l'actine-G suite à une exposition relativement prolongée en présence de membranes cytoplasmiques d'hépatocytes. On peut aussi noter que cet effet des membranes n'est pas en relation directe avec leur concentration à l'intérieur des limites où nous avons travaillé.

3.2.4.3 Effet des membranes sur la capacité d'inhibition de l'actine-G sur la DNase I pancréatique

A la section, 3.1.4 nous avons déjà présenté en détail l'utilisation et le traitement des résultats obtenus par l'action inhibitrice de l'actine-G-ATP libre sur l'activité enzymatique de la DNase I pancréatique. Nous avons aussi mentionné à cette occasion la lente perte d'activité que subit cet enzyme lorsque décongelé et gardé à 4°C.

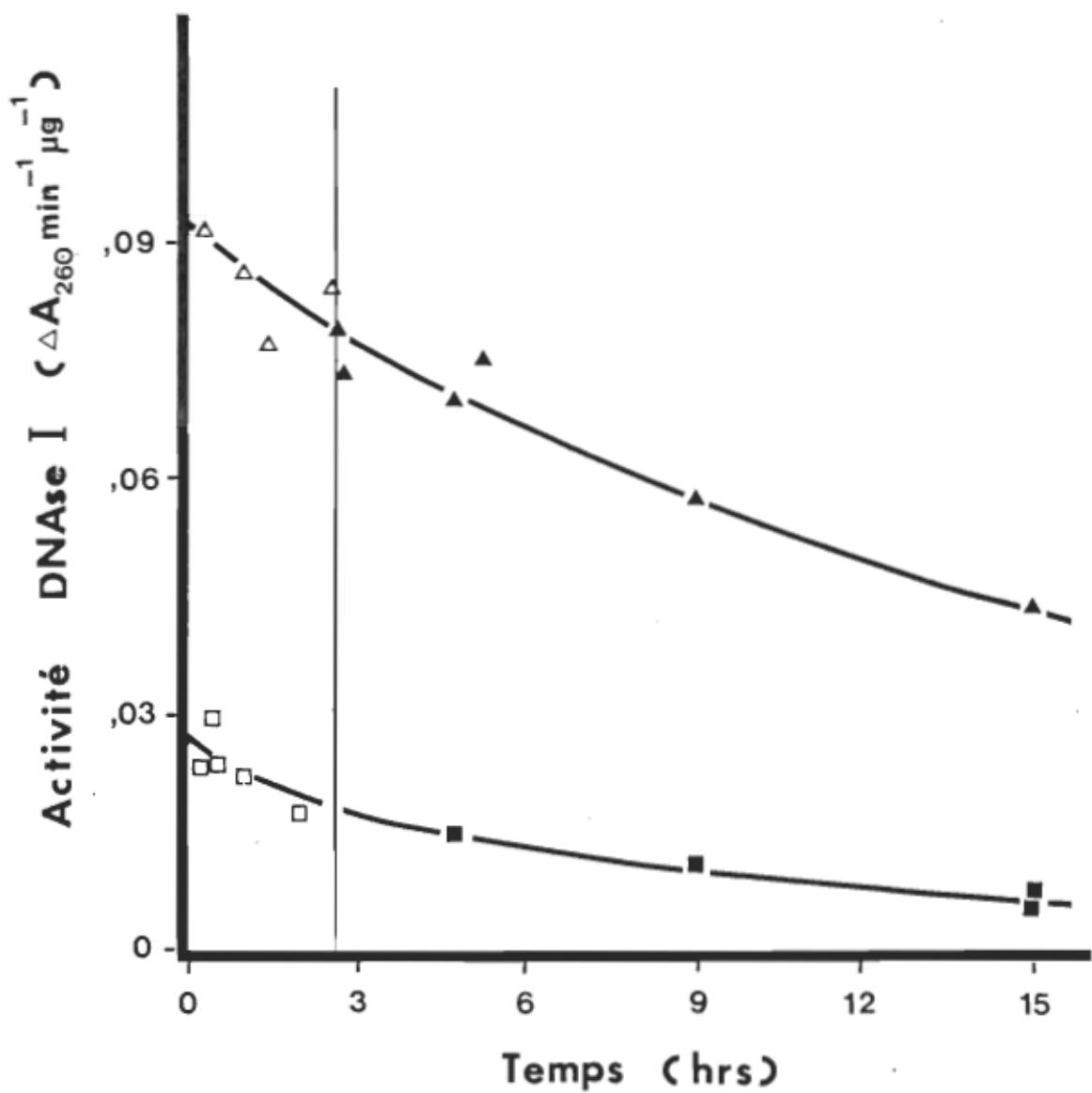
Il nous a été nécessaire de calculer cette baisse d'activité de la DNase I de façon à pouvoir doser correctement la quantité d'actine-G encore active de nos milieux réactionnels.

La figure 23 nous montre cette désactivation de la solution stock de DNase I en fonction de la durée totale de l'expérience. La coupure observée à 160 minutes indique l'épuisement du premier 50µl de solution stock de DNase I et son remplacement par un nouvel échantillon. La continuité de la courbe s'explique par le fait que les deux échantillons de DNase I ont été gardés dans les mêmes conditions jusqu'au moment de l'utilisation du second. La courbe inférieure de la même figure représente l'activité de la DNase I suite à l'inhibition causée par l'ajout de 40µl du milieu réactionnel "C" (l'actine-G sans traitement).

Les deux courbes de la figure 23 ont servi à déterminer le % d'actine possédant toujours la capacité d'inhiber la DNase I. Ce pourcentage d'actine "active" a été calculé au moyen de l'expression suivante:

FIGURE 23: Inactivation de la DNA se I pancréatique en fonction du temps de conservation à 4°C. A un temps donné, on prélève 40µl de milieu réactionnel contenant de l'actine auquel on ajoute 0,96 ml de tampon-G. Dans une cuvette de 3,5ml, on ajoute 40µl du milieu réactionnel dilué, puis 20µl de DNA se I pancréatique à 50µg/ml. Après avoir agité quelques secondes, on ajoute 3,0 ml de DNA à 40µg/ml puis on mesure immédiatement l'augmentation de l'absorbance à 260 nm à 21°C. Les symboles ouverts et fermés représentent respectivement deux solutions stock différentes de DNA se I maintenues dans des conditions identiques.

△—▲ Activité de la DNase I sans ajout d'actine. □—■ Activité de la DNA se I après avoir ajouté 40µl de milieu réactionnel "C" dilué.



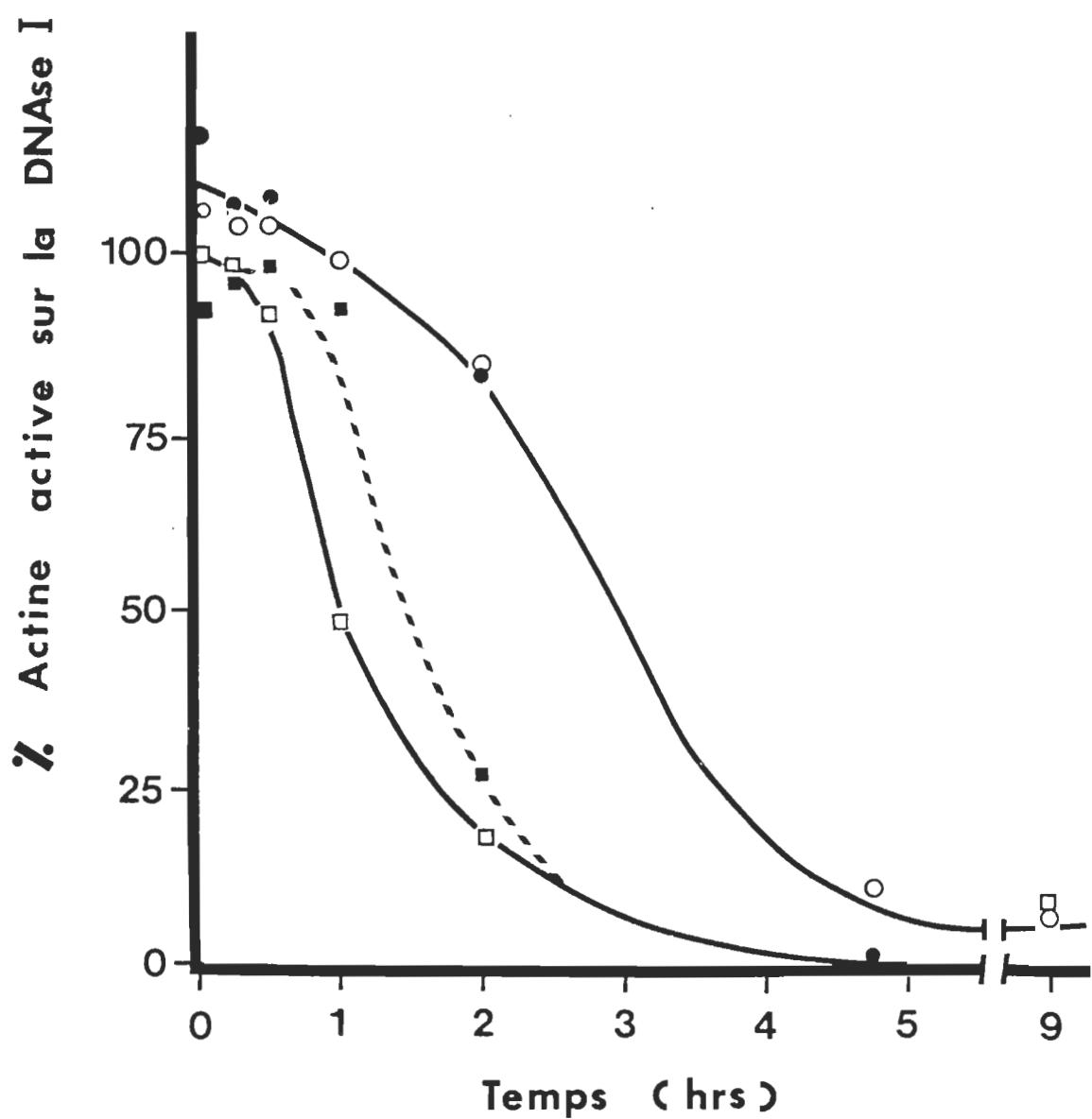
$$\% \text{ d'actine active} = \frac{\left\{ \begin{array}{l} \text{Activité DNAse I} \\ \text{seule} \end{array} \right\} - \left\{ \begin{array}{l} \text{Activité DNase I} \\ \text{avec actine d'un} \\ \text{milieu de réaction} \end{array} \right\}}{\left\{ \begin{array}{l} \text{Activité DNase I} \\ \text{seule} \end{array} \right\} - \left\{ \begin{array}{l} \text{Activité DNase I} \\ \text{avec actine témoin} \\ \text{du milieu "C"} \end{array} \right\}} \times 100$$

Ainsi, l'activité de la DNase I obtenue suite à l'inhibition produite par l'actine-G native non dénaturée (milieu "C") nous donne l'équivalent de 100% d'actine active de même que l'activité obtenue pour la DNase I sans ajout d'actine-G native possédera l'équivalent de 0%. Ce simple traitement mathématique permet d'obtenir une représentation graphique directement proportionnelle de la diminution de l'actine toujours capable d'inhiber la DNase I en fonction du temps d'incubation avec les membranes.

La figure 24 nous permet de voir que l'actine-G perd progressivement sa capacité d'inhiber la DNase I dans ces conditions. Lorsqu'elle est mise en présence de membranes à 0,1 mg/ml (Milieu "A"), il importe peu que le milieu réactionnel soit mesuré directement (Etape 1) ou encore qu'il soit débarrassé de ses membranes (Etape 2). On peut voir dans ces deux cas que la totalité de l'actine-G présente ne peut plus inhiber la DNase I après environ 5 heures d'incubation.

On peut remarquer ici une corrélation quasi-parfaite avec la perte de polymérisabilité obtenue à la figure 22. La modification subie par l'actine affecterait donc de façon semblable sa polymérisabilité et sa capacité d'inhiber la DNase I en présence d'une faible concentration de membranes.

FIGURE 24: Effet des membranes plasmiques de foie de lapin sur la capacité de l'actine à inhiber la DNase I pancréatique. La méthode et les conditions sont identiques à celles décrites à la figure 23. (Voir aussi tableau VIII). Le calcul du % d'actine active est indiqué dans le texte (p. 117); O—O Milieu A (Membranes 0,1 mg/ml) ●—● Milieu A centrifugé, soit l'étape 2, □—□ Milieu B (Membranes 2,0 mg/ml) ■---■ Milieu B à l'étape 2.



Une corrélation du même type peut être établie pour les courbes obtenues pour une concentration plus élevée de membranes (Milieu "B"). On peut voir sur les figures 22 et 24 que l'actine perd ses propriétés après de 2 à 3 heures d'incubation pour une mesure effectuée à l'étape 1, c'est-à-dire en présence de la suspension de membranes.

La courbe correspondant aux mesures d'inhibition de la DNase I obtenue lors de l'étape 2 (suite à l'enlèvement des membranes) pour le milieu B semble présenter un ralentissement de l'inactivation de l'actine en comparaison avec la courbe obtenue pour l'étape 1. Mais, même s'il est impossible de donner un sens exact à cette constatation, l'évidence qualitative d'une désactivation rapide de l'actine-G dans les deux cas demeure le point d'intérêt majeur.

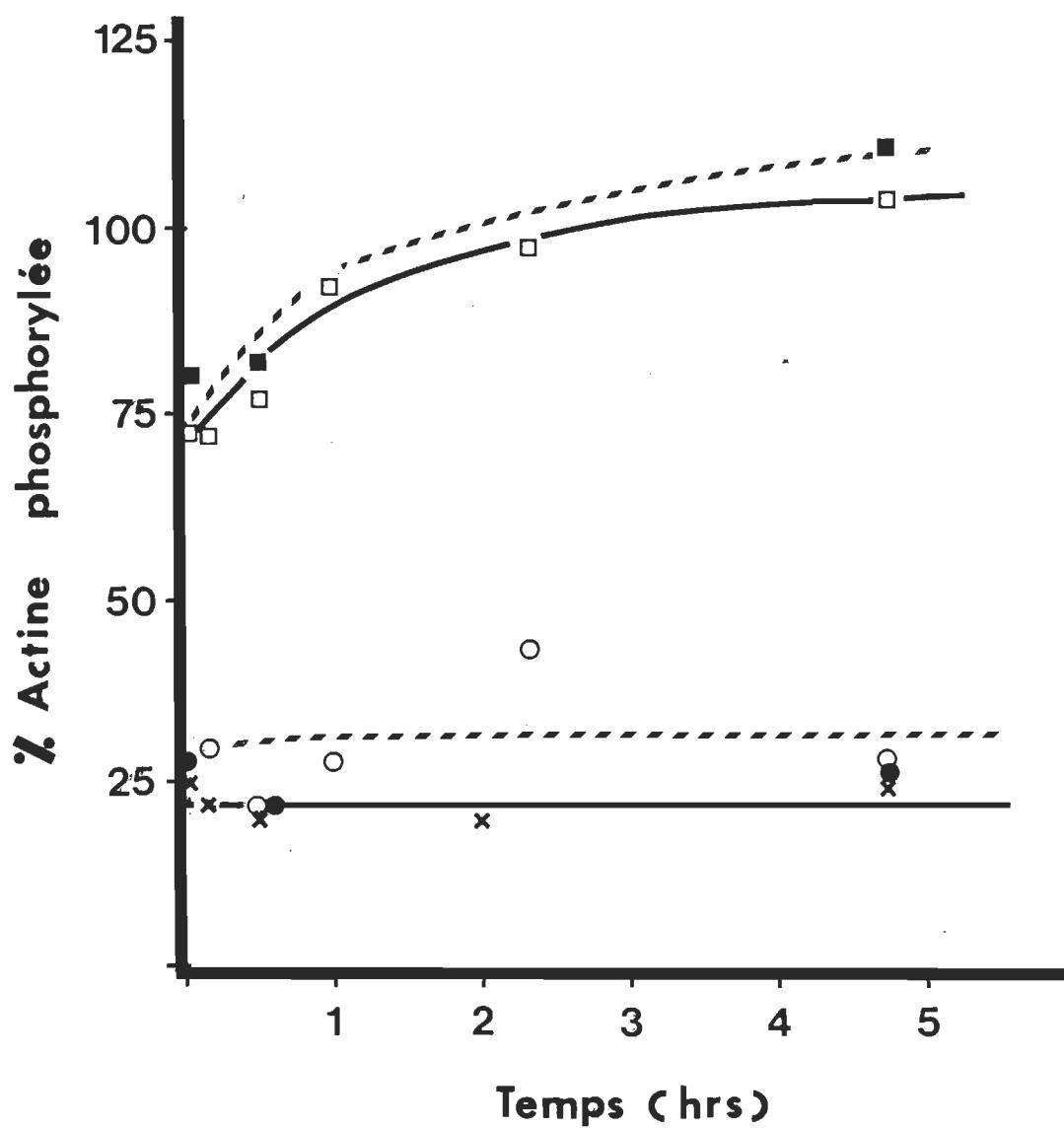
Ainsi, sans pouvoir encore certifier quel est le véritable effet des membranes sur l'actine, on peut tout de même déjà affirmer que cette dernière, lorsqu'elle est soumise à leur action, perd sa polymérisabilité et sa capacité d'inhiber la DNase I à un taux très semblable qui n'est déjà plus en proportion directe aux concentrations de membranes utilisées pour cette expérience.

3.2.4.4 Mesure du phosphore lié aux protéines du surnageant suite à la centrifugation des membranes

Nous avons utilisé la méthode colorimétrique au vert de Malachite pour vérifier la possibilité de phosphorylation de l'actine-G au contact des membranes cytoplasmiques d'hépatocytes. La figure 25 nous montre la quantité de phosphore retrouvée dans le précipité au

FIGURE 25: Effet des membranes plasmiques de foie de lapin sur la quantité d'orthophosphate libéré lors d'une incubation à 30°C en présence d'actine (Voir méthode détaillée à la section 2.5). Le % équivalent d'actine phosphorylée est expliqué dans le texte;

○-----○ Milieu A (Actine membranes 0,1 mg/ml),
●——● Milieu D (Membranes 0,1 mg/ml sans actine) □——□ Milieu B (Actine membranes 2,0 mg/ml), ■-----■ Milieu E (Membranes 2,0 mg/ml sans actine) et X——X Milieu C (Actine sans membranes).



TCA obtenu suite à l'élimination des membranes (Etape 2). Cette quantité de phosphore est exprimée, pour une meilleure clarté, en termes de % d'actine phosphorylée.) Il est évident que ce pourcentage est purement fictif, mais sachons tout de même qu'une mole de phosphore retrouvée pour l'équivalent d'une mole d'actine-G dans le milieu initialement représentera 100% d'actine phosphorylée sur cette figure.

Ainsi, en ne considérant que la courbe représentant le milieu réactionnel "B" (actine-G en présence de membranes à 2,0 mg/ml), on pourrait affirmer qu'une phosphorylation initialement très rapide de l'actine survient et qu'elle est complétée vers 100% de phosphorylation après environ 2 heures. Ce qui revient à dire que nous avons entièrement reproduit les résultats de Grazi (55) autant pour la phosphorylation que pour la perte d'inhibition de la DNase I et que pour la perte de la polymérisabilité de l'actine-G en présence de membranes.

Par contre, la courbe obtenue à l'aide du milieu réactionnel témoin sans actine ("E") présente une singulière similitude à celle obtenue pour le milieu avec actine ("B"). On constate même que les valeurs obtenues (en % d'actine phosphorylée) y sont même légèrement supérieures alors qu'aucune actine n'était présente. On voit donc qu'une absence complète de phosphorylation peut prendre le visage tout à fait inversé lorsqu'un témoin important est omis.

Sur la figure 25, on peut aussi constater que la courbe correspondant à la phosphorylation de l'actine-G en présence de membranes à faible concentration (Milieu "A") possède vraisemblablement l'allure d'une droite dont la pente est zéro. Ce qui indique de nouveau l'absence très nette de

phosphorylation. A noter aussi le % résiduel de phosphore relié à l'actine-G sans traitement, dans ce cas-ci, il se situe autour de 22%.

