

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ AU

DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN SCIENCE DE L'ENVIRONNEMENT

PAR

ANDRÉE TURCOTTE

SEPARATION DES VIROTOXINES DU CHAMPIGNON AMANITA VIROSA
ET ETUDE DE LEURS INTERACTIONS SUR L'ACTINE IN VITRO

MAI 1982

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

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

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

Résumé:★

Le champignon toxique *Amanita virosa* que l'on retrouve en abondance dans le Parc de la Mauricie contient deux groupes de peptides: les PHALLOTOXINES et les VIROTOXINES. Le premier groupe est bien connu, mais on ne sait encore presque rien des virotoxines.

Les travaux effectués sur les phallotoxines par l'équipe de Wieland en Allemagne, montrent que la principale toxine de ce groupe, la phalloïdine, est un heptapeptide bicyclique qui réagit spécifiquement avec l'actine. L'actine est une protéine contractile impliquée dans le mécanisme de la contraction musculaire qui joue aussi un rôle dans la motilité des cellules non musculaires. L'actine peut être retrouvée sous deux formes: une dite globulaire (G-actine) et l'autre filamenteuse (F-actine). La phalloïdine favorise la polymérisation irréversible de l'actine G en actine F et stabilise cette dernière contre certains agents dénaturants ou déstabilisants tels: l'iodure de potassium, la DNase I, les protéases, la cytochalasine B, la chaleur, l'acide osmique, etc.

Le but de cette thèse est d'étudier plus en détail les propriétés des virotoxines et de comparer leurs activités respectives sur l'actine du muscle de lapin.

Dans un premier temps, nous avons travaillé avec des extraits bruts de champignons, appelés virotoxines A et virotoxines B, puis nous avons réussi à séparer par chromatographie en phase liquide préparative les virotoxines en leurs 5 fractions, soit: l' [Ala¹] -viroïdine, la viroïisine, la désoxoviroïisine, la viroidine et la désoxoviroïdine.

Une étude systématique de l'interaction de ces peptides avec l'actine a ensuite été entreprise. Nos résultats montrent par spectrophotométrie différentielle, que les 5 virotoxines interagissent avec la F-actine. L'effet de celles-ci sur

l'accélération de la polymérisation de l'actine a été mis en évidence par viscosimétrie et diffusion de lumière. Nous avons aussi montré, par viscosimétrie et spectrophotométrie, que ces peptides stabilisaient les filaments d'actine contre l'effet de l'iodure de potassium, de la chaleur, des protéases, de la DNase I, de la cytochalasine B et de l'acide osmique.

En conclusion, les virotoxines ont les mêmes effets que la phalloïdine sur l'actine *in vivo*. D'autre part, nous avons montré que les 5 virotoxines sont toutes aussi actives sur l'actine, malgré la variabilité de leurs chaînes latérales, sauf en ce qui concerne la protection contre la dégradation par l'acide osmique, où la viroïsine et la viroïdine préservent beaucoup plus l'actine que leurs homologues désoso. Cependant, la structure même de ces peptides suggère que le mécanisme d'interaction entre les virotoxines et l'actine est différent de celui de la phalloïdine.

Cette recherche revêt une double importance. Elle permet de mieux caractériser ce champignon mortel qui semble être une espèce unique. D'autre part, les virotoxines, par leur action spécifique sur l'actine, sont un outil pour étudier le rôle de l'actine.

Andrée Tuccillo
Signature du candidat

Date:

9-07-1982
Signature du co-auteur (s'il y a lieu)

Date:

C. G. G. G. G.
Signature du directeur de recherche

Date:

Signature du co-directeur (s'il y a lieu)

Date:

" Les incertitudes de la science
ne sont pas moins relatives que
ses certitudes "

Jean Rostand

PREFACE

Les champignons toxiques Amanita phalloïdes, Amanita Verna et Amanita virosa contiennent deux familles de composés toxiques: les amatoxines et les phallotoxines, dont la phalloïdine est le constituant le plus connu. L'Amanita virosa contient en plus un nouveau groupe de peptides identifiés récemment: les virotoxines, qui sont l'objet de ce projet de recherche.

Depuis longtemps les phallotoxines ont attiré l'attention des biochimistes à cause de leur grande affinité pour l'actine, une protéine contractile impliquée dans le mécanisme de la contraction musculaire et dans la motilité des cellules non-musculaires. En effet, les travaux effectués par l'équipe de Wieland en Allemagne montrent que la phalloïdine réagit spécifiquement avec l'actine. Elle favorise la polymérisation irréversible de l'actine G en actine F et stabilise cette dernière contre certains agents dénaturants ou déstabilisants tels: l'iodure de potassium, la DNase I, les protéases, la cytochalasine B, la chaleur, l'acide osmique, etc... La diminution d'actine monomérique observée dans les foies d'animaux empoisonnés à la phalloïdine entraîne donc une série de perturbations au niveau physiologique.

La plus grande partie du travail analytique effectué chez les peptides toxiques de l'espèce Amanita, sauf dans le cas des virotoxines,

fut entreprise par une équipe d'Allemagne avec le champignon Amanita phalloïdes et ceci pour deux raisons. D'abord, aucune autre amanite ne produit une telle variété de composés biologiquement actifs. La seconde raison est la plus grande disponibilité de cette espèce en Europe de l'ouest. Ceci explique pourquoi l'étude d'autres amanites moins fréquentes comme l'Amanita virosa ne fut entreprise que récemment par l'équipe de Wieland.

Notre intérêt pour les virotoxines est dû au fait que ces toxines