Une utilisation judicieuse des témoins appropriés nous permet donc d'affirmer sans trop de risque qu'aucune phosphorylation réelle de l'actine ne s'est produite dans cette expérience. La double perte de l'inhibition de la DNase I et de la polymérisabilité qu'a subie l'actine doit donc dépendre d'un facteur tout à fait différent qui ressemble fort à une dénaturation étant donnée l'irréversibilité du phénomène.

3.2.4.5 Mesure de la radioactivité totale des milieux à chacune des étapes de prise d'échantillon

Les résultats présentés dans cette section correspondent aux comptages directs au moyen du scintillant de Bray qui ont été effectués à chacune des trois étapes de la prise d'échantillon et ce pour chacun des milieux réactionnels. Puisque le comptage du ^{32}P et du ^{3}H correspondent à des paramètres assez différents, nous séparerons en deux sections distinctes les résultats se rapportant à ces deux isotopes.

3.2.4.5.1 Mesure du ^{32}P

Dans cette section, nous verrons ce qui se passe au niveau du ^{32}P qu'on retrouve dans nos milieux réactionnels. La figure 26 nous permet de constater l'effet du temps d'incubation sur la quantité de ^{32}P retrouvée aux étapes 1, 2 et 3 de nos 5 milieux réactionnels radioactifs (Voir tableau VIII pour les compositions exactes de ces milieux).

On peut voir sur la figure 26-A que la quantité de ^{32}P demeure constante à chacune des 3 étapes de prise d'échantillon pour le milieu témoin sans membranes ("C*"). Les valeurs obtenues pour C* aux étapes 1 et 2 ont été considérées comme identiques et une seule droite a été tracée; la nature de ce témoin de même que la centrifugation sans conséquence en absence de membranes permettent cette affirmation malgré le petit nombre d'échantillons. La valeur moyenne établie à 10 900 cpm ne se veut pas absolue mais représente une bonne référence pour les nombres de cpm obtenus pour les autres milieux.

Souvenons-nous que le passage au Dowex I-X8 effectué à l'étape 3 retire les nucléotides libres du milieu réactionnel et ne laisse finalement que la radioactivité de l'ATP lié à l'actine. La valeur stable de 9% obtenue pour le milieu C*-3 comparé aux milieux C*-2 et C*-1 (C*-3 veut dire le milieu C* à l'étape 3, voir tableau VIII) correspond donc assez exactement à la répartition égale de l' $\{^{32}\text{P}\}\gamma\text{-ATP}$ entre le tampon G et l'actine, sachant qu'initialement, 10 molécules d'ATP sont libres pour environ 1 molécule liée à l'actine-G. Il semble donc qu'un échange complet a pu se produire entre l'ATP lié à l'actine et l'ATP libre pendant les quelques minutes à 30°C précédant l'ajout de membranes pour tous les milieux ainsi que pendant les quelques 35 à 40 minutes à 0°C lors de la centrifugation et des manipulations qu'elle a nécessitées. Quoique cet échange nous ait légèrement surpris par sa vitesse, il n'en demeure pas moins que cette rapidité même nous permet déjà d'obtenir une lecture directe de la quantité réelle d'actine possédant de l'ATP lié à un temps donné. On peut donc voir à cet effet que notre témoin d'actine est demeuré très stable dans les conditions décrites.

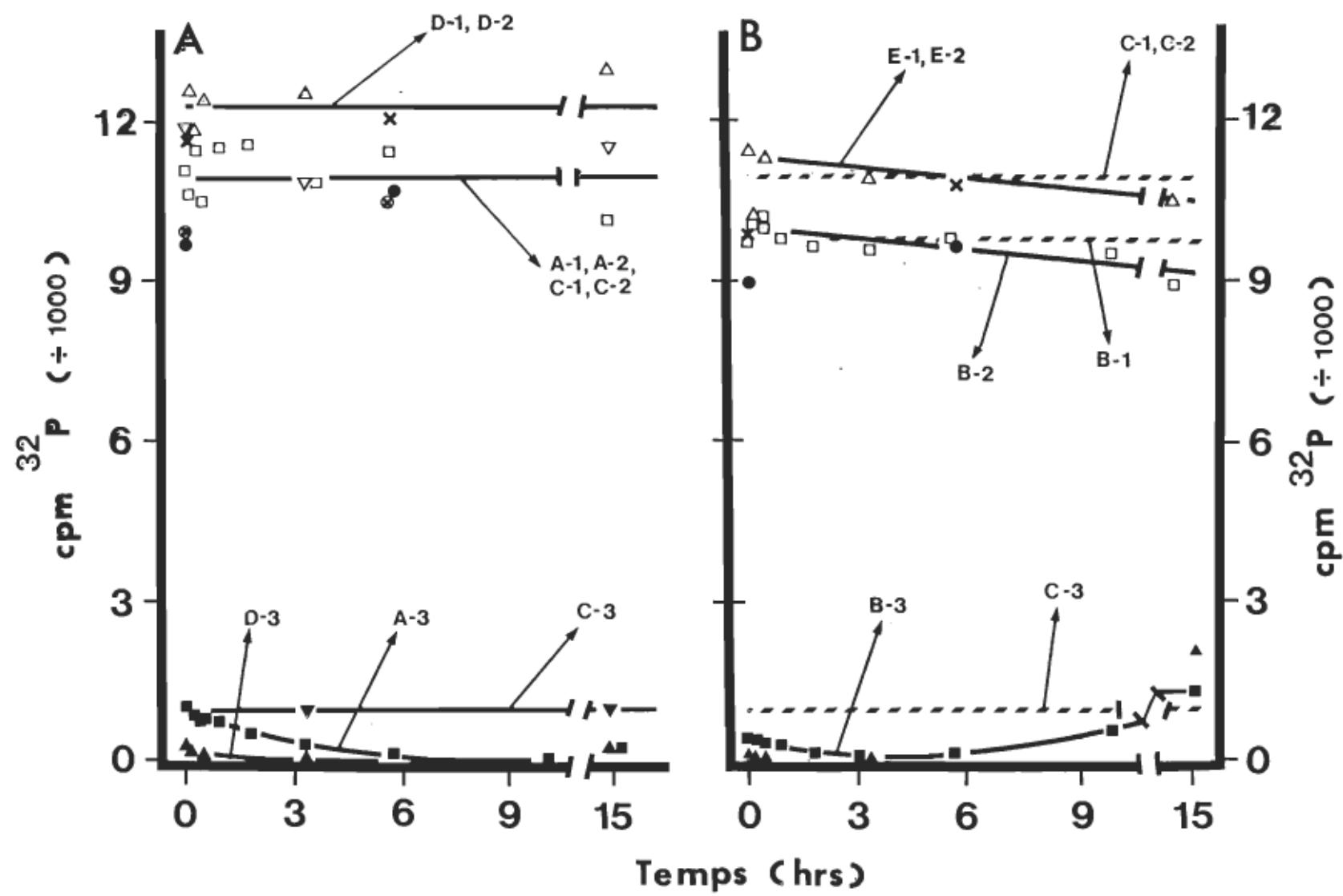
FIGURE 26: Effet de l'incubation des membranes plasmiques de foie de lapin avec l'actine-G sur la radioactivité totale en ^{32}P . On a retiré 50 μl de chacun des milieux réactionnels à chacune des trois étapes de traitement (Voir tableau VII, VIII et X) puis on les a déposés dans une fiole à scintillation avec 15 ml de scintillant de Bray.

Partie A: Membranes à faible concentration, 0,1 mg/ml.

- \otimes — \otimes C-1
(Milieu "C"*, étape I), ∇ — ∇ C-2, \blacktriangledown — \blacktriangledown C-3,
- A-1, \square — \square A-2, \blacksquare — \blacksquare A-3,
- \times — \times D-1, \triangle — \triangle D-2, \blacktriangle — \blacktriangle D-3.

Partie B: Membranes à forte concentration (2,0 mg/ml).

- B-1, \square — \square B-2, \blacksquare — \blacksquare B-3,
- \times --- \times E-1, \triangle — \triangle E-2, \blacktriangle — \blacktriangle E-3.



En ce qui concerne les étapes 1 et 2 du milieu D* ne contenant que des membranes à faible concentration, on obtient sensiblement les mêmes résultats que pour les mêmes étapes avec le milieu C*. La valeur légèrement supérieure obtenue (12 200 cpm) doit être due beaucoup plus à une différence de dilution qu'à un phénomène physique. Il est donc impossible de tirer une conclusion importante de ces résultats, sauf que ce sont ceux auxquels on pouvait s'attendre, c'est-à-dire une valeur identique pour toute la durée de l'expérience.

Le même type de raisonnement s'impose pour les étapes 1 et 2 du milieu A* dont la valeur moyenne et relativement stable se situe à près de 10 900 cpm. Une seule droite a d'ailleurs été tracée pour les milieux C*-1, C*-2, A*-1 et A*-2.

Là où les choses deviennent plus intéressantes, c'est à l'étape 3 des milieux A* et D*. On peut constater que la valeur initiale de A*-3 est identique à celle obtenue pour C*-3. C'est-à-dire que, comme on a vu plus tôt, l'échange de l' $\{\text{³²P}\}\gamma$ -ATP libre avec l'ATP marqué a été complété au début de la réaction. Par la suite, l'actine-G (et possiblement aussi certaines protéines membranaires solubilisées) perd progressivement son phosphore radioactif qui semble devenir inexistant après environ 300 minutes. Nous verrons plus tard que cette période correspond à peu près à celle observée pour la disparition complète de l'ATP liée à l'actine dans ces conditions de faible concentration de membranes.

De plus, le témoin D*-3, ne contenant initialement que des membranes sans actine, présente une valeur initiale de $\text{^{32}P}$ beaucoup plus faible que pour A*-3 et ce $\text{^{32}P}$ disparaît beaucoup plus rapidement, ce qui confirme

que l'effet décrit pour l'échantillon A*-3 est bien en relation avec l'action des membranes sur l'actine.

La figure 26-B présente des résultats similaires à ceux qu'on vient de voir, sauf qu'elle s'adresse aux milieux B* et E* contenant une concentration en membranes 20 fois plus élevée. Les courbes représentant les valeurs moyennes pour C*-1, C*-2 et C*-3 y sont aussi dessinées en lignes pointillées.

On peut voir qu'à l'étape 1, les valeurs obtenues pour les milieux B* et E* sont stables et qu'elles ne présentent aucune surprise. Par contre, la tendance générale à la baisse, et sensiblement parallèle, remarquée en fonction du temps d'incubation pour les milieux B*-2 et E*-2 ne peut s'expliquer que par l'emprisonnement d'une façon ou d'une autre du ^{32}P par les membranes. Ce phénomène lent ne présente toutefois pas d'intérêt réel pour l'analyse de nos résultats. De plus, il ne faut pas oublier la forte concentration de membranes utilisée dans ce cas-ci, beaucoup de phénomènes secondaires pouvant alors se produire.

Finalement, les courbes correspondant aux valeurs obtenues pour les milieux B* et E* à l'étape 3 présentent les mêmes caractéristiques que celles décrites pour les milieux A* et D* dans les mêmes circonstances. C'est-à-dire que le phosphore radioactif contenu dans ces fractions passées au Dowex diminue plus rapidement pour les membranes à plus forte concentration que pour celles à faible concentration; mais cependant pas à un rythme aussi grand que ne le laisserait supposer leur différence de concentration. Nous avons d'ailleurs déjà pu observer ce phénomène aux sections 3.2.4.2 et 3.2.4.3 reliées respectivement à la perte de polymérisabilité ainsi qu'à

la perte de l'inhibition de la DNase I.

On peut donc, suite à ces résultats, considérer que l'ATP libre s'est rapidement échangé avec l'ATP lié de l'actine-G et que l'équilibre semble avoir été atteint dans un temps très court. Il est donc possible, comme nous l'avons indiqué à la section 2.11, de marquer l'actine-G-ATP simplement par une dialyse contre un tampon contenant de l'ATP marqué, ou encore d'ajouter l'ATP marqué et d'incuber le tout pendant un temps donné.

Finalement, on peut aussi constater, et c'est là le point crucial, que le phosphore radioactif de l'ATP, et par le fait même l'ATP lui-même, quitte lentement l'actine-G-ATP suite à l'action des membranes. De plus cette perte de ^{32}P lié à l'actine va même tout à fait à l'encontre de la possibilité que l'actine soit phosphorylée dans ces conditions, on recoupe donc ici les résultats obtenus à la section précédente suite au dosage de l'orthophosphate lié à l'actine par la méthode du vert de Malachite.

Notre hypothèse selon laquelle l'actine, mise en présence de membranes cytoplasmiques d'hépatocytes, perd ses propriétés de polymérisabilité et d'inhibition de la DNase I suite à sa dénaturation causée par l'enlèvement brutal de son nucléotide lié, notre hypothèse, donc, se trouve d'autant plus renforcée par ces derniers résultats.

3.2.4.5.2 Mesure du ^{3}H

Cette section présentera les résultats obtenus pour le comptage du ^{3}H présent à différents moments pour chacun des milieux réactionnels (A^* , B^* , C^* , D^* , E^*) ainsi qu'à chacune des trois étapes de

la prise d'échantillon.

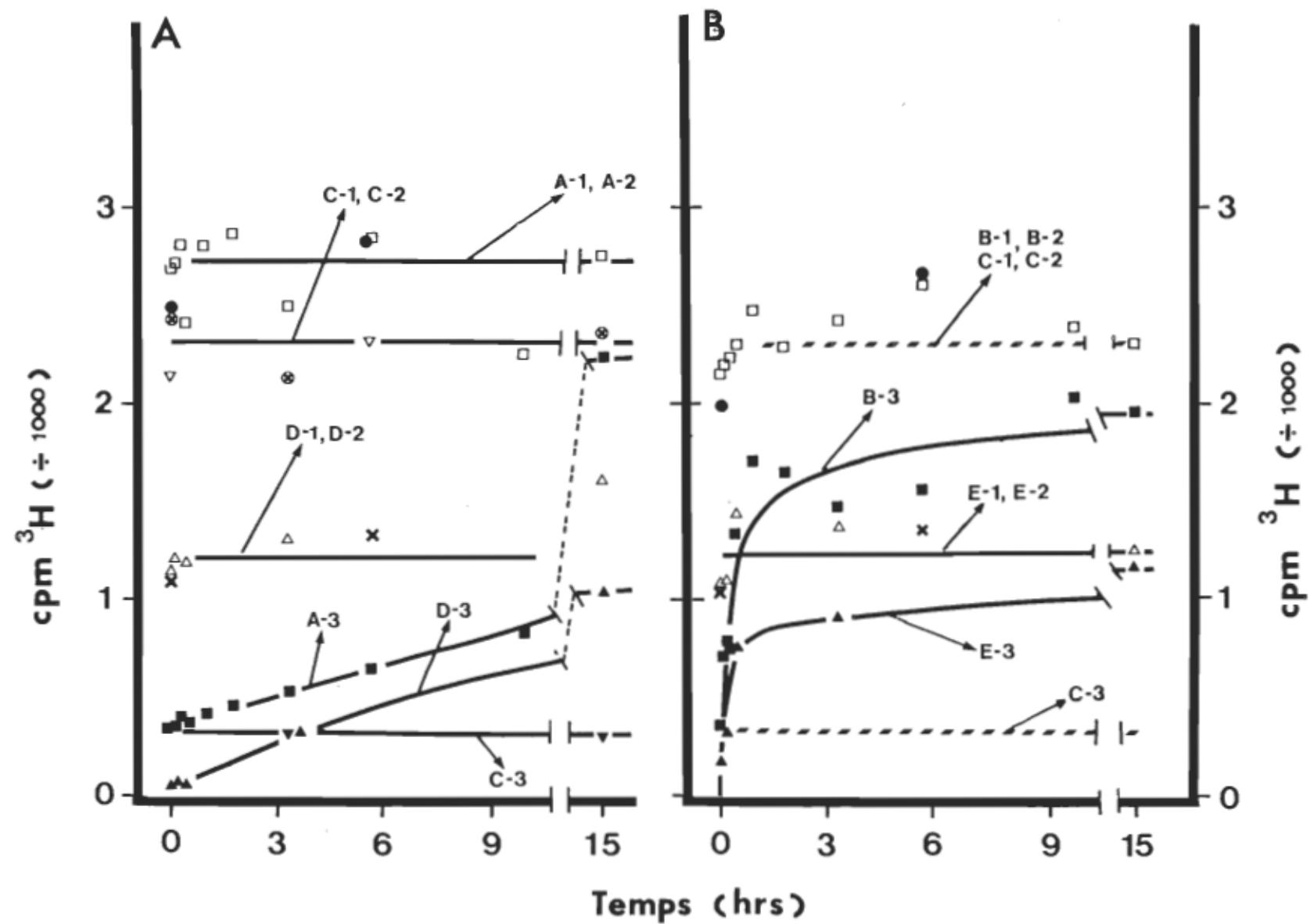
Tout d'abord, précisons qu'une relation directe existe entre les résultats déjà présentés à la section 3.2.4.5.1 pour le ^{32}P et ceux dont il sera question ici. Le comptage de chacun des radioisotopes a en effet été effectué à partir des mêmes fioles à scintillation où ils se retrouvaient ensemble.

La figure 27 nous donne une représentation des valeurs obtenues pour chaque milieu à chacune des étapes. Il est à noter que ces résultats tiennent compte de la valeur excédentaire de 3,72% du phosphore 32 qui parasitait le comptage de tritium.

Tout d'abord, on peut voir sur la figure 27-A que la quantité de tritium demeure stable pour les milieux C*, D* et A* aux deux premières étapes de la prise d'échantillon. La différence du nombre de cpm entre les courbes correspondant aux milieux C* et A* ne suppose qu'une très légère différence lors de la préparation initiale de chaque milieu et n'offre par le fait même aucun intérêt majeur. Ce qui importe à ce niveau, c'est qu'aucune modification du contenu en tritium ne se produit en fonction du temps pour les deux premières étapes, comme on devait s'y attendre. La même conclusion peut être tirée pour la courbe représentant le milieu D* aux deux premières étapes, quoique dans ce cas, on pouvait déjà s'attendre à une valeur plus faible que pour les milieux A* et C*, puisqu'aucune actine marquée au tritium ne lui avait été ajouté.

Pour la courbe représentant le milieu C*-3, c'est-à-dire le témoin d'actine centrifugé et passé au Dowex de façon à éliminer les nucléotides

FIGURE 27: Effet de l'incubation des membranes plasmiques de foie de lapin avec l'actine-G sur la radioactivité totale en ^{3}H . (Voir méthode à la figure # 26 et se référer aux tableaux VII, VIII et X pour la composition des milieux à chaque étape) Partie A:
Milieux avec faible concentration de membranes;
 \otimes — \otimes C-1 (Milieu "C*", étape 1), ∇ — ∇ C-2,
 \blacktriangledown — \blacktriangledown C-3, \bullet — \bullet A-1, \square — \square A-2,
 \blacksquare — \blacksquare A-3, \times — \times D-1, \triangle — \triangle D-2,
 \blacktriangle — \blacktriangle D-3. Partie B: Milieux avec forte concentration de membranes; \bullet — \bullet B-1, \square — \square B-2,
 \blacksquare — \blacksquare B-3, \times — \times E-1, \triangle — \triangle E-2,
 \blacktriangle — \blacktriangle E-3.



libres, on doit avoir une image de l'ATP lié à l'actine et cette courbe ne doit présenter aucun changement avec le temps d'incubation. C'est effectivement ce qu'on a obtenu. Par contre, la valeur du nombre de cpm en comparaison au même milieu pour les deux premières étapes, correspond à environ 15% du total du tritium présent. Il peut paraître paradoxal de constater que cette valeur soit supérieure aux 9%, dus à l'échange dynamique entre l'ATP du milieu et celui de l'actine-G-ATP, observés suite au comptage du ^{32}P . Mais nous verrons à la section 3.2.4.6.1 qu'il n'en est rien car initialement on retrouve environ 5% du total des molécules possédant un noyau tritié d'adényl qui sort sous une forme qui n'est pas absorbée par le Dowex I dans les conditions décrites. On obtient donc environ 10% de la radioactivité en tritium rattachée à l'actine, ce qui correspond donc bien au rapport déjà obtenu avec le ^{32}P .

Ce qui nous frappe cependant le plus sur cette figure, c'est l'augmentation sensible du nombre de cpm autant pour le milieu A*-3 que pour son témoin D*-3 sans actine. Cette augmentation ne peut s'expliquer que par l'apparition temporelle de nouvelles substances dérivées de l'ATP mais non éliminées par le passage au Dowex, telles l'adénine et l'adénosine (Voir section 3.2.4.6).

On peut observer le même phénomène, mais d'une ampleur cependant beaucoup plus grande, pour les courbes représentant les milieux B*-3 et son témoin E*-3 sans actine (Figure 27-B). Rappelons que dans ce dernier cas, la concentration des membranes est 20 fois plus élevée que dans le premier cas. Notons aussi que les courbes obtenues pour les deux premières étapes des milieux B* et E* n'ont finalement présenté aucune surprise.

On peut d'ores et déjà affirmer que l'ATP du milieu réactionnel subit une modification et que cette dernière produit un dérivé qu'on ne peut retirer du milieu réactionnel à l'aide de notre traitement au Dowex-I. Il sera donc très intéressant, dans la section qui suit, de vérifier quelle est la nature de cette modification et ce qui arrive directement au nucléotide lié à l'actine-G-ATP.

3.2.4.6 Effet des membranes sur la nature des nucléotides présents dans les milieux réactionnels

Nous avons déjà pu conclure à une modification du milieu réactionnel par les membranes cytoplasmiques d'hépatocytes de lapin et ce, en présence ou en absence d'actine. La présente section vise à déterminer la composition en ATP et en ses dérivés adénylés pour chaque milieu réactionnel et à chacune des étapes de prise d'échantillons.

Nous traiterons tout d'abord des milieux où la concentration des membranes était de 0,1 mg/ml (section 3.2.4.6.1) puis par la suite des milieux où cette concentration était de 2,0 mg/ml (section 3.2.4.6.2). Il est à noter que tous les échantillons prélevés lors de l'expérience n'ont pu être traités vu les limitations, en fioles à scintillation de même qu'en scintillant, qui nous étaient financièrement imposées. Par contre, les échantillons pour lesquels nous avons opté ont heureusement fourni toutes les informations dont nous avions besoin pour la démonstration de notre hypothèse de dénaturation de l'actine par l'élimination progressive de son ATP lié.

3.2.4.6.1 Nature des nucléotides présents dans les milieux réactionnels à faible concentration de membranes

Nous avons déjà vu à la section 3.2.2 que nos membranes cytoplasmiques d'hépatocytes produisaient la dégradation rapide de l'ATP contenu dans le tampon-G en ses dérivés adénylés moins énergétiques. L'idée à la base de la série de mesures dont nous présenterons ici les résultats est d'établir un parallèle entre la perte, déjà décrite, de certaines propriétés de l'actine-G, lorsque cette dernière est mise en présence de membranes cytoplasmiques, et la disparition rapide de l'ATP du milieu.

Tout d'abord, c'est un fait établi que l'actine-G-ATP ne subit aucune modification importante de ses propriétés lorsqu'incubée à 30°C dans les conditions du tampon G. La figure 28 illustre d'ailleurs la stabilité du milieu réactionnel C* à l'étape 2 quant à la nature des nucléosides présents. La partie "A" de cette figure nous donne le nombre de cpm directement mesuré pour chaque spot découpé à partir des différents chromatogrammes obtenus (Voir méthode à la section 2.7), chacun de ces spots correspondant, comme on l'a vu plus tôt, à l'ATP, l'ADP, l'AMP, l'adénosine et l'adénine.

On peut voir sur cette figure que, malgré une fluctuation importante en valeur absolue, le rapport entre chacune des substances semble demeurer assez semblable en fonction du temps. Cette affirmation devient encore plus justifiée si on exprime ces résultats en terme de % de radioactivité de chacun des spots par rapport au total de la radioactivité détectée pour l'ensemble des spots d'un même chromatogramme (Voir

FIGURE 28: Dégradation des nucléotides d'une solution d'actine-G
(Milieu C-1, voir tableaux VII et VIII) en fonction
du temps à 30°C. Partie "A": Les différents dérivés
de l'ATP sont exprimés en terme de cpm.

○—○ ATP, □—□ ADP, Δ—Δ ATP + ADP,
●—● AMP, ■—■ Adénosine + Adénine.

Partie "B": Les différents dérivés de l'ATP sont
exprimés en terme de % du nombre total de cpm re-
trouvé. Les symboles sont les mêmes que pour la
partie "A".

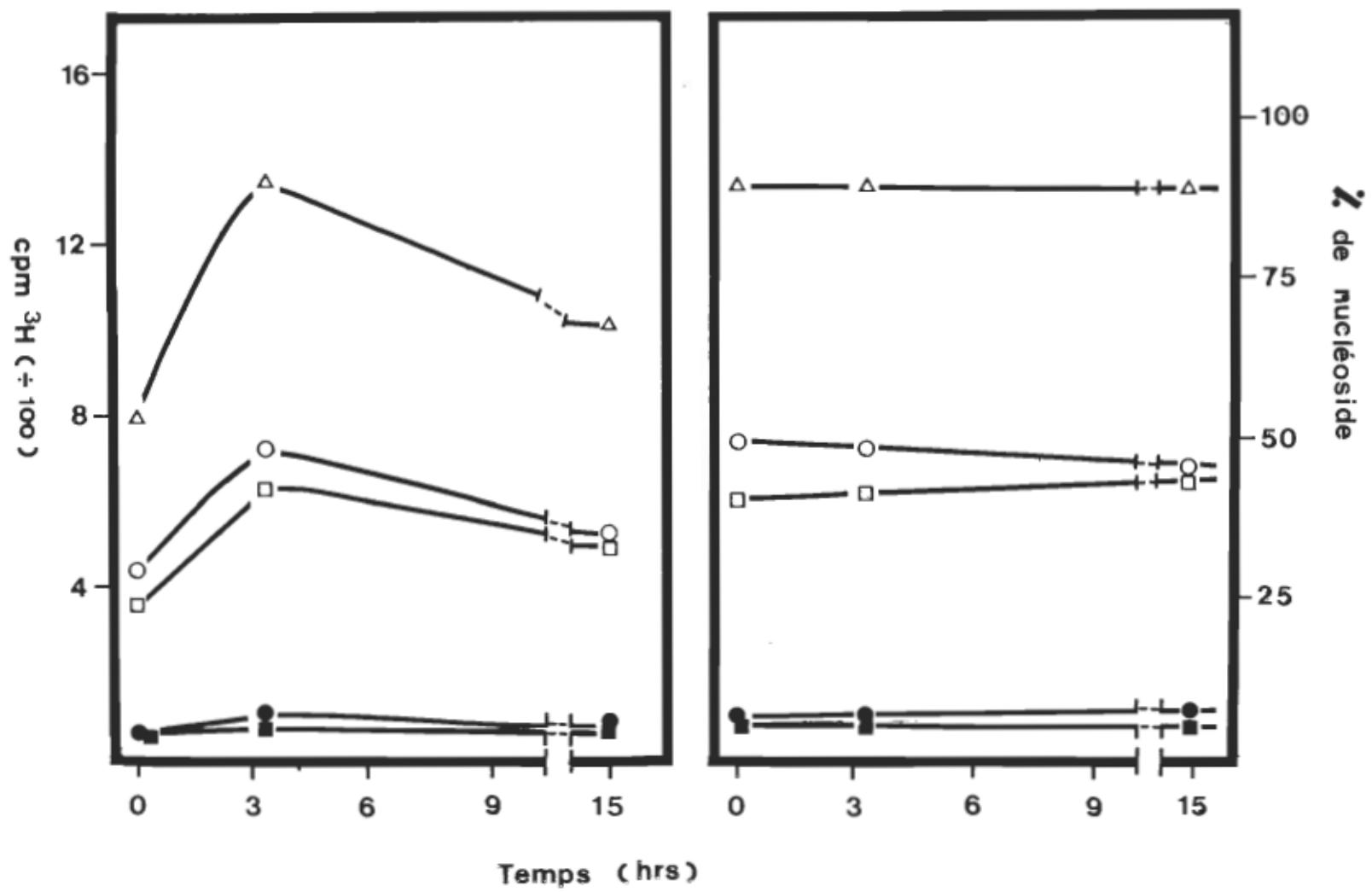


figure 28-B). On peut alors facilement constater la stabilité relative de chaque nucléotide sur une période s'étendant jusqu'à une quinzaine d'heures. On voit aussi que l'ATP subit une légère hydrolyse au profit de l'ADP, ce qui est tout à fait normal dans ces conditions.

Il est à noter que l'utilisation de l'échelle de % de nucléotide, éliminant les fluctuations dues à la méthode de déposition des échantillons, ne peut être utilisée avec confiance que lorsque la radioactivité totale de la somme des spots comptés ne subit pas de variation réelle en fonction du temps d'incubation (Voir la figure 27), comme c'est le cas pour tous les milieux aux 2 premières étapes et pour le milieu C* de l'étape 3. Dans les autres cas, nous devrons utiliser l'échelle réelle du nombre de cpm comptés en fonction du temps d'incubation.

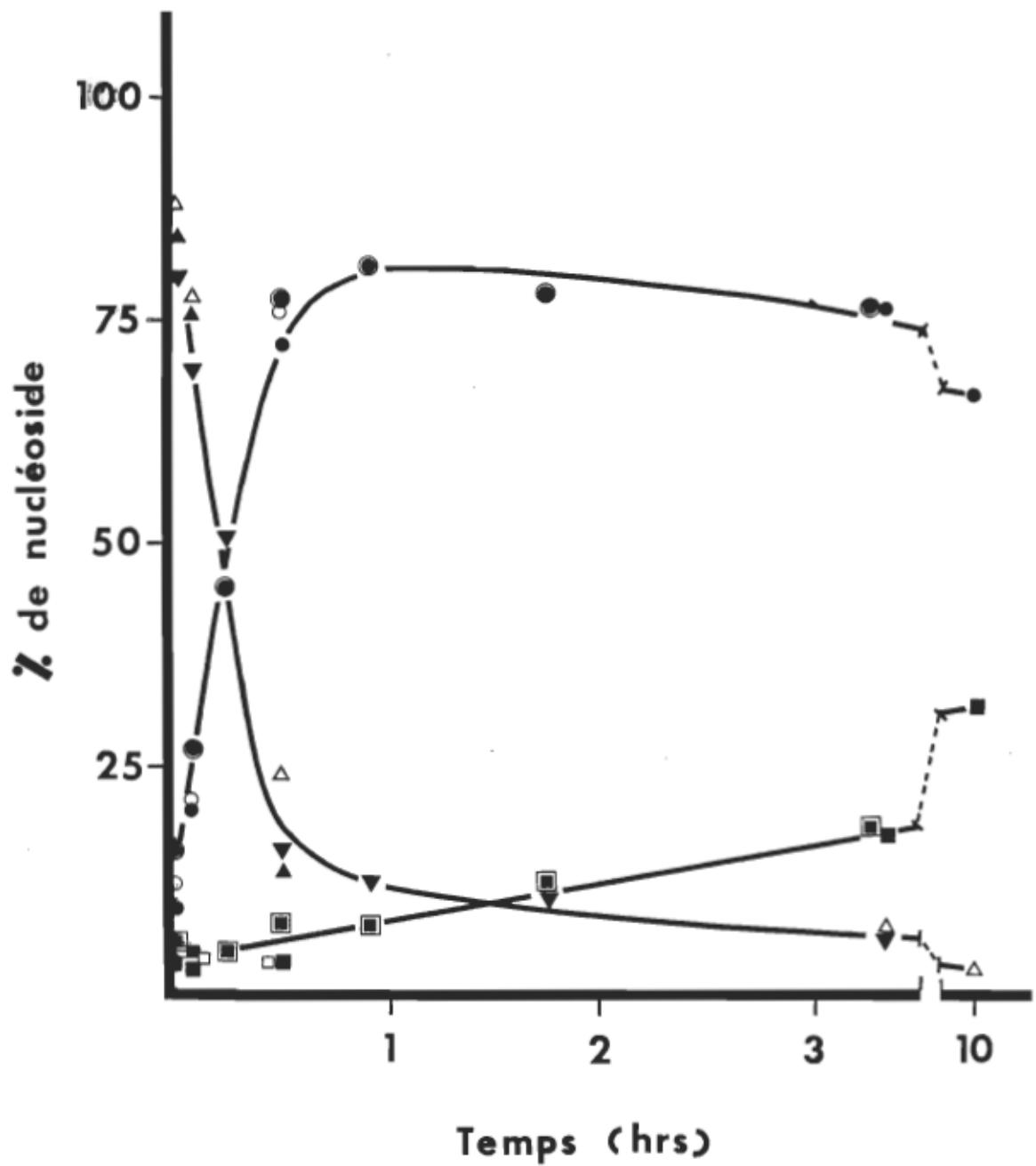
Si nous retournons à la figure 28, on peut observer que l'adénosine et l'adénine ont été regroupées en une seule courbe, de même qu'une courbe représentant l'addition de l'ATP et de l'ADP s'est ajoutée aux courbes individuelles de ces deux substances. La raison de ce regroupement, en ce qui concerne l'adénosine et l'adénine, réside dans le fait que, pour la plupart des chromatogrammes, les spots représentant ces substances ne présentaient pas une résolution suffisante pour permettre leur séparation précise. De plus, ni l'une ni l'autre de ces deux substances n'est sensée avoir d'effet de stabilisation sur l'actine-G.

Dans le cas de l'ATP et de l'ADP, leurs spots respectifs, quoique distincts, étaient parfois très rapprochés. On aurait donc pu les regrouper pour les mêmes raisons que celles invoquées plus tôt pour l'adénine et l'adénosine. Mais la véritable raison de ce regroupement est en rela-

tion avec un séjour de 10 jours au congélateur à -20°C, en présence de TCA à une concentration de 5%, que les échantillons ont subi avant d'être chromatographiés. Ce séjour qui nous apparaissait sans conséquence au moment où il a été fait a amené un bon pourcentage d'hydrolyse de l'ATP en ADP. Mais cette hydrolyse demeure toutefois sans conséquence puisque l'ADP, tout comme l'ATP stabilisent l'actine-G et qu'il nous est possible de les regrouper lorsqu'on fait référence à de l'actine-G non dénaturée et possédant un nucléotide lié. De plus, on peut se rappeler que plus de 95% du tritium se trouvait initialement sur l'ATP. Il serait donc possible, d'après ces résultats de calculer exactement les quantités respectives d'ATP et d'ADP tout au long de l'expérience, mais puisque leur regroupement nous apporte essentiellement les mêmes informations, nous n'avons pas jugé utile de pousser aussi loin cette analyse.

La stabilité du pourcentage relatif des nucléotides ayant été démontrée pour une solution d'actine à 1 mg/ml pendant près de 15 heures, nous traiterons donc maintenant des phénomènes qui se produisent dans les milieux réactionnels contenant des membranes à faible concentration. A cet égard, la figure 29 nous permet de visualiser la corrélation presque parfaite existant entre les % de nucléotides du milieu réactionnel A* aux deux premières étapes de la prise d'échantillon, c'est-à-dire avant et après la centrifugation servant à précipiter les membranes. On peut voir que globalement, la presque totalité de l'ATP et de l'ADP est détruite au profit de l'AMP après seulement une demi-heure et que les valeurs obtenues par la suite dans les deux cas ne baissent que très lentement au profit de l'adénosine et de l'adénine.

FIGURE 29: Effet des membranes plasmiques de foie de lapin sur la composition en nucléotides des milieux A*-1, A*-2 et D*-1 (La composition de chacun des milieux aux différentes étapes pourra être retrouvée aux tableaux VII, VIII et X). Milieu A*-1: Δ — Δ ATP et ADP, \bullet — \bullet AMP et \blacksquare — \blacksquare Adénosine et Adénine. Milieu A*-2: \blacktriangledown — \blacktriangledown ATP et ADP, $\textcircled{\bullet}$ — $\textcircled{\bullet}$ AMP et \blacksquare — \blacksquare Adénosine et adénine. Milieu D*-1: \blacktriangle — \blacktriangle ATP et ADP, \circ — \circ AMP et \square — \square Adénosine et adénine.



La même corrélation existe entre les résultats des milieux A*-1 et A*-2 et ceux obtenus pour leurs témoins respectifs sans actine D*-1 et D*-2 (D*-2 non montré sur la figure 29). On a donc aucune surprise jusqu'ici puisque ces résultats correspondent tout-à-fait à ceux que nous permettaient d'anticiper la figure 16 (Effet des membranes sur le tampon-G).

Le point d'intérêt majeur de la présente section demeure sûrement la figure 30 où l'on peut voir les résultats obtenus pour le milieu A*-2. Cette figure représente donc, exprimés en nombre de cpm, les nucléotides théoriquement liés à l'actine (pour l'ATP et l'ADP) de même que l'adénosine et l'adénine que le Dowex I n'a pu retirer de la solution déjà débarrassée de ses membranes. Quant à l'AMP, le faible taux observé ne nous permet pas vraiment de proposer une explication à ce stade-ci.

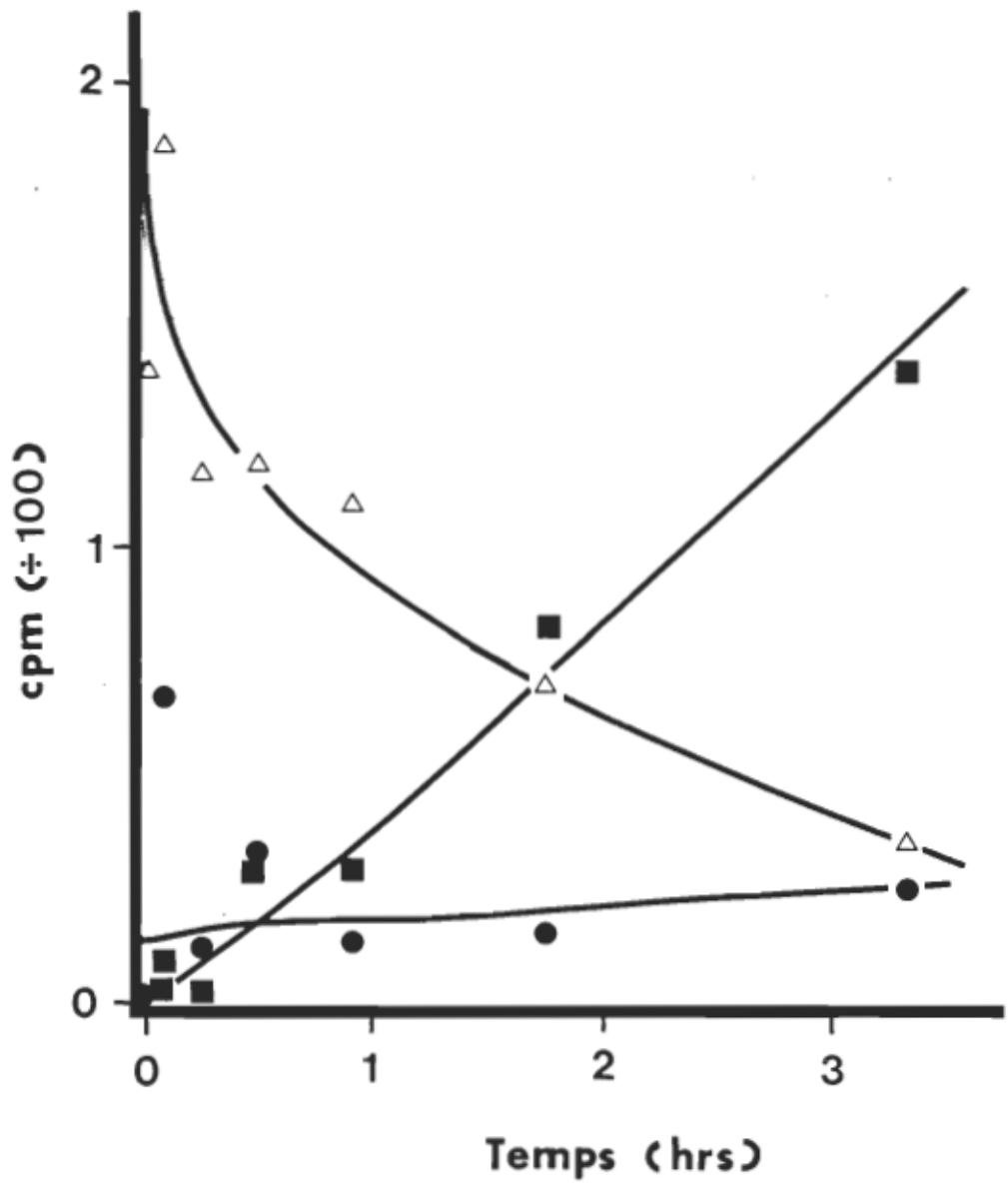
Toutefois, on peut considérer que la figure 30 démontre clairement que les membranes cytoplasmiques d'hépatocytes causent la séparation des nucléotides normalement liés à l'actine. Cette séparation pourrait être simplement due au déplacement de l'équilibre:



amené par la destruction rapide de tous les nucléotides libres du milieu.

On peut déjà, pour appuyer cette possibilité, souligner qu'après environ 200 minutes d'incubation de l'actine-G-ATP en présence de 0,1 mg/ml de suspension de membranes, seulement 20% environ de l'actine possède toujours son nucléotide, que cette solution ne polymérisé plus qu'à environ

FIGURE 30: Effet des membranes à faible concentration sur la quantité de nucléotides liés à l'actine (Milieu A*-III, se référer aux tableaux VII, VIII et X pour la composition de ce milieu): Δ — Δ ATP et ADP,
 \bullet — \bullet AMP et \blacksquare — \blacksquare Adénosine et Adénine.



20%, de même que la capacité d'inhiber la DNase I n'est plus qu'aux alentours de 30% ... Voyons maintenant ce qui se produit lorsque l'actine-G est incubée en présence de membranes à une concentration de 20 fois supérieure à celle qu'on vient d'étudier.

3.2.4.6.2 Nature des nucléotides présents dans les milieux réactionnels à forte concentration de membranes

L'analyse des nucléotides présents à différents moments et aux différentes étapes de traitement pour les milieux contenant des membranes à faible concentration nous a précédemment permis de bien visualiser la perte du nucléotide lié à l'actine. On peut logiquement s'attendre à la répétition plus rapide des mêmes phénomènes si la concentration des membranes est augmentée de 20 fois. Les figures 31 et 32 représentent la modification de la composition en nucléotides respectivement des milieux réactionnels E* (Membranes témoin sans actine) et B* (Membranes et actine) pour les trois étapes de la prise d'échantillon.

A première vue, on a peine à assimiler les courbes obtenues ici à celles déjà décrites pour les milieux contenant des membranes à faible concentration. Par contre si on jette un regard attentif à l'ensemble de la situation illustrée par les figures 29 et 30, on peut observer, après environ 30 minutes d'incubation, une situation assez semblable à celle que l'on retrouve aux temps initiaux des figures 31 et 32. C'est-à-dire une valeur élevée qui tend à s'abaisser par la suite dans le cas de l'AMP, pour l'ATP et l'ADP, une valeur à la baisse et déjà passablement amoindrie pour le milieu B* contenant de l'actine (et déjà nulle pour le témoin sans actine E*), de même qu'une tendance progressive à la hausse pour l'adéno-

FIGURE 31: Effet des membranes à forte concentration sur la composition en nucléotides du milieu témoin E* (sans actine) aux étapes 1, 2 et 3 de la prise d'échantillon (Voir tableaux VII, VIII et X pour la composition du milieu et pour les détails de la méthode utilisée). Partie A: ATP et ADP, Partie B: AMP, Partie C: Adénosine et Adénine. Les étapes 1, 2 et 3 sont représentées respectivement par les symboles suivants:
○ , Δ et ● .

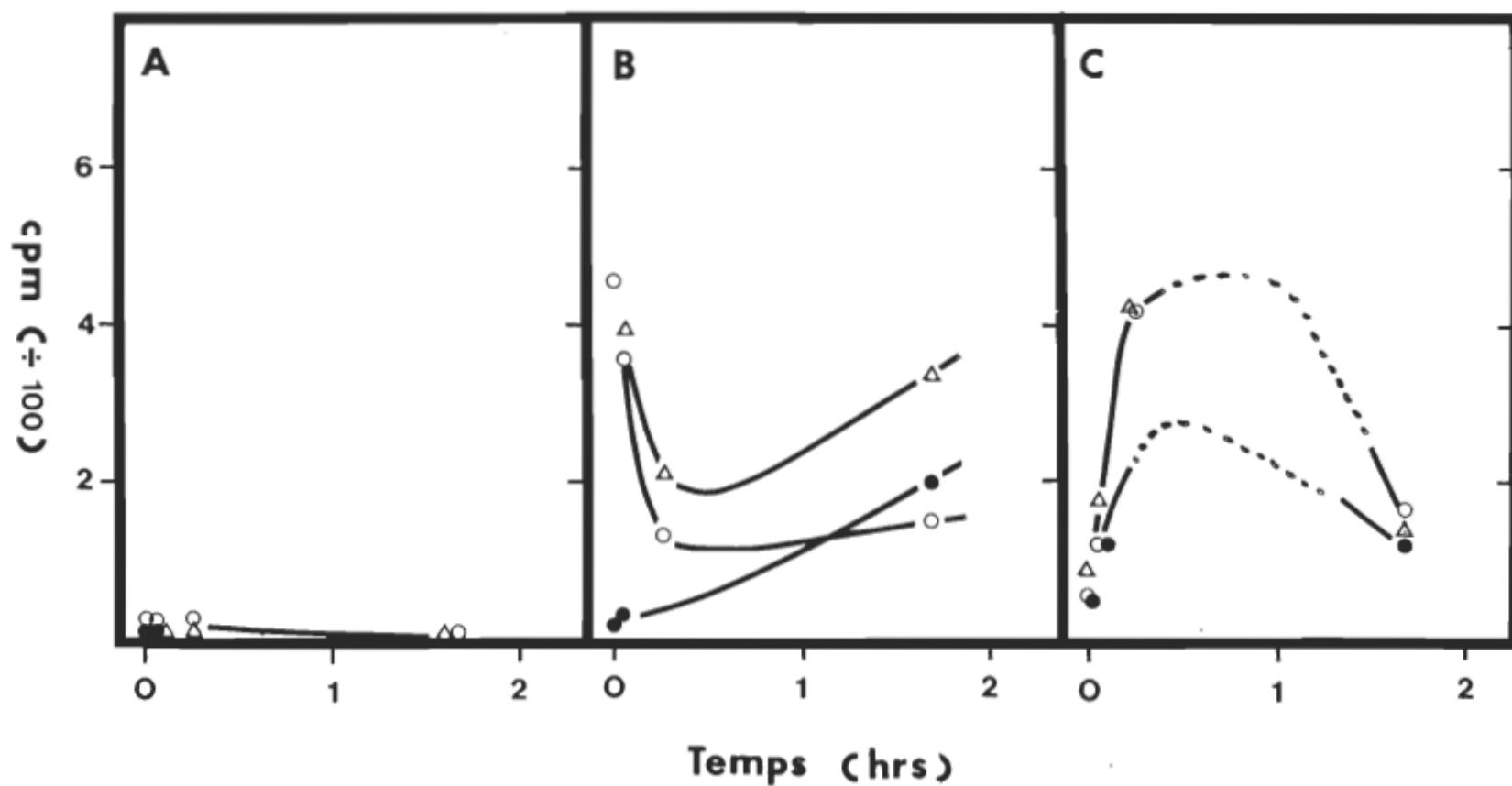
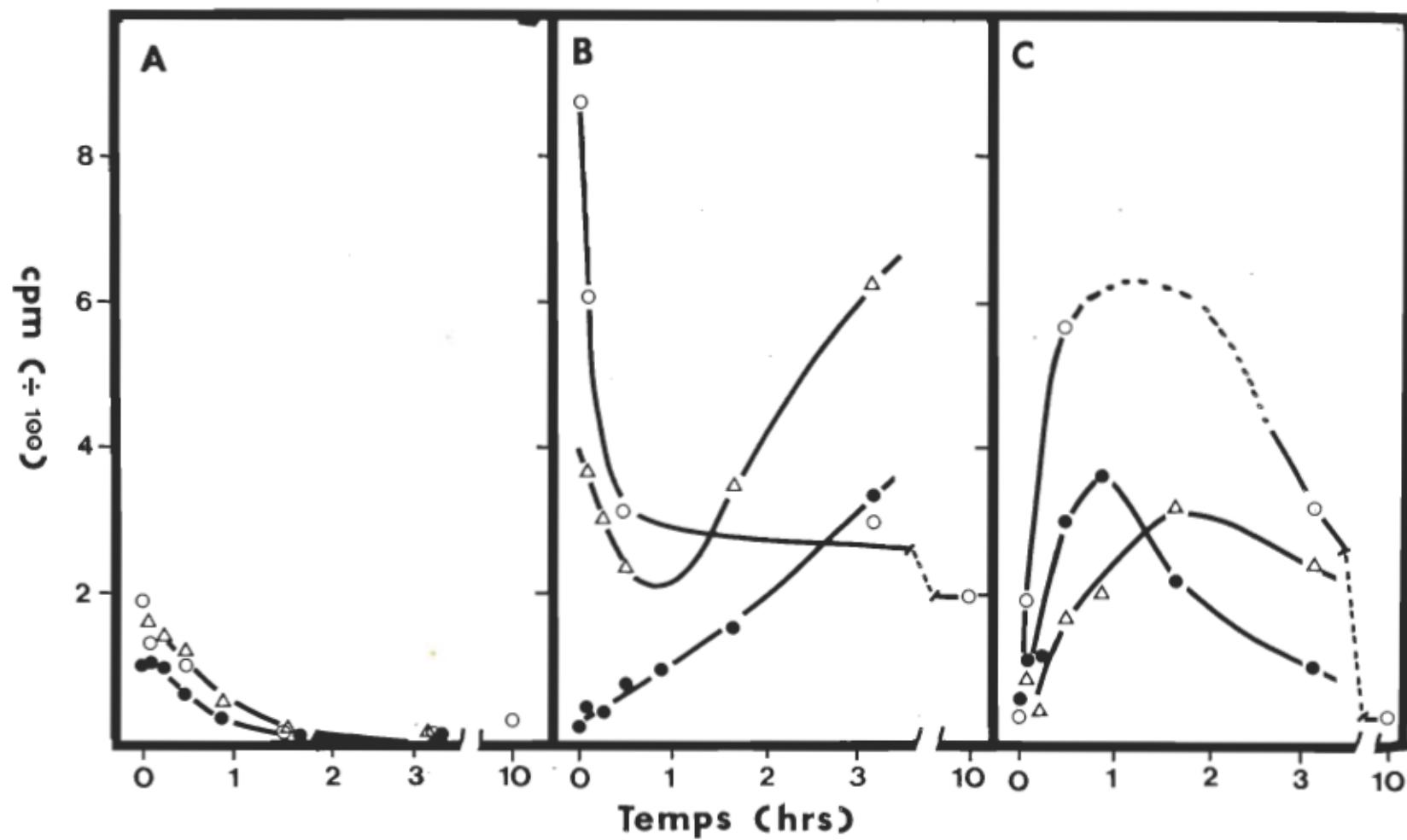


FIGURE 32: Effet des membranes à forte concentration sur la composition en nucléotides du milieu B* aux étapes 1, 2 et 3 de la prise d'échantillon (Voir tableaux VIII, IX et X pour la composition des milieux et pour les détails de la prise d'échantillon). Partie A; ATP et ADP, partie B; AMP et partie C; adénosine et adénine. Les étapes 1, 2 et 3 sont représentées respectivement par les symboles \circ , Δ et \bullet .



sine et l'adénine.

La déduction qui s'impose ici est que les quelques secondes où les membranes ont été en contact avec l'actine, tout juste entre la préparation du milieu réactionnel et le traitement de l'échantillon fait tout de suite après, ont suffi pour que la réaction très rapide de destruction de l'ATP et de l'ADP soit déjà complétée pour les nucléotides libres du milieu réactionnel. Cette affirmation est tout-à-fait confirmée par l'absence totale d'ATP et d'ADP obtenue pour le milieu sans actine E* à chacune des 3 étapes de la prise d'échantillons (voir figure 31-A).

Il est par la même occasion très important de noter que, même en présence de cette concentration élevée de membranes, une bonne partie de l'actine qui possédait initialement de l'ATP peut conserver cet ATP pendant une période maximale d'environ 100 minutes (voir figure 32-A). Il est très difficile de s'empêcher d'établir ici un parallèle entre d'une part, la perte de polymérisabilité de l'actine (Figure 22), de même que sa perte d'inhibition de la DNase I (Figure 24), et d'autre part cette perte de son nucléotide lié qui se produisent à peu près simultanément.

Là où l'interprétation de ces résultats devient plus délicate, c'est au sujet de ce qui se produit pour l'AMP et l'adénosine. On devrait normalement s'attendre, en considérant les résultats que nous avons déjà présentés (pour les étapes 1 et 2) à une baisse progressive puis à l'élimination totale de l'AMP du milieu simultanément à une augmentation correspondante au profit de l'adénosine et de l'adénine.

On observe bien ce phénomène pendant les cinquante premières minutes

d'incubation, mais on assiste au phénomène inverse par la suite (Figures 31, B et C et 32, B et C); soit la réapparition de radioactivité dans le spot correspondant à l'AMP et à la disparition progressive du spot de l'adénosine et de l'adénine. La restauration de l'AMP nous apparaissant plutôt fort improbable, il devient alors facile d'imaginer qu'un sous-produit de dégradation, qui possède les mêmes caractéristiques de migration que l'AMP dans nos conditions de chromatographie, a pu être formé ultérieurement et que la valeur du nombre de cpm obtenu pour l'AMP ne lui correspond en fait plus du tout.

De toutes façons, ce problème, quoiqu'intéressant, et relativement important en soi, ne présente aucun intérêt pour le sujet dont nous discutons ici.

Finalement, l'élimination indéniable des nucléotides libres dans le milieu réactionnel et la perte subséquente de son nucléotide par l'actine nous apportent suffisamment d'information pour être déjà en mesure d'affirmer que cet effet est le grand responsable de la dénaturation de l'actine quant à sa polymérisabilité et sa capacité d'inhiber la DNase I pancréatique.

3.2.4.7 Effet des membranes sur l'actine-G suivi par électrophorèse sur gel de polyacrylamide

A différents temps d'incubation des membranes cytoplasmiques d'hépatocytes de lapin en présence d'actine-G nous avons prélevé des échantillons à partir des milieux réactionnels débarrassés de leurs membranes et passés au Dowex I-X8 (Etape 3) dans le but d'effectuer

une électrophorèse sur plaque de gel de polyacrylamide à 10%.

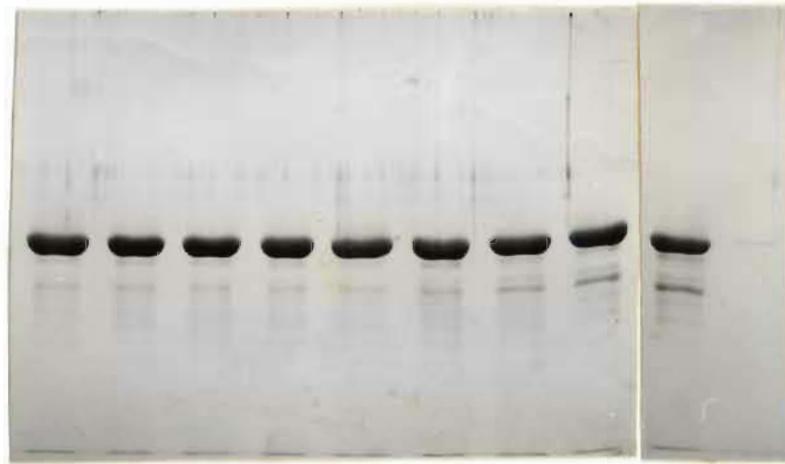
Cette électrophorèse avait au départ été planifiée en vue d'obtenir une mesure directe de la phosphorylation de l'actine en découplant et en comptant la radioactivité en ^{32}P des bandes d'actine obtenues. Ces résultats se sont avérés entièrement négatifs, dans le sens qu'aucune trace de radioactivité n'a pu être retrouvée à partir du comptage des bandes d'actine (résultats non montrés). Il faut toutefois préciser que les conditions assez faibles d'activité spécifique et du nombre total de cpm de ^{32}P utilisées ne nous permettaient pas de déceler une valeur moindre que 10% de phosphorylation. Mentionnons ici que nous avions délibérément choisi de ne pas ajouter plus de $\{\text{P}^{32}\}\gamma\text{-ATP}$ pour ne pas perturber les résultats importants que nous anticipions d'obtenir avec le tritium présent dans le même milieu réactionnel.

Tout ce que l'on peut donc en fait affirmer ici, c'est que s'il y a une phosphorylation de l'actine, elle est d'un ordre inférieur à 10%. Ce qui, de nouveau, correspond aux résultats obtenus à la section 3.2.4.4 par le dosage au vert de Malachite. Ce dosage indiquait, si on s'en souvient bien l'absence complète de phosphorylation de l'actine par nos préparations de membranes.

L'analyse des migrations obtenues pour les différents temps et milieux réactionnels nous a par contre permis d'établir clairement la présence d'une protéolyse assez importante de la G-actine dans les milieux contenant des membranes. On peut voir sur la figure 33, A et B, l'apparition de bandes de faible poids moléculaire à mesure que le temps d'incubation se prolonge. Le fait est d'autant plus remarquable pour la partie "B"

FIGURE 33: Effet des membranes plasmiques de foie de lapin sur l'actine-G suivi par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Les milieux réactionnels A*, B*, C*, D* et E* (Voir tableaux VII, VIII et X) sont respectivement initialés A, B, C, D et E. Les temps indiqués au bas de chaque migration sont exprimés en minutes.

A. Actine et membranes $0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$

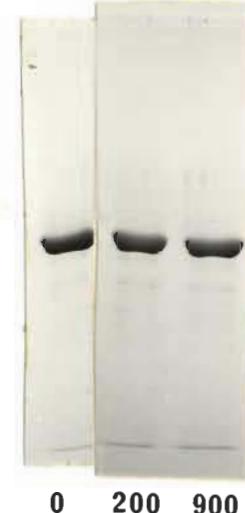


temps 0 5 15 30 55 105 200 340 600 900

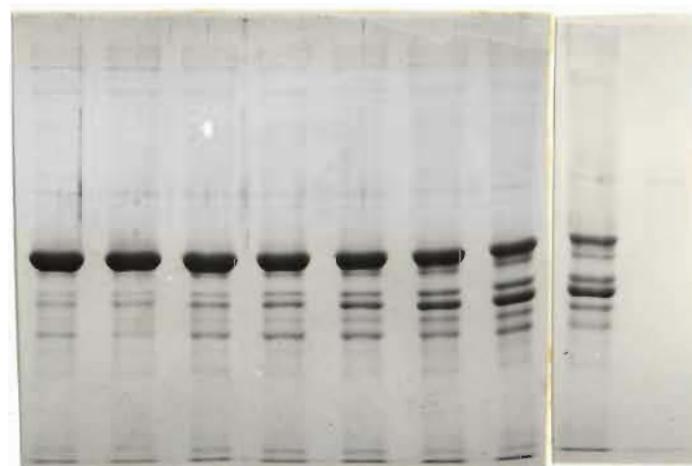
D. Membranes $0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$



C. Actine seule

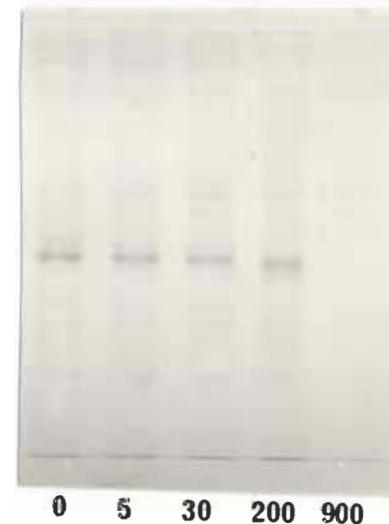


B. Actine et membranes 2 mg.ml^{-1}



temps 0 5 15 30 55 105 200 340 600

E. Membranes seules, 2 mg.ml^{-1}



de cette figure, c'est-à-dire là où les membranes sont à une concentration élevée. En plus de l'apparition de ces nouvelles bandes que l'on ne retrouve d'ailleurs pas sur les témoins de membranes incubées sans actine (Figure 33, D et E), on peut voir la disparition progressive de la bande principale d'actine-G.

On peut donc facilement supposer que ces nouvelles bandes représentent l'apparition de fragments obtenus lors de la protéolyse de l'actine. Il est à noter que l'actine-G ne présente en aucune façon une telle dégradation lorsqu'incubée dans les mêmes conditions en absence de membranes (Figure 33, C).

Même s'il est évident que cette protéolyse contribue activement à détruire l'actine, on peut tout de même facilement constater qu'elle ne peut en aucun cas être entièrement responsable de la perte de polymérisabilité ainsi que celle de l'inhibition sur la DNase I que l'actine subit dans ces conditions d'incubation. En effet, après une incubation de 300 minutes, alors que les deux propriétés déjà mentionnées de l'actine sont irrémédiablement perdues, (Voir figure 22 et 24), on peut voir que la bande représentant l'actine au même moment sur la figure 33-A possède encore la presque totalité de son intégrité. La même observation peut s'appliquer pour les membranes à forte concentration, quoique dans ce cas, la protéolyse soit définitivement beaucoup plus rapide.

Pour terminer, on peut ajouter que, suite à cette étude électrophorétique, nous avons observé la présence de protéines membranaires qui n'ont pas été enlevées lors de la centrifugation précédant l'étape 2 de la prise d'échantillons (Figure 33, E). Ce fait revêt une importance particu-

lière puisqu'il vient directement appuyer l'hypothèse émise à la section 3.2.4.4, à savoir que l'augmentation d'orthophosphate observée par la méthode du vert de Malachite pourrait fort bien provenir d'éléments protéiques membranaires impossibles à éliminer par centrifugation.

On constate donc une fois de plus que tout se tient. Toutes les facettes étudiées lors de cette expérience unique tendent à démontrer irrémédiablement qu'une incubation de l'actine en présence d'une préparation assez standard de membranes cytoplasmiques d'hépatocytes de lapin agit directement sur les nucléotides libres du milieu et par rebondissement sur celui de l'actine. Il est impossible toutefois d'affirmer que les membranes n'ont absolument aucun effet direct sur l'actine. Mais dans le cas présent, cet effet se trouverait complètement submergé par l'effet principal enregistré, soit la disparition des nucléotides.

3.2.5 Vérification par électrophorèse de l'absence de phosphorylation de l'actine-G ou -F en présence de membranes cytoplasmiques d'hépatocytes de rats

Jusqu'ici, nous avons toutes les indications nécessaires pour être en mesure d'affirmer que l'actine-G ne subit aucune phosphorylation lors de son incubation avec nos suspensions de membranes cytoplasmiques d'hépatocytes de lapin. Il devient donc tout à fait logique de confirmer de façon non-équivoque que cette phosphorylation n'existe pas non plus pour l'actine-G dans le cas d'hépatocytes de rats, et par la même occasion de vérifier si elle se produit dans le cas de l'actine-F.

Les résultats décrits dans la présente section se rapportent tous à l'analyse des électrophorégrammes obtenus suite à la prise d'échantillons.

à des temps différents, de solutions d'actine-G et -F mises en présence de membranes à 0,1 mg/ml et à 2,0 mg/ml. Un témoin de membranes à 2,0 mg/ml, sans actine, a aussi été traité de la même façon. Précisons ici que l'activité spécifique du $\{^{32}\text{P}\}\gamma\text{-ATP}$ a été fixée à 0,022 Ci/mmol pour tous les milieux réactionnels de telle sorte que 1% de phosphorylation nous donnera environ 55 cpm (au-dessus du bruit de fond) lors du comptage de la bande d'électrophorèse lui correspondant. Ceci augmente d'une cinquantaine de fois environ la sensibilité que nous avions obtenue lors des résultats exposés à la section 3.2.4.7. La méthode que nous avons utilisée pour vérifier la phosphorylation de l'actine à partir des gels d'électrophorèse a déjà été décrite aux sections 2.6 et 2.9.

Le tableau XI nous montre les résultats, sans aucun traitement, qu'on a obtenus en terme de cpm de ^{32}P pour chaque bande d'actine découpée et comptée séparément pour chacun des milieux réactionnels. On peut y voir aussi la valeur totale, en nombre de cpm, acquise pour tout le ^{32}P déposé qui se retrouve sous la forme de $\{^{32}\text{P}\}\gamma\text{-ATP}$ libre. Ces deux dernières substances migrent légèrement plus rapidement que le bleu de bromophénol utilisé comme indicateur, de sorte qu'il est facile de les séparer du gel et de les compter avant d'entamer le processus de coloration, ce qui se fait sans abîmer la section du gel où se trouvent les protéines ou même les fragments de protéines qu'on veut étudier.

Au premier coup d'oeil, on peut donc constater que nos membranes n'ont aucunement phosphorylé l'actine-G du milieu réactionnel, ni d'ailleurs l'actine-F dans des conditions similaires. Ces résultats sont très concluants et s'il demeure possible que les membranes cytoplasmiques

Tableau XI
Radioactivité des bandes d'actine après électrophorèse

{Membranes} (mg/ml)	Temps d'incubation (min)	Actine-G (# de cpm)		Actine-F (# cpm)	
		Bandé d'actine	Total pour ^{32}P	Bandé d'actine	Total pour ^{32}P (# cpm)
2,0 mg/ml	0	30 (26)	73278 (75580)	22	67274
	5	14	78254	18	73172
	15	18	70036	22	58634
	30	26	61362	12	77760
	60	14 (18)	66188 (65606)	20	59760
	120	12	72110	20	68998
	180	18	82962	16	73928
0,1 mg/ml	0	26 (18)	67420 (64618)	26	69898
	5	26	63556	10	73614
	15	16	75362	12	64696
	30	12	96992	16	71952
	60	14 (20)	75916 (66674)	32	66912
	120	14	78924	22	66434
	180	14	75614	18	61748

N.B.: Le bruit de fond mesuré pour le scintillant est de 18 ± 6 cpm. Les valeurs entre parenthèses représentent le nombre de cpm correspondant aux échantillons témoins qui avaient été centrifugés avant d'effectuer l'électrophorèse.

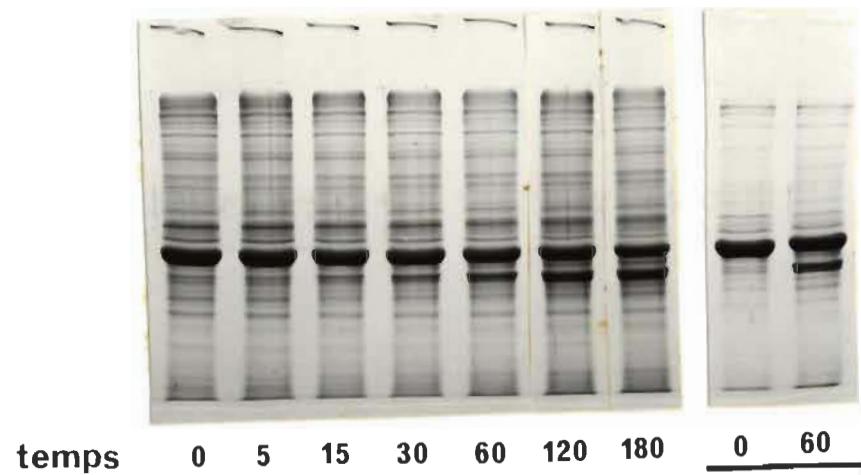
d'hépatocytes (de lapins ou de rats) agissent d'une façon quelconque sur l'actine in vivo, il semble fort peu probable que ce soit par le biais d'une phosphorylation massive de l'actine.

Même si on sait qu'aucune phosphorylation de l'actine ne survient si on en croit les résultats obtenus pour le comptage direct du ^{32}P dans nos bandes d'électrophorèse, l'allure même des migrations peut toutefois s'avérer elle aussi très révélatrice. On peut voir sur la figure 34 les photographies des plaques d'électrophorèse prises sans tarder suite à leur processus de coloration. On observe tout d'abord sur la partie I de cette figure que les phénomènes décrits à la section précédente, pour des membranes d'hépatocytes de lapin, se reproduisent à peu près exactement de la même façon pour des membranes de rats incubées en présence d'actine-G. On peut voir, en effet, que pendant les 180 minutes où s'est effectuée l'incubation de l'actine avec les membranes, le spot correspondant à l'actine-G tend à perdre de son intensité en fonction du temps au profit d'un doublet de bandes rapprochées d'un poids moléculaire inférieur à celui de l'actine. Puisqu'on ne peut voir aucun autre fragment défini apparaître ailleurs, ceci laisse supposer la protéolyse, ou du moins le bris de l'actine en deux parties distinctes et relativement égales. Ceci confirme clairement les résultats déjà présentés à la section 3.2.4.7.

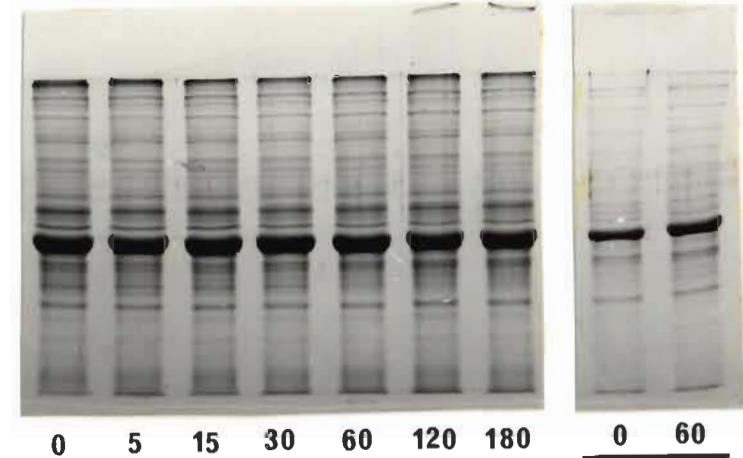
Les deux bandes de la figure 34-I, qui représentent l'incubation pendant 0 et 60 minutes de l'actine avec les membranes suivie d'une centrifugation à 20 000 x g pour éliminer ces dernières, peuvent être comparées aux deux bandes à 0 et 60 minutes où les membranes n'ont pas été précipitées. On peut ainsi constater la même protéolyse, et cela dans une

FIGURE 34: Effet des membranes plasmiques de foie de rat sur l'actine-G et -F suivi par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. A un temps donné, on prélève 75 μ l de chacun des milieux auquel on ajoute 25 μ l de tampon d'électrophorèse 4X. Les échantillons ont été bouillis 2 minutes, puis on leur a ajouté 7,0 μ l de la solution de coloration. Des dépôts de 30 μ l ont été faits pour chaque échantillon à partir de ces dernières solutions. Chacun des différents milieux réactionnels est identifié sur la figure. Les temps indiqués au bas de chaque migration sont exprimés en minutes. Milieux réactionnels: Membranes à 2,0 mg/ml ou à 0,1 mg/ml selon le cas. L'Actine-G est à 1,0 mg/ml dans du tampon-G, alors que le milieu contenant de l'actine-F était dans les conditions optimales pour cette forme, soit: Tris-HCl 10mM, MgCl₂ 2,0mM, KCl 0,10M en plus des conditions du tampon G. Il est à noter que les temps soulignés correspondent aux migrations des solutions qui ont été centrifugées pour éliminer les membranes avant d'effectuer l'électrophorèse.

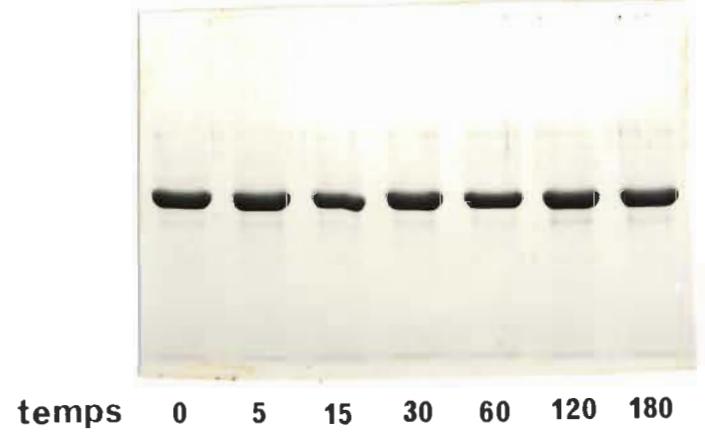
I - Actine-G + membranes $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$



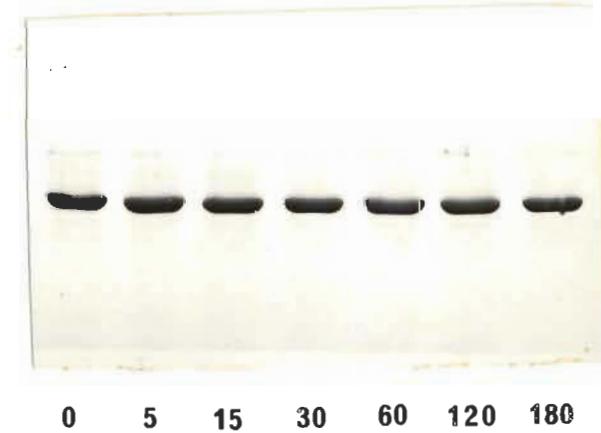
II - Actine-F + membranes $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$



III - Actine-G + membranes $0,1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$



IV - Actine-F + membranes $0,1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$



V - Membranes seules $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$



proportion identique, dans les deux cas. De plus, on peut voir des bandes parasites de poids moléculaires variés provenant de l'élimination incomplète des membranes. L'intensité de ces bandes n'augmente toutefois que très peu pendant les 60 premières minutes de l'incubation, ce qui indique aussi que le doublet qui apparaît provient bien de l'actine, et non des membranes.

La partie II de la figure 34 représente l'exacte réplique des conditions expérimentales de la partie I sauf qu'ici, de l'actine-F a été utilisée lors de l'incubation avec les membranes et que le tampon-G a été remplacé par du tampon-F. Le fait important à noter ici est la très grande stabilité de l'actine-F qui, même après 180 minutes d'incubation, semble avoir entièrement conservé son intégrité face à une protéolyse éventuelle. Il ne faut toutefois pas se surprendre de ce résultat car la résistance supérieure de l'actine-F par rapport à celle de l'actine-G face à la protéolyse a déjà été démontrée dans une étude précédente(130) de même que sa résistance supérieure face à la dénaturation dans un milieu dépourvu de nucléotides (9).

De plus les deux migrations correspondant aux échantillons pris à 0 et 60 minutes, pour le même milieu d'actine-F en présence de membranes à 2,0 mg/ml, mais cette fois centrifugés avant d'effectuer l'électrophorèse (Figure 34-II) présentent très clairement une diminution importante de la quantité d'actine-F qui demeure en solution après la centrifugation. Puisque l'actine-F ne devrait normalement pas précipiter dans ces conditions, elle doit avoir subi soit un simple effet d'entraînement dû à la présence de fragments de membranes, ou soit encore une augmentation quel-

conque de la complexité de sa structure quaternaire. Cette dernière possibilité implique une liaison directe de l'actine-F aux structures membranaires, ou encore la possibilité d'une gélification de la F-actine induite par un facteur membranaire non-identifié.

Quoiqu'elles dépassent largement le cadre du présent travail, il serait très opportun d'effectuer des études ultérieures à ce sujet de façon à déterminer laquelle de ces possibilités est la bonne. Il semble possible qu'on soit ici devant une autre évidence d'un lien direct entre l'actine et les membranes cytoplasmiques, ou même encore qu'on soit en présence d'une forme possible de régulation de la gélification de l'actine.

Les parties III et IV de la figure 34 nous présentent les électrophorégrammes obtenus suite à l'incubation respectivement de l'actine-G et de l'actine-F en présence de membranes à faible concentration (0,1 mg/ml). On observe ici, comme il fallait s'y attendre, très peu, sinon aucune, dégradation de l'actine-G ou -F, ainsi qu'une quantité beaucoup plus faible de bandes parasites provenant des membranes et ceci même si aucun des milieux représentés ici n'a été centrifugé avant l'électrophorèse.

La cinquième et dernière partie de la figure 34 nous présente les témoins sans actine des membranes à 2,0 mg/ml aux temps 0 et 60 minutes, avec et sans centrifugation. On peut remarquer ici, nonobstant les bandes d'actine et leurs doublets de dégradation, la similitude des bandes parasites entre ces électrophorèses et ceux obtenus pour l'actine-G et -F en présence de la même concentration de membranes.

La dernière constatation qu'on peut retirer de l'ensemble des résultats obtenus dans la présente section est l'absence totale de radio-activité autant pour la bande de l'actine que pour celle de tout autre composant membranaire. Il est à ce titre intéressant de préciser qu'aucune des nouvelles bandes apparaissant sur les électrophorégrammes des figures 33 et 34 ne possède une incorporation mesurable de ^{32}P . Il serait tentant de proposer l'absence pure et nette de toute phosphorylation dans ces conditions mais il ne faut pas oublier ici que l'activité spécifique du ^{32}P , avait été réglée de façon à obtenir un résultat clair pour l'actine et non pas pour un autre type de phosphorylation s'opérant à une très faible amplitude.

Une déduction intéressante peut toutefois être envisagée relativement à ces derniers faits. Tout d'abord la méthode colorimétrique au vert de Malachite nous indique la libération d'une quantité importante de fragments membranaires qui possèdent du phosphore (Figure 25). Puisqu'on sait, grâce au comptage des bandes de quelques-uns des électrophorégrammes des figures 33 et 34 (Résultats non montrés), que ce phosphore est non radioactif, il semble donc qu'il provient de petits fragments membranaires non éliminés par la centrifugation et précipités avec l'actine lors de l'ajout du TCA 10%. La logique découlant de ces deux constatations nous amène à considérer qu'il n'y a pas d'incorporation de nouveaux phosphores dans ces fragments de membranes lors de l'expérience et que ce ne sont que les phosphores initialement présents dans les membranes qui ont été déterminés par minéralisation. On doit donc éliminer ici la possibilité émise à la section 3.2.1 selon laquelle ces fragments auraient pu être phosphorylés grâce à l'ATP du milieu; ce n'est manifestement pas le cas.

Pour terminer, mentionnons que les résultats présentés dans cette section correspondent tout à fait à ceux obtenus plus tôt pour l'actine-G en présence de membranes cytoplasmiques d'hépatocytes de lapin; pas de phosphorylation et une destruction lente de l'actine-G qui s'opère aussi par le biais d'une protéolyse. Pour l'actine-F, on n'observe aucune phosphorylation de même qu'une protéolyse très ralentie et une forte tendance à co-précipiter avec les membranes lorsqu'on centrifuge le milieu réactionnel.

Nous verrons dans le chapitre suivant quelle vue d'ensemble il est possible d'obtenir à partir de la totalité de nos résultats.

CHAPITRE IV

4. DISCUSSION

Le présent chapitre vise à fournir une vue d'ensemble finale des résultats déjà discutés ponctuellement au chapitre précédent. Nous essayerons d'y présenter le plus simplement possible nos conclusions et d'établir entre elles, à la lumière de la littérature scientifique disponible, des liens qui peuvent n'avoir pas été évidents jusqu'ici.

4.1 Phosphorylation de l'actine

Comme nous avons pu le constater dans le chapitre précédent, toutes nos tentatives de phosphorylation de l'actine-G ou -F au moyen d'une fraction enrichie de membranes plasmiques de foies de rat ou de lapin se sont avérées infructueuses. Tout comme Grazi et Magri l'avaient rapporté (55), nous observions bien une augmentation de phosphate dans le surnageant d'actine débarrassé de membranes (Figures 12 et 25), mais un témoin approprié de membranes seules qui avaient subi la même centrifugation nous présentait une augmentation du même ordre de grandeur, ce qui signifiait clairement l'absence de phosphorylation de l'actine. Un élément quelconque de nos membranes devait donc s'en détacher lentement lors de l'incubation et c'est cet élément qui possédait le phosphate qu'il aurait été aisément attribué faussement à l'actine si nous n'avions pas effectué le

témoin de membranes seules (Il est important de noter ici que Grazi et Magri ne font mention d'aucun témoin de membranes sans actine),

Pour vérifier indirectement si ces éléments possédaient déjà leur phosphate ou s'ils subissaient une phosphorylation à partir de l'ATP libre au moment de l'incubation avec l'actine, nous avons incubé notre préparation de membranes en présence de tampon G sans actine. Les résultats obtenus alors ne nous ont pas fourni d'indication claire à l'égard de ce groupement phosphate, mais il est tout de suite apparu évident que tout l'ATP du milieu était complètement disparu après seulement quelques minutes en présence de membranes à faible concentration (Figures, 13, 14, 15 et 16).

Ceci éliminait d'emblée - faute de substrat - la possibilité que l'actine puisse être phosphorylée dans nos conditions pendant une période s'étendant sur quelques heures.

Face à l'impossibilité où nous étions de préparer des membranes d'hépatocytes ne possédant pas cette propriété d'hydrolyser rapidement tout l'ATP de nos milieux réactionnels, nous nous sommes posé la question suivante: "Est-ce normal que les membranes cytoplasmiques hydrolysent l'ATP?" Les paragraphes qui suivent démontreront clairement que la réponse à cette interrogation ne peut être qu'affirmative.

On sait que des nucléosides et nucléotides adénylés circulent constamment dans l'organisme où ils jouent entre autre un rôle d'inducteurs puissants lors de certains phénomènes physiologiques, telle l'induction de l'aggrégation des plaquettes par l'ADP ou encore son inhibition par l'adénosine (33, 122).

L'ATP et l'adénosine sont par ailleurs connus pour être de puissants agents vasoactifs (7, 20), quoique les mécanismes de régulation du phénomène ne soient pas encore très bien connus. Cette régulation pourrait toutefois fort bien s'accomplir via le système des ectonucléotidases dont on peut mentionner la 5'Nucléotidase qui est une glycoprotéine intrinsèque et possiblement transmembranaire (42, 51, 135, 168).

Ces ectonucléotidases, dont les sites enzymatiques sont orientés du côté extérieur des membranes cytoplasmiques, sont de fait responsables de la déphosphorylation des nucléotides de façon à rendre leur assimilation intracellulaire plus aisée. Ce phénomène a d'ailleurs été rapporté par de nombreux auteurs (10, 11, 36, 114, 115).

Il est maintenant très important de mentionner que des ectoenzymes ont été identifiés sur de nombreuses cellules (25, 37, 123) dont en particulier les hépatocytes de diverses origines (24, 73, 158).

En sus de la 5'Nucléotidase dont l'action principale est de déphosphoryler le 5'AMP en adénosine, plusieurs autres enzymes font partie du système des ectoenzymes; tel la nucléotide pyrophosphatase qui peut hydrolyser l'ATP en AMP (41), la nucléoside triphosphatase activée par le Mg^{2+} et agissant comme ATPase, ou encore la nucléoside déphosphatase pouvant déphosphoryler l'ADP en AMP, etc... (Une couverture plus complète de ces enzymes pourra être retrouvée dans la référence 122).

En fait, il semble que la surface extérieure de plusieurs types de cellules soit tapissée d'un réseau d'enzymes dont la fonction principale est d'hydrolyser complètement les nucléotides jusqu'à ce que ces derniers

soient complètement dépourvus de leur phosphate.

A titre d'exemple, citons Pearson et coll. (122) qui ont mesuré les différents produits du catabolisme de l'ATP mis en présence de deux types différents de tissus en culture. La figure 35-A nous montre les deux graphiques qu'ils ont obtenus suite à une série de mesures de la composition en nucléosides et nucléotides de ces milieux en fonction du temps d'incubation. Une réduction de notre figure 16 a aussi été reproduite sur la figure 35-B.

Il est bien évident ici qu'on ne peut relier directement les trois graphiques de la figure 35 en terme de source de membranes ou encore en terme de conditions expérimentales. On peut tout de même se permettre de constater une certaine similitude pour l'élimination rapide de l'ATP et de l'ADP au profit de l'AMP qui disparaît ensuite pour finalement laisser la place à l'adénosine.

Cette similitude de comportement nous indique bien que la face extérieure de nos membranes agit très rapidement sur le milieu réactionnel. On peut par contre difficilement savoir si leur face interne joue aussi un rôle en ce sens, pas plus d'ailleurs que l'ampleur que ce rôle pourrait avoir.

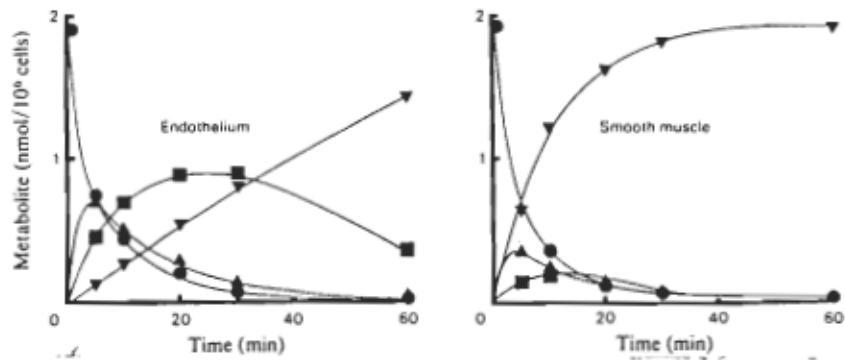
Mais pour en revenir aux aboutissements de la question posée précédemment, il est tout à fait normal que nos membranes hydrolysent rapidement tout l'ATP de notre milieu réactionnel. C'est là un signe de très bonne santé de notre suspension de membranes puisque certains de ces ecto-enzymes sont en fait utilisés comme marqueurs membranaires (158).

FIGURE 35: Hydrolyse de l'ATP par des membranes cytoplasmiques d'origines diverses. A) Formation des produits du catabolisme de l'ATP exogène par des cultures de cellules en fonction du temps. De l'ATP ($1\mu M$) a été incubé avec des cellules vasculaires et de $10\mu M$ -dipyridamole; ●—● ATP, ▲—▲ ADP, ■—■ AMP, ▽—▽ Adénosine. (Cette figure a été tirée d'un article de Pearson et coll. publié en 1980 dans Biochem. J. (122).)

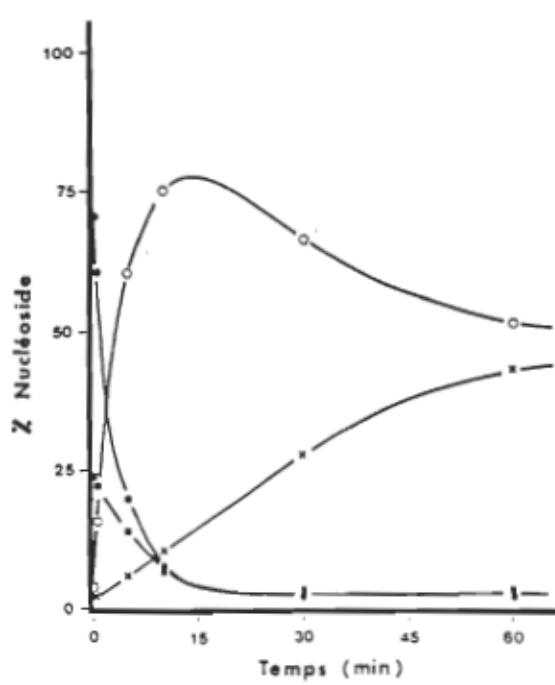
B) Effet d'une suspension de membranes cytoplasmiques d'hépatocytes de lapin sur l'ATP en fonction du temps d'incubation. Les conditions sont données à la figure # 16 dont ceci est la reproduction.

●—● ATP, ■—■ ADP, ○—○ AMP,
X—X Adénosine.

A.



B.



Donc, connaissant cette importante propriété intrinsèque des membranes d'hépatocytes, il serait fort difficile maintenant d'imaginer que la préparation de membranes que Grazi et Magri ont utilisée pour leurs expériences ait été tout à fait dépourvue de tels facteurs. Rappelons d'ailleurs que nous avons préparé nos membranes d'une façon très similaire à la leur. Et même si notre méthode avait comporté de très grandes différences pouvant entraîner par exemple une activité de déphosphorylation de l'ATP 100 fois supérieure à la leur, on peut voir à la figure 14 qu'une durée d'environ 20 minutes aurait tout de même libéré dans ces conditions plus d'une mole de phosphate (à 21°C) par mole d'ATP présente initialement. Dans un tel cas, qui nous semble vraiment dépasser de loin la limite acceptable pour deux préparations de membranes similaires, quel aurait été, passé ce délai de 20 minutes, le substrat pour la phosphorylation massive de l'actine? Cette phosphorylation pouvait s'étendre sur plus de 1 à 3 heures selon Grazi et ses coll. (54, 55).

Le facteur responsable de la perte des propriétés de l'actine dans ce cas devrait donc être différent d'une phosphorylation, puisque, de phosphorylation de l'actine, il n'y en a pas dans ces conditions - du moins pas sur une échelle mesurable.

Ceci n'exclut évidemment pas la possibilité que l'actine puisse être phosphorylée dans des conditions différentes. Rappelons qu'on a fait mention au chapitre I de plusieurs exemples de phosphorylation de l'actine. Le tableau XII nous dresse d'ailleurs une liste des tentatives de phosphorylation de l'actine qui ont été réalisées depuis une dizaine d'années environ.

Tableau XII
Tentatives diverses de phosphorylation de l'actine

Temps de phosphorylation	Enzyme	c-AMP	Type d'actine	Phosphorylation	Remarques	Année	Référence
15 min.	"X" purifié	oui	Muscle cardiaque	assez bonne	-	(1979)	(8)
Plusieurs heures	"X" purifié	oui	Actine-G non musculaire Actine-F non musculaire Actine-G musculaire Actine-F musculaire	excellente bonne bonne nulle	Enzyme ajouté périodiquement	(1981)	(165)
15 min.	-	oui	non musculaire	10 %	Chaînes natives seulement	(1979)	(144)
15 min.	3'-5' c-AMP dépendante protéine kinase purifiée	oui	Actine-F du muscle	Très faible	-	(1972)	(144)
5 min.	Protéine kinase	non	Protéine semblable à l'actine.	-	-	(1980)	(69)
30 sec	-	oui et non	non musculaire	non	extrait des synaptosomes	(1978)	(67)
10 min.	"X" purifié	oui	non musculaire musculaire	oui non	fantômes d'érythrocytes	(1981)	(16)
5 min.	-	non	non musculaire	oui	érythrocytes infectés par malaria	(1979)	(26)

N.B.: "X" = protéine kinase c-AMP dépendante

On peut constater que dans la majorité des cas où l'actine a pu être phosphorylée, à un niveau plus ou moins important, les conditions expérimentales nécessitaient de l'AMPC ainsi que la présence d'un enzyme purifié, en l'occurrence la protéine kinase dépendante de l'AMPC. On peut voir que d'une manière générale l'actine non-musculaire semble un meilleur substrat à la phosphorylation que l'actine musculaire, de même que la forme G de l'actine serait phosphorylée plus facilement que sa forme F.

On constate aussi que partout où des tissus, cellules ou membranes naturelles ont été utilisées, le temps permis pour la phosphorylation ne dépassait pas 15 minutes. Des études cinétiques plus longues nécessitent la présence d'un enzyme purifié de façon à éliminer toute réaction secondaire indésirable. De plus, le seul exemple que nous ayons trouvé faisant état d'une phosphorylation indépendante de l'AMPC pour l'actine a été rapporté par Chaimanee et Yulhavong (26). Il s'agissait alors de la phosphorylation d'actine d'érythrocytes infectés par Plasmodium berghei (malaria). Ces érythrocytes étaient donc anormaux et de plus, aucune mention de quantification n'a été effectuée dans cette étude.

Quoique déjà en présence de nombreux éléments, autant théoriques qu'expérimentaux, qui nous permettaient d'émettre un doute sérieux sur l'hypothèse de Grazi et Magri, nous ne pouvions pas vraiment la rejeter sans posséder des preuves irréfutables de ce que nous avancions à ce moment.

Il devenait alors nécessaire de prouver que le phénomène important lors de la perte des propriétés de l'actine (suite à une incubation avec des membranes plasmiques) n'était pas la phosphorylation de l'actine,

mais bien l'élimination totale de l'ATP et de l'ADP du milieu réactionnel.

4.2 Comportement de l'actine en absence de nucléotide

Nous avons vu au chapitre III qu'il est possible de retirer entièrement l'ATP et l'ADP d'un milieu donné par un traitement au Dowex I-X8. Un tel traitement sur une solution d'actine-G élimine immédiatement tout l'ATP et l'ADP du milieu et l'actine-G-ATP perd ensuite graduellement son nucléotide suite au déplacement de l'équilibre dans le sens favorisant la forme actine-G sans ATP. Plusieurs études concernant les constantes d'équilibres reliées à cet échange dans différentes conditions ioniques et en présence de différents analogues de l'ATP ont d'ailleurs traité amplement de ce sujet (6, 32, 80, 102, 147).

D'autre part, nos résultats nous ont permis de constater que l'actine-G incubée en présence de Dowex-I-8X perdait lentement mais irréversiblement sa polymérisabilité (figure 18). Ces résultats ne venaient en fait que confirmer plusieurs études déjà anciennes (1961) de la polymérisabilité de l'actine en absence de nucléotide (6, 9).

Les travaux reconnus de Kasai (74) en 1964 démontraient finalement la possibilité de polymériser l'actine-G native complètement démunie de son nucléotide et de son cation divalent. Mais ces dernières expériences avaient été effectuées dans un milieu à forte concentration de sucre de façon justement à éliminer toute dénaturation possible de l'actine. On voit donc que l'ATP est essentiel pour la stabilité de l'actine face à sa dénaturation, mais qu'il ne semble pas d'une nécessité absolue pour permettre sa polymérisation. Puisque nos membranes cytoplasmiques d'hépa-

tocytes, et probablement celles obtenues par Grazi et Magri, déphosphorylaient très rapidement les nucléotides du milieu réactionnel; puisque l'élimination de ces nucléotides était suivie de la perte rapide de l'ATP et de l'ADP liés à l'actine; et, enfin, puisque cette perte du nucléotide lié amène la dénaturation irréversible de l'actine-G; il est tout à fait normal que l'incubation de l'actine-G en présence de ces membranes soit accompagnée d'une perte graduelle de sa polymérisabilité et de sa capacité d'inhiber la DNase I pancréatique. (Rappelons à cet effet que le complexe actine:DNase I doit lui aussi contenir une molécule d'ATP lié (68,105).)

On voit donc que n'importe quel traitement pouvant enlever le nucléotide lié de l'actine amènerait automatiquement sa dénaturation irréversible ainsi que les divers phénomènes qui en découlent,

A ce stade, nous avons voulu vérifier expérimentalement toutes les déductions auxquelles nous en étions arrivés de façon théorique. Nous avons donc conçu et réalisé l'expérience "monstre" décrite à la section 3.2.4. Comme nous l'avons déjà mentionné, l'intérêt fondamental de cette expérience était de pouvoir suivre simultanément de nombreux éléments pour être en mesure de les comparer réellement à partir de conditions expérimentales identiques.

Comme nous avons pu le constater à la section 3.2.4, nous avons repris, dans le cadre de cette expérience, les essais de Grazi et Magri concernant la phosphorylation de l'actine-G en présence de membranes et les effets de cette supposée phosphorylation sur deux propriétés fondamen-

tales de l'actine; sa polymérisabilité et sa capacité d'inhiber la DNase I pancréatique (Fig 22 et 24). Nos résultats en ce sens se sont d'ailleurs révélés très semblables aux leurs.

On a vu aussi qu'un témoin de membranes seules sans actine permettait d'éliminer la possibilité que l'actine soit phosphorylée malgré l'obtention de résultats similaires à Grazi et ses coll. (55) pour la détermination de l'orthophosphate lié à l'actine (par la méthode colorimétrique au vert de Malachite).

Même si ces résultats étaient déjà connus, nous les avons répétés pour être bien en mesure de pouvoir les relier avec les nouveaux paramètres que nous introduisions à ce moment.

Ces paramètres ont été présentés aux sections 3.2.4.5 à 3.2.4.7 inclusivement. Il s'agissait de repérer exactement où se situait le noyau adényl marqué au tritium ainsi que le phosphate gamma de l'ATP possédant un phosphore 32. On pouvait aussi vérifier par électrophorèse si une incorporation de phosphore 32 était visible dans la bande d'actine.

Tout d'abord, on a pu constater qu'un échange rapide de l' $\{^{32}\text{P}\}\gamma\text{-ATP}$ se produisait avec l'ATP lié à l'actine avant même de débuter l'incubation avec les membranes (Figure 26). On a pu constater ainsi que l'actine perdait lentement mais irréversiblement son ATP. On a pu aussi voir que le traitement au Dowex effectué pour éliminer l'ATP libre du milieu était efficace mais qu'il n'était cependant pas suffisant pour arracher le nucléotide lié à l'actine, de même que la cinétique de l'enlèvement du nucléotide de l'actine est plus rapide en présence de membranes

à forte concentration, mais qu'aucune relation directe ne peut être établie entre cette cinétique et la concentration de membranes. Le seul point qu'on ne puisse vraiment expliquer (Figure 26) est la réapparition du ^{32}P dans le milieu traité au Dowex après plusieurs heures d'incubation à un moment où déjà l'actine est complètement dénaturée. Mais cette remontée ne peut certainement démontrer la phosphorylation de l'actine ni probablement d'ailleurs celle d'un autre composant membranaire puisque tout l'ATP du milieu est entièrement détruit à ce moment. (Il pourrait peut-être s'agir d'un effet de saturation du Dowex par le phosphate mais nous ne pouvons l'affirmer.)

Les mêmes conclusions peuvent être tirées de la figure 27 où l'on a mesuré l'ensemble du tritium présent à chaque étape de la prise d'échantillon et pour chaque milieu réactionnel. Ici, par contre, on ne voit pas seulement la présence d'ATP ou encore de phosphate libre, mais aussi celle de tous les dérivés adénylés provenant de l'hydrolyse de l'ATP par les membranes. On a pu constater alors que le Dowex était impuissant à éliminer certains de ces dérivés, comme l'adénine et l'adénosine dans ces conditions.

Quant à l'identification de la nature des nucléotides présents à l'état libre ou liés à l'actine, la section 3.2.4.6 nous semble avoir été suffisamment explicite à ce sujet. Rappelons que l'ATP et l'ADP — les deux nucléotides qui possèdent la faculté de stabiliser l'actine — sont très rapidement éliminés du milieu et que le % d'ATP lié (à l'actine) diminue à un rythme fort semblable à celui enregistré pour la perte des propriétés de l'actine.

Le dernier aspect que nous a révélé cette expérience monstre était la présence d'une protéolyse assez importante exercée sur l'actine par notre préparation de membranes (Voir figure 33, section 3.2.4.7). Cette protéolyse n'était toutefois pas d'une ampleur suffisante pour expliquer à elle seule la perte de la polymérisabilité de l'actine, ou encore celle de son inhibition de la DNase I pancréatique. Tout au plus, elle aura induit une accélération du processus. On peut ici imaginer qu'un tel phénomène de protéolyse a pu prendre place dans les expériences relatées par Grazi et Magri (46), malheureusement il nous est impossible de vérifier cette supposition.

Suite à cette expérience à multiples aspects, nous avons effectué une dernière démarche expérimentale visant à vérifier la possibilité de phosphoryler l'actine-F à l'aide de membranes plasmiques de foies de rats. Et si la section 3.2.5 a déjà bien présenté ce sujet, rappelons tout de même les principales conclusions qu'on a pu en tirer.

Tout d'abord, reprécisons que cette expérience était tout à fait distincte de celle décrite à la section 3.2.4, et que même si la méthode de préparation de membranes était identique à celle utilisée pour l'expérience monstre, des rats et non un lapin en ont été la source dans ce cas-ci. (Nous avions déjà mentionné que ces deux sources de membranes étaient identiques quant à leurs effets sur l'actine...).

Les conclusions qui se sont imposées lors de l'analyse des électrophorégrammes (Figure 34) et des résultats de comptage des bandes d'actine (Tableau XI) étaient les suivantes: pas de phosphorylation de l'actine mesurable (au-dessous de 1%) ni pour l'actine-G, ni pour l'actine-F; une

protéolyse importante sur l'actine-G et nulle pour l'actine-F et finalement; une tendance de l'actine-F à co-précipiter avec les membranes. Connaissant les propriétés des deux formes de l'actine, ces résultats ne surprennent nullement sauf pour la co-précipitation de l'actine-F dans des conditions où, seule, elle n'aurait aucunement précipité . Cette dernière constatation nous amène à considérer une double possibilité qu'il serait fort intéressant de vérifier plus en profondeur lors d'études subséquentes. En effet, on est clairement ici en présence de la manifestation d'un lien direct de l'actine à un composant membranaire non déterminé, ou encore à une forme de gélification de l'actine induite par un élément membrinaire quelconque.

Nous avons donc réussi à reproduire l'essentiel des résultats obtenus par Grazi et ses collaborateurs (46, 113) tout en obtenant une conclusion tout à fait différente de la leur. Le seul effet de l'action des membranes sur l'actine que nous n'ayons pas touché expérimentalement est la capacité de cette dernière à induire l'ATPase de la myosine.

Les raisons pour lesquelles nous n'avons pas jugé utile de reproduire leurs résultats en ce sens sont relativement simples. Tout d'abord, il n'y a pas de phosphorylation et toutes les modifications du comportement de l'actine sont reliées à la perte de son nucléotide lié. De plus les résultats présentés par Grazi et coll. (54, 55) sur l'induction de l'ATPase de la myosine par l'actine "modifiée" correspondent à ceux qu'on serait en mesure d'attendre à partir d'actine dépourvue de nucléotide.

A cet effet, les travaux reconnus de Bárány et de ses collaborateurs (9) ont clairement démontré en 1961 que l'actine, suite à l'élimi-

nation complète des nucléotides libres dans le milieu, de même qu'à celle de jusqu'à 60% de ses nucléotides liés, pouvait tout de même activer l'ATPase de la myosine avec un rendement de 100% si ses groupements -SH étaient protégés par le β -mercaptopropanoïde.

Rappelons ici que Grazi et ses collaborateurs ont aussi travaillé dans des conditions incluant la présence de β -mercaptopropanoïde à une concentration normalement jugée suffisante pour protéger efficacement les groupements-SH de l'actine.

Mais, avant tout, il ne faut pas oublier que le milieu réactionnel d'actine en présence de membranes possède plusieurs enzymes capables d'hydrolyser l'ATP. De plus, on a vu par électrophorèse que plusieurs protéines et fort probablement aussi plusieurs de ces enzymes ne peuvent être entièrement éliminés du milieu par une centrifugation. L'activation de l'ATPase de la myosine par l'actine modifiée que Grazi et ses collaborateurs ont décrite semble plutôt, à la lumière de ces faits, être l'activité normale des enzymes membranaires présents avec l'actine. Cette activation de l'ATPase de la myosine pourrait bien n'être qu'un autre artefact expérimental qu'il est impossible de percevoir sans avoir effectué le contrôle préliminaire de l'effet des membranes seules sur le tampon G.

Quant à leur observation selon laquelle leur actine-G "modifiée" n'était plus en mesure d'augmenter la viscosité d'un milieu comptant déjà une bonne concentration de fragment S-1 de la myosine, ce n'est en rien surprenant si l'on est en fait en présence d'actine complètement dénaturée et incapable de polymériser.

Leur dernière expérience à l'aide de l'actine-G "modifiée" par les membranes plasmiques relatait que cette dernière pouvait toujours se lier à des filaments de myosine et produire une contraction des filaments d'actomyosine obtenus suite à l'ajout d'ATP (par la méthode décrite par Hayashi et coll. (66). A cet égard, rappelons que Barany et coll. (9) établissaient que l'actine, traitée au charbon activé pendant 30 minutes à 25°C et cela successivement à trois reprises, pouvait encore se lier à la myosine. Et cela malgré le fait qu'elle ait alors perdu la totalité de son ATP lié. A la lumière des travaux de Barany et de ses collaborateurs, il est peu surprenant de constater que l'actine soit encore en mesure de se lier à des filaments de myosine après une incubation en présence de membranes. Le fait que Grazi ait pu voir des filaments d'actine suite à cette liaison peut aussi s'expliquer si on se souvient que l'actine peut être en mesure de polymériser en certaines occasions en absence de nucléotides. La présence de myosine entière doit être un élément important dans ce cas-ci (Quoique Grazi ne montre pas les photographies de ces filaments d'actine ...)

Quoiqu'il en soit, les résultats obtenus par Grazi et coll. (54, 55) en ce qui a trait aux relations entre l'actine et la myosine ne vont aucunement à l'encontre de l'hypothèse que nous avons émise au sujet de la non phosphorylation de l'actine dans ces conditions. Il semblerait plutôt qu'ils viennent l'appuyer en lui ajoutant un poids nouveau.

Le tout dernier point à considérer se rapporte à l'effet des membranes sur l'actine-F. Grazi et Magri (55) ont constaté une phosphorylation équimolaire accompagnée d'une baisse de viscosité (environ le 1/3 de sa

viscosité spécifique initiale), ainsi qu'une perte de l'inhibition de la DNase I . Dans ce cas aussi, l'activation de l'ATPase de la myosine demeurerait inchangée.

L'explication de tous ces phénomènes peut encore être facilement fournie à la lecture des travaux de Barany et coll. (9) et de ceux de Kasai et Oosawa (75). Ces derniers travaux nous démontrent la possibilité d'obtenir une F-actine partiellement privée de nucléotide suite à une dialyse prolongée de l'actine-F-ADP. Cette dernière conserve cependant sa structure polymérisée et donc sa viscosité, de même que de l'actine-G-ATP saine peut être obtenue de nouveau par une dialyse à faible force ionique en présence d'ATP. La forme polymérisée de l'actine préserve donc l'intégrité de cette protéine même en l'absence de nucléotide autant dans le milieu qu'à l'intérieur même du polymère. On a déjà mentionné de plus que l'actine-F est beaucoup plus résistante que l'actine-G pour de nombreuses situations dénaturantes.

Il est donc normal que l'actine-F traitée aux membranes conserve sa viscosité spécifique à un niveau assez élevé après 1 ou 3 heures de traitement. La baisse obtenue peut être imputée soit à l'action éventuelle de protéases, soit à une modification allostérique des monomères d'actine pouvant modifier ses propriétés physiques, ou soit encore à une baisse de concentration de l'actine suivant une éventuelle co-précipitation en présence de membranes. Puisqu'aucune vérification de la concentration d'actine n'a été effectuée à cet égard par Grazi et Magri (55), il n'est pas possible de déterminer laquelle de ces hypothèses ou encore quelle combinaison de ces hypothèses représente le mieux la réalité.

Quoiqu'il en soit , le fait que cette actine ne puisse plus inhiber la DNase I pancréatique laisse supposer que l'actine-F ait subi une perte importante de nucléotide lié et qu'elle ne peut plus interagir avec cet enzyme. Il serait académiquement fort intéressant de vérifier cette dernière possibilité.

Quant à la capacité de l'actine-F d'activer l'ATPase de la myosine, rappelons à cet effet que, tout comme nous l'avons mentionné précédemment pour l'actine-G, le test d'activation a certainement dû être faussé par l'introduction dans le système utilisé pour ce test d'enzymes membranaires pouvant hydrolyser l'ATP et donc mimer une activation de la myosine.

De nouveau , aucune contradiction notoire avec l'hypothèse à laquelle nos résultats nous ont irrémédiablement conduit.

4.3 Conclusion

A la lumière des faits déjà exposés , il nous apparaît plutôt hasardeux d'entreprendre des études cinétiques lentes de phosphorylation sur une protéine comme l'actine à l'aide d'une préparation plus ou moins purifiée de membranes biologiques.

Les raisons des problèmes rencontrés dans une telle étude sont multiples. Tout d'abord, il existe , dans de telles préparations de membranes, plusieurs sources de protéolyse qui peuvent se manifester comme étant assez importantes après quelques heures. Mais surtout , la présence

d'ATPases et d'autres agents déphosphorylant les divers nucléotides interdit une prolongation des réactions de phosphorylation au-delà du temps dévolu pour l'élimination du substrat fournissant le phosphate, soit l'ATP. L'addition continue d'ATP pourrait éliminer ce facteur, mais il serait alors difficile d'évaluer l'effet des produits de dégradation sur la cinétique étudiée.

Mais le facteur le plus important est que l'actine représente une protéine assez particulière puisqu'elle doit posséder de l'ATP (ou de l'ADP) lié pour être en état normal de fonctionnement à l'état natif. Une inactivation lente mais irréversible suit la perte de son nucléotide et des modifications normales de ses propriétés intrinsèques s'ensuivent.

Nous avons donc pu constater tout au long du présent travail que l'utilisation de membranes biologiques peut parfois causer des effets tout à fait différents de ceux recherchés et même causer des artéfacts nécessitant de longues recherches avant d'être identifiés comme tels.

La phosphorylation observée par Grazi et coll. (54, 55) nous semble bien appartenir à ce type d'artefact. Nous ne nions toutefois pas la possibilité que l'actine puisse éventuellement être phosphorylée in vivo et ces deux auteurs ont peut-être amené les éléments d'une hypothèse avant-gardiste sur un des mécanismes fondamentaux de la régulation non-musculaire des différentes formes d'actine. Mais on ne peut encore affirmer quoi que ce soit en ce sens.

Ces recherches nous auront toutefois permis d'apporter un autre élément concernant un lien direct de l'actine avec les membranes par la

co-centrifugation de l'actine-F en présence de ses dernières. De même que nous avons pu identifier une forme de gélification de l'actine-G induite par ces mêmes membranes. Ces deux aspects demeurent toujours l'un des problèmes aigus de la motilité cellulaire et beaucoup reste encore à faire en ce sens.

BIBLIOGRAPHIE

1. ADELMAN, M.R., Taylor E.W. (1969) Further purification and characterization of slime mold myosin and slime mold actin. *Biochemistry* 8, 4976-4988.
2. ADELSTEIN, R.S., Eisenberg, E. (1980) Regulation and kinetics of the actin-myosin-ATP interaction. *Ann. Rev. Biochem.*, 49, 921-956.
3. AMES, B.N., Dubin, D.T. (1960) The role of polyamines in the neutralization of bacteriophage deoxyribonucleic acid. *J. Biol. Chem.*, 253, 769-775.
4. ANDERSON, N.L. (1979) The band γ cytoplasmic actins are differentially thermostabilized by MgADP; γ actin binds MgADP more strongly. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 89, 486-490.
5. ARBER, W. (1974) DNA Modification and destruction. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 14, 1-37.
6. ASAKURA, S. (1961) The interaction between G-actin and ATP. *Arch. Biochem. and Biophys.* 92, 140-149.
7. BAER, H.P., Drummond, G.I. (1968) Catabolism of adenine nucleotides by the isolated perfused rat heart. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 127, 33-36.

8. BAILIN, G. (1979) Phosphorylation of a bovine cardiac actin complex. Am. J. Physiol. 236-1, C41-C46.
9. BARANY, M., Nagy, B., Finkelman, F., Chrambach, A. (1961) Studies on the removal of the bound nucleotide of actin. J. Biol. Chem. 236, 2917-2925.
10. BENGIS-GARBER, C., Kushner, D.J. (1981) Purification and properties of 5'-Nucleotidase from the membrane of Vibrio Costicola, a moderately halophilic bacterium. J. Bacteriol. 146, 24-32.
11. BENGIS-GARBER, C., Kushner, D.J., (1982) Role of membrane-bound 5'Nucleotidase in nucleotide uptake by the moderate halophile Vibrio Costicole. J. Bacteriol. 149, 808-815.
12. BERRY, M.N., Friend, D.S. (1969) High-Yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. A biochemical and fine structural study. J. Cell Biol. 43, 506-520.
13. BIRCHMEIER, W., Singer, S.J. (1977) On the mechanism of ATP-Induced shape changes in human erythrocyte membranes. II. The role of ATP. J. Cell Biol. 73, 647-659.
14. BLIKSTAD, I., Markey, F., Carlsson, L., Persson, T., Lindberg, U. (1978) Selective assay of monomeric and filamentous actin in cell extracts, using inhibition of deoxyribonuclease I. Cell 15, 935-943.
15. BLIKSTAD, I., Sundkvist, I., Eriksson, S. (1980) Isolation and characterization of profilactin and profilin from calf thymus and brain. Eur. J. Biochem. 105, 425-433.

16. BOIVIN, P., Garbarek, M., Dhermy, D., Galand, G. (1981) In vitro phosphorylation of the red blood cell cytoskeleton complex by cyclic AMP dependant protein kinase from erythrocyte membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 647, 1-6.
17. BRANTON, D., Cohen, C.M., Tyler, J. (1981) Interaction of cytoskeletal proteins on the human erythrocyte membrane. *Cell* 24, 24-32.
18. BRAY, D., Thomas, C. (1976) Unpolymerized actin in fibroblasts and brain. *J. Mol. Biol.* 105, 527-544.
19. BRETSCHER, A., Weber, K. (1978) Localization of actin and microfilament-associated proteins in the microvilli and terminal web of the intestinal brush border by immunofluorescence microscopy. *J. Cell Biol.* 79, 839-845.
20. BURNSTOK, G. (1978) Past and current evidence for the purinergic nerve hypothesis. In physiological and regulatory functions of adenosine and adenine nucleotides (Baer, H.P. & Drummund, G.I., eds.) p. 3-32. Raven Press, New-York.
21. CARLSSON, L., Nystrom, L.-E., Lindberg, U., Kannan, K.K., Cid-Dresdner, H., Lovgreen, S. et Jornvall, H. (1976) Crystallization of a non-muscle actin. *J. Mol. Biol.* 105, 353-366.
22. CARLSSON, L., Nystrom, L.-E., Sundkvist, I., Markey, F., Lindberg, U. (1977) Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight in non-muscle cells. *J. Mol. Biol.* 115, 465-483.
23. CAROTHERS-CARRAWAY, C.A., Jett, G., Carraway, K.L. (1975) Cooperati-

- ve effects in the perturbation of membrane enzymes by concanavalin A. Biochem. Biophys. Res. Com. 67, 1301-1306.
24. CARRAWAY, K.L., Doss, R.C., Huggins, J.W., Chesnut, R.W. et Carothers-Carraway, C.A. (1974) Effects of cytoskeletal perturbant drugs on ecto-5'nucleotidase, a concanavalin A receptor. J. Cell Biol. 83, 539-543.
25. CHAKRAVARTY, N., Echetaba, Z. (1978) Plasma membrane adenosine triphosphatases in rat peritoneal mast cells and macrophages - the relation of the mast cell enzyme to histamine release. Biochem. Pharmacol. 27, 1561-69.
26. CHAIMANEE, P., Yulhavong, Y. (1979) Phosphorylation of membrane proteins from Plasmodium Berghei - infected red cells. Biochem. Biophys. Res. Comm. 87, 953-959.
27. CLARKE, M., Spudich, J.A. (1977) Nonmuscle contractile proteins: the role of actin and myosin in cell motility and shape determination. Ann. Rev. Biochem. 46, 797-822.
28. COHEN, C.M., Branton, D. (1979) The role of spectrin in erythrocyte membrane-stimulated actin polymerisation. Nature 279, 163-165.
29. COHEN, C.M., Jackson, P.L., Branton, D. (1978) Actin-membrane interactions: association of G-actin with the red cell membrane. J. Supramolecular structures 9, 113-124.
30. COHEN, P.P., Umbreit, W.W., Burris, R.H. and Stauffer, J.F. (Editors)

- (1957) Manometric techniques. Burgers publishing company Minneapolis.
p. 149.
31. COHN, W.E., Carter, C.E. (1950) The separation of adenosine polyphosphates by ion exchange and paper chromatography. *J. Am. Chem. Soc.* 72, 4273-4275.
32. COOKE, R., Murdoch, H. (1973) Interaction of actin with analogs of adenosine triphosphate. *Biochemistry* 12, 3927-3932.
33. COOPER, D.R., Lewis, G.P., Lieberman, G.E., Webb, H., Westwick, J. (1979) ADP metabolism in vascular tissue, a possible thrombo-regulatory mechanism. *Thrombosis Res.* 14, 901-914.
34. COOPER, E.J., Trautmann, M.L., Laskowski, M. (1950) Occurrence and distribution of an inhibitor for desoxyribonuclease in animal tissues. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 73, 219-222.
35. CRAIG, S.W., Pardo, J.V. (1979) Alpha-Actinin localization in the junctional complex of intestinal epithelial cells. *J. Cell Biol.* 80, 203-210.
36. DIETERLE, Y, Ody, C., Ehrensberger, A., Stalder, H., Junod, A.F. (1978) Metabolism and uptake of adenosine triphosphate and pulmonary endothelial cells and fibroblasts in culture. *Circul. Res.* 42, p. 869-876.
37. DOSNE, A.M., Legrand, C., Bauvois, B., Bodevin, E., Caen, J.P. (1978) Comparative degradation of adenylnucleotides by cultured en-

- dothelial cells and fibroblast. Biochem. Biophys. Res. Com. 85,
183-189.
38. ELZINGA, M., Collins, J.H., Kuehl, W.M., Adelstein, R.S. (1973) Complete amino-acid sequence of actin of rabbit skeletal muscle. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70 , 2687-2691.
39. ENGEL, J.N., Gunning, P.W., Kedes, L. (1981) Isolation and characterization of human actin genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78, 4674-4778.
40. ENGLAND, P.J., Stull, J.T., Krebs, E.G. (1972) Dephosphorylation of the inhibitor component of troponin by phosphorylase phosphatase. J. Biol. Chem. 247, 5275-5277.
41. EVANS, W.H. (1974) Nucleotide pyrophosphatase, a glycoprotein located in the hepatocyte surface. Nature (London) 250, 391-394.
42. EVANS, W.H. (1978) in "Preparation and characterisation of mammalian plasma membranes (Work, T.S., & Work, E., eds) pp. 96-99, North-Holland, Amsterdam, New-York and Oxford.
43. FAIRBANKS, G., Steck, T.L., Wallack, D.F.H. (1971) Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocytes membrane. Biochemistry 10, 2606-2617.
44. FECHHEIMER, M., Cebra, J.J. (1979) Isolation and characterization of actin and myosin from B-Lymphocytic Guinea pig leukemia cells. J. Immunology 122 , 2590-2597.

45. FERAMISCO, J.R. (1979) Micro-injection of fluorescently labeled alpha-actinin into living fibroblast. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 76, 3967-3971.
46. FISKE, C.H., Subbarow, Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem. 66, 375-400.
47. FLANAGAN, M.D., Lin, S. (1979) Comparative studies on the characteristic properties of two forms of brain actin separable by isoelectric focussing. J. Neurochemistry 32, 1037-1046.
48. GARRELS, J.I., Gibson, W. (1976) Identification and characterization of multiple forms of actin. Cell 9, 793-805.
49. GAUTHIER, G.F., Lowey, S. (1977) Polymorphism of myosin among skeletal muscle fiber types. J. Cell Biol. 74, 760-779.
50. GLENNEY, J.R., Jr, Glenney, P., Osborn, M., Weber, K. (1982) An F-actin-and-calmodulin-binding protein from isolated intestinal brush borders has a morphology related to spectrin. Cell 28, 843-854.
51. GOODLAD, G.A.J., Clark, C.M. (1982) Alterations in hepatic 5'Nucleotidase in the tumor-bearing rat. Enzyme 27, 119-123.
52. GORDON, D.J., Boyer, J.L., Korn, E.D. (1977) Comparative biochemistry of non-muscle actins. J. Biol. Chem. 252, 8300-8390.
53. GORDON, D.J., Yang, Y., Korn, E.D. (1976) Polymerization of acanthamoeba actin. Kinetics, thermodynamics and co-polymerisation with muscle actin. J. Biol. Chem. 251, 7474-7479.

54. GRAZI, E., Ferri, A., Lanzara, V., Magri, E., Zaccarini, M. (1980) G-Actin modified by plasma membrane interaction polymerizes only in the presence of filamentous myosin. *FEBS Letters* 112, 67-69.
55. GRAZI, E., Magri, E. (1979) Phosphorylation of actin and removal of its inhibitory activity on pancreatic DNAase I by liver plasma membranes. *FEBS LETTERS* 104, 284-286.
56. GROSCHEL-STEWART, U. (1980) Immunochemistry of cytoplasmic contractile proteins. *International Rev. of Cytol.* 65, 193-255.
57. GROSSMAN, L., Brann, A., Feldberg, R., Mahler, I. (1975) Enzymatic repair of DNA. *Ann. Rev. Biochem.* 44, 19-43.
58. GRUDA, J., Pollender, J.-M., Therien, H.-M. (1983) Effect of liver plasma membranes on G-actin. I. Possible implication of membrane NPases in inactivation of G-actin. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 61, 85-92.
59. HANKS, J.H., Wallace, R.E. (1949) Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 71, 196-200.
60. HARRIS, D.A., Schwartz, J.H. (1981) Characterization of brevin, a serum protein that shortens actin filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78, 6798-6802.
61. HARRIS, H.E., Weeds, A.G. (1978) Platelet actin: sub-cellular distribution and associated with profilin. *FEBS Letters* 90, 84-88.

62. HARTWIG, John, H., Stessel, Thomas, P. (1975) Isolation and properties of actin, myosin, and a new actin-binding protein in rabbit alveolar macrophages. *J. Biol. Chem.* 250, 5696-5705.
63. HATAMO, S., Matsumura, F., Takayuki, H., Takahashi, S., Sato, H., Ishikawa, H. (1979) Assembly and disassembly of F-actin filaments in Physarum plasmodium and Physarum actinin. *Cell Mobility: molecules and organization* Ed.: Hatamo, S., Ishikawa, H., Sato, H., University of Tokyo Press, p. 87 à 104.
64. HATANO, S., Oosawa, F. (1966) Isolation and characterization of plasmodium actin. *Biochim. Biophys. Acta* 127, 488-498.
65. HATANO, S., Tazawa, M. (1968) Isolation, purification and characterization of myosin B from myxomycete plasmodium. *Biochim. Biophys. Acta* 154, 507-519.
66. HAYASHI, I., Silver Wallace, R.B. jr., Cayer, M.L. et Smith, D.S. (1977) Actin-myosin interaction. Self-assembly into a bipolar "Contractile Unit". *J. Mol. Biol.* 111, 159-171.
67. HERSHKOWITZ, M. (1978) Influence of calcium on phosphorylation of a synaptosomal protein. *Biochim. Biophys. Acta* 542, 274-283.
68. HITCHCOCK, S.E. (1980) Actin deoxyribonuclease I Interaction. Depolymerization and nucleotide exchange. *J. Biol. Chem.* 255, 5668-5673.
69. HOFSTEIN, R., Hershkowitz, M., Gozes, I., Samuel, D. (1980) The characterization and phosphorylation of an actin-like protein in synaptosomal membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 624, 163-162.

70. HOROVITCH, S.J., Storti, R.V., Rich, A., Partue, M.L. (1979) Multiple actins in Drosophila Melanogaster. *J. Cell Biol.* 82, 86-92.
71. HOWARD, R.B., Pesh, L.A. (1968) Respiratory activity of intact isolated parenchymal cells from rat liver. *J. Biol. Chem.* 243, 3105-3109.
72. ITAYA, K., UI, M. (1966) A new micromethod for the colorimetric determination of inorganic phosphate. *Clin. Chim. Acta* 14, 361-366.
73. ITOH, R. (1982) Studies on some molecular properties of cytosol 5'Nucleotidase from rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* 716, 110 113.
74. KASAI, M., Nakano, E., Oosawa, F. (1965) Polymerization of actin free from nucleotides and divalent cations. *Biochim. Biophys. Acta* 94, 494-505.
75. KASAI, M., Oosawa, F. (1963) Removal of nucleotides from F-actin, *Biochim. Biophys. Acta* 75, 223-233.
76. KELLY, P.T., Cotman, C.W. (1978) Synaptic proteins (Characterization of TUBULIN and ACTIN and identification of a distinct postsynaptic density polypeptide.) *J. Cell Biol.* 79, 173-183.
77. KORN, E.D. (1982) Actin polymerization and its regulation by proteins from non muscle cells. *Physiological reviews* 62, 672-737.
78. KORN, E.D. (1978) Biochemistry of actomyosin-dependant cell motility (A Review) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75, 588-599.
79. KORN, E.D. (1979) Regulation of the form and function of actin and myosin of non-muscle cells. *Acta Protozoologica* 18, 75-90.

80. KUEHL, W.M., Gergely, J. (1969) The kinetics of exchange of adenosine triphosphate and calcium with G-Actin . J. Biol. Chem. 244, 4720-4729.
81. KUNITZ, M. (1950) Crystalline desoxyribonuclease I. Isolation and general properties. Spectrophotometric method for the measurement of desoxyribonuclease activity. J. Gen. Physiol. 39, 349-362.
82. KUNITZ, M. (1948) Isolation of crystalline desoxyribonuclease from beef pancreas. Science 108, 19-20.
83. LACKS, S.A. (1981) Deoxyribonuclease I in Mammalian tissues. Specificity of inhibition by actin. J. Biol. Chem. 256, 2644-2648.
84. LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London) 227, 680-685.
85. LANDON, F., Huc, C., Thomé, F., Oriol, C., Olomucki, A., (1977) Human platelet actin: evidence of β and γ forms and similarity of properties with sarcomeric actin. Eur. J. Biochem. 81, 571-577.
86. LAYNE, E. (1957) Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. Methods in enzymology (Colowick S.P. et Kaplan N.O., eds) vol. 3, 447-454. Academic Press New-York.
87. LAZARIDES, E. (1976) Actin, α -actinin, and tropomyosin interaction in the structural organization of actin filaments in nonmuscle cells. J. Cell Biol. 68, 202-219.
88. LAZARIDES, E., Lindberg, U., (1974) Actin is the naturally occu-

- ring inhibition of DNase I. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 4742-46.
89. LEBOWITZ, E.A., Cooke, R. (1978) Contractile properties of actomyosin from human blood platelets. J. Biol. Chem. 253, 5443-47.
90. LEE, R.W.H., Mushynski, W.E., Trifaro, J.M. (1979) Two forms of cytoplasmic actin in adrenal chromaffin cells. Neuroscience 4, 843-852.
91. LEVINE, J., Willard, M. (1981) Fodrin: axonally transported polypeptides associated with internal periphery of many cells. J. Cell. Biol. 90, 631-643.
92. LIAO, T.-H., Salnikow, J., Moore, S., Stein, W.H. (1973) Bovine pancreatic deoxyribonuclease A. Isolation of cyanogen bromide peptides; complete covalent structure of the polypeptide chain. J. Biol. Chem. 248, 1489-1495.
93. LINDBERG, M.U., Skoog, L. (1970) Purification from calf thymus of an inhibitor of deoxyribonuclease I. Eur. J. Biochem. 13, 326-335.
94. LINDBERG, U. (1964) Purification of an inhibitor for pancreatic deoxyribonuclease from calf spleen. Biochim. Biophys. Acta 82, 237-248.
95. LINDBERG, U. (1967) Molecular weight and amino-acid composition of deoxyribonuclease I. Biochemistry 6-1, 335-342.
96. LOEWY, A.G. (1952) An actomyosin-like substance from the plasmodium of a myxomycete. J. Cell. Comp. Physiol. 40, 127-156.
97. LOOR, Francis (1977) Structure and dynamics of the lymphocyte surface, in relation to differentiation, recognition and activation.

- Prog. Allergy 23, 1-153.
98. LOWRY, O.H., Rosenbrough, H.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) Protein measurements with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265.
99. MAGASANIK, B., Visher, E., Doniger, R., Elson, D., Chargaff, E. (1950) The separation and estimation of ribonucleotides in minutes quantities. J. Biol. Chem. 186, 37-50.
100. MANNHERZ, H.G., Barrington-Leigh, J., Goody, R.S., Leberman, R., Nowak, E. (1976) Interaction of actin and DNASE I in "Contractile systems in non-muscle tissues" (Perry S.V. Margueth A. & Adelstein R., S., eds) p. 345. North Holland publishing company, Amsterdam.
101. MANNHERZ, H.G., Barrington-Leigh, J., Leberman, R., Pfrang, H. (1975) A specific 1:1 G-actin:DNAase I complex formed by the action of DNAase I on F-actin. FEBS Letters 60, 34-38.
102. MANNHERZ, H.G., Brehme, H., Lamp, U. (1975) Depolymerisation of F-actin to G-actin and its repolymerisation in the presence of analogs of ATP. Eur. J. Biochem. 60, 109-116.
103. MANNHERZ, H.G., Goody, R.S. (1976) Proteins of contractile systems. Ann. Rev. of Biochem. 45, 427-465.
104. MANNHERZ, H.G., Goody, R.S., Konrad, M., Nowak, E. (1980) The interaction of bovine pancreatic deoxyribonuclease I and skeletal muscle actin. Eur. J. Biochem. 104, 367-379.

105. MANNHERZ, H.G., Kabsch, W, Leberman, R. (1977) Crystals of skeletal muscle actin: pancreatic DNAase I complex. *FEBS Letters*, 73 141-143.
106. MANNHERZ, H.G., Magener, M. (1979) Concanavalin A inhibits the interaction of snake venom 5'-Nucleotidase and actin. *FEBS Letters* 103 , 77-80.
107. MANNHERZ, H.G., Rohr, G. (1978) 5'Nucleotidase reverses the inhibitory action of actin on pancreatic deoxyribonuclease I. *FEBS* 95, 284-289.
108. MARKEY, F., Lindberg, U., Eriksson, L. (1978) Human platelets contain profilin, a potential regulator of actin polymerizability. *FEBS Letters* 88 , 75-79.
109. MINKOFF, L., Damadian, R. (1976) Biological ion exchanger resins X. The cytotonus hypothesis: biological contractility and the total regulation of cellular physiology through quantitative control of cell water. *Physiol. Chem. & Physics* 8, 349-387.
110. MOCKRIN, S.C., Korn, E.D. (1980) Acanthamoeba profilin interacts with G-Actin to increase the rate of exchange of actin-bound adenosine 5'-triphosphate. *Biochemistry* 19, 5359-5362.
111. MOOSEKER, M.S., Tilney, L.G. (1975) Organization of an actin filament-membrane complex. *J. Cell Biol.* 67, 725-743.
112. MORGAN, J.F., Morton, H.J., Parker, R.C. (1950) Nutrition of animal cells in tissue culture. I. Initial studies on a synthetic medium. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 73, 1-8.

113. NAKAMURA, I., Yamaguchi, M., Yanagisawa, T. (1979) Comparative studies on actins from various sources. *J. Biochem.* 85, 627-631.
114. NEU, H.C. (1967) The 5'-Nucleotidase of Escherichia coli. Purification and properties. *J. Biol. Chem.* 242, 3896-3904.
115. NEU, H.C. (1967) The 5'-Nucleotidase of Escherichia coli. II. Surface localization and purification of the Escherichia coli 5'-Nucleotidase inhibition. *J. Biol. Chem.* 242, 3905-3911.
116. NONOMURA, Y., Katayama, E., Ebashi, S. (1975) Effect of phosphate on the structure of the actin filaments. *J. Biochem.* 78, 1101-1104.
117. NUNNALLY, M.H., Powell, L.D., Craig, S.W. (1981) Reconstitution and regulation of actin gel-sol transformation with purified filamin and villin. *J. Biol. Chem.* 256, 2083-2086.
118. NYSTROM, L.-E., Lindberg I, Kendrick-Jones, J., Jakes, R. (1979) The amino acid sequence of profilin from calf spleen. *FEBS Letters* 101, 161-165.
119. O'FARRELL, Patrick H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250 , 4007-4021.
120. OGIEVETSKAYAN, M.M. (1977) Method for the determination of protein evolution rates by amino acid composition: evolution rate of actins. *Origins Life* 8 , 145-154.
121. PARISH, John Howard (1972) Principles and practice of experiments with nucleic acids. Edition London, Longman, 511 pages.

122. PEARSON, J.D., Carleton, J.S., Gordon, J.L. (1980) Metabolism of adenine nucleotides by ectoenzymes of vascular endothelial and smooth-muscle cells in culture. *Biochem. J.* 190, 421-429.
123. PEARSON, J.D. & Gordon, J.L. (1979) Vascular endothelial and smooth muscle cells in culture selectively release adenine nucleotides. *Nature* 281, 384-386.
124. PERRIE, W.T., Smillie, L.B., Perry, S.V. (1973) A phosphorylated light-chain component of myosin from skeletal muscle. *Biochem. J.* 135, 151-164.
125. PINDER, J.C., Bray, D., Gratzer, W.B. (1975) Actin polymerization induced by spectrin. *Nature* 258, 765-766.
126. PINDER, J.C., Bray, D., Gratzer, W.B. (1977) Control of interaction of spectrin and actin by phosphorylation. *Nature* 270, 752-754.
127. POLLARD, T.D. (1981) Cytoplasmic contractile proteins. *J. Cell Biol.* 91, 1565-1655.
128. POLLARD, T.D., Korn, E.D. (1973) Electron microscopic identification of actin associated with isolated amoeba plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 248, 448-450.
129. POLLARD, T.D., Weihing, R.R. (1974) Actin and myosin and cell movement. *CRC Critical Reviews in Biochemistry* 2, 1-65.

130. POLLENDER, J.-M., Gruda, J. (1979) Effect of phalloidin on actin proteolysis as measured by viscometry and fluorimetry. *Can. J. of Biochem.* 57, 49-55.
131. PRATJE, E., Heilmeyer, L.M.G. Jr. (1972) Phosphorylation of rabbit muscle troponin and actin by a 3', 5'-c-AMP-Dependent protein kinase. *FEBS Letters* 27, 89-93.
132. PROBST, E., Luscher, F. (1972) Studies on thrombosthenin A. The actin-like moiety of the contractile protein from blood platelets. I. Isolation characterization and evidence for two forms of thrombosthenin A. *Biochim. Biophys. Acta* 278, 577-584.
133. RADDING, C.M. (1978) Genetic recombination: strand transfer and mismatch repair. *Ann. Rev. Biochem.* 47, 847-880.
134. REICHSTEIN, E., Korn, E.D. (1979) Acanthamoeba profilin. *J. Biol. Chem.* 254-13, 6174-6179.
135. RIORDAN, J.R., Forstner, G.G. (1978) Glycoprotein membrane enzymes *Cur. Top. Membr. Transp.* 11, 145-231.
136. ROHR, G., Mannherz, H.G. (1979) The activation of actin:DNAase I complex with rat liver plasma membranes. (The possible role of 5'-nucleotidase) *FEBS Letters* 99, 351-356.
137. ROHR, G., Mannherz, H.G. (1978) Isolation and characterization of secretory actin . DNAase I complex from rat pancreatic juice. *Eur. J. Biochem.* 89, 151-157.

138. SCHLIWA, M. (1981) Proteins associated with cytoplasmic actin.
Cell 25, 587-590.
139. SHEETY, M.P., Painter, R.G., Singer, S.J. (1976) The contractile proteins of erythrocytes membranes and erythrocytes shape changes.
Cell Motility, cold spring harbor conferences on cell proliferation vol. # 3: Ed: Goldman, Pollard et Rosenbaum, pp. 651-664.
140. SHIZATA, Y., Shizata, H., Galbo, M., Davies, P., Pastan, I.
Purification of filamin, and Actin-Binding-Protein from Chicken Gizzard. *J. Biol. Chem.* 251, 6562-6567.
141. SLAVIK, M., Kartner, N., Riordan, J.R. (1977) Lectin-induced inhibition of plasma membrane 5'Nucleotidase: sensibility of purified enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 75, 342-349.
142. SPUDICH, J.A., Watt, S. (1971) The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. (Tropomyosin-troponin, actin, myosin)
J. Biol. Chem. 246, 4866-4871.
143. STEIN, Y., Widnell, C., Stein. O. (1968) Acylation of lysophosphatides by plasma membrane fractions of rat liver. *J. Cell Biol.* 39, 185-192.
144. STEINBERG, R.A. (1980) Actin nascent chains are substrates for cyclic AMP-dependant phosphorylation in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 910-914.
145. STRAUB, F.B. (1942) Actin. *Stud. Inst. Med. Chem. Univ. Szeged.* 2, 3-16.

146. STRAUB, F.B., Feuer, G. (1950) Adenosinetriphosphate the functional group of actin. *Biochim. Biophys. Acta* 4, 457-470.
147. STRZELECKA-GOLASZEWSKA, H. (1973) Effect of tightly bound divalent cation on the equilibria between G-actin-Bound and free ATP. *Eur. J. Biochem.* 37, 434-440.
148. STRZELECKA-GOLASZEWSKA, H., Drabikowski, W. (1967) Correlation between the binding of calcium and ATP by G-Actin. *Acta Biochem.* 14, 195-208.
149. STULL, J.T. (1980) Phosphorylation of contractile proteins in relation to muscle function. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 13, 39-93.
150. STULL, J.T., Brostrom, C.O., Krebs, E.G. (1972) Phosphorylation of the inhibitor component of troponin by phosphorylase kinase. *J. Biol. Chem.* 247, 5272-5274.
151. SUNDQVIST, K.-G., Ehrnst, A. (1976) Cytoskeletal control of surface membrane mobility. *Nature* 264, 226-231.
152. SWANSTON-FLATT, S.K., Carlsson, L., Gylfe, E. (1980) Actin filament formation in pancreatic β -Cells during glucose stimulation of insulin secretion. *FEBS Letters* 117, 299-302.
153. TASHIMA, Y., Yoshimura, N. (1975) Control of rabbit liver fructose-1, 6-diphosphatase activity by magnesium ions. *J. Biochem.* 78, 1161-1169.

154. THERIEN, H.-M., Gruda, J. (1983) Effect of liver plasma membranes on G-Actin. II. Fate of actin-bound nucleotide. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 61, 93-98.
155. TILNEY, L. G. (1976) The polymerization of actin II. How nonfilamentous actin becomes nonrandomly distributed in sperm: evidence for the association of this actin with membranes. *J. Cell Biol.* 69, 51-72.
156. TILNEY, L.G. (1979) Actin, motility and membrane. Membrane transduction mechanism, (R.A. Cone et J.E. Dowling, edit.) Raven Press, N.Y., p. 163-186.
157. TOBACMAN, L.S., Korn, E.D. (1982) The regulation of actin polymerization and the inhibition of monomeric actin ATPase activity by Acanthamoeba profilin. *J. Biol. Chem.* 257, 4166-4170.
158. TRAMS, E.G., Lauter, C.J. (1974) On the sidedness of plasma membrane enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* 345, 18-197.
159. VAHEY, M., Titus, M., Trautwein, R., Scordilis, S. (1982) Tomato actin and myosin: contractile proteins from a higher land plant. *Cell Motility* 2, 131-148.
160. VANDEKERCKHOVE, J., Weber, K. (1978) Mammalian cytoplasmic actins are the products of at least two genes and differ in primary structure in at least 25 identified positions from skeletal muscle actins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 1106-1110.

161. VANDEKERCKHOVE, J., Weber, K. (1978) 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.*, 783-802.
162. VANDERKERKHOVE, J., Weber, K. (1981) Actin typing on total cellular extracts. (A highly sensitive protein-chemical procedure able to distinguish different actins.) *Eur. J. Biochem.* 113, 595-603.
163. WALLACH, D., Davies, P., Bechtel, P., Willingham., M., Pastan, I. (1978) Cyclic AMP-Dependant phosphorylation of the actin-binding protein filamin. *Adv. in Cyclic Nucleotide Res.* 9, 371-379.
164. WALLACH, D., Davies, P.J.A., Pastan I. (1978) Purification of mammalian filamin. *J. Biol. Chem.* 253 3328-3335.
165. WALSH, M.P., Hinkins, S., Hartshore, D.J. (1981) Phosphorylation of smooth muscle actin by the catalytic subunit of the cAMP-dependant protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Com* 102, 149-157.
166. WANG, K. (1977) Filamin, a new high-molecular-weight protein found in smooth muscle and non-muscle cells. Purification and properties of chicken gizzard filamin. *Biochemistry* 16 , 1857-1865.
167. WANG, K. , Ash J. F., Singer, S.J. (1975) Filamin, a new high-molecular-weight protein found in smooth muscle and non-muscle cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72 , 4483-4486.
168. WISHER, M.H., Evans, W.H. (1975) Fonctionnal polarity of the rat hepatocytes surface membrane: isolation and characterization of

- plasma-membrane subfractions from the blood-sinusoidal, bile-canalicular and contiguous surfaces of the hepatocyte.
Biochem. J. 146, 375-388.
169. WHALEN, R.G., Butler-Browne, G.S., Gros, F. (1976) Protein synthesis and actin heterogeneity in calf muscle cells in culture.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 2018-2022.
170. YIN, H.L., Hartwig, J.H., Maruyama, K., Stossel, T.P. (1981) Ca^{2+} control of actin filaments length. Effects of macrophage gelsolin on actin polymerization. J. Biol. Chem. 256, 9693-9697.
171. YIN, H.L., Stossel, T.P. (1979) Control of cytoplasmic actin gel-sol transformation by gelsolin, a calcium dependant regulatory protein. Nature 281, 583-586.
172. ZECHKEL, K. (1980) Dissociation of the DNAase I · Actin complex by formamide. Eur. J. Biochem. 110, 337-341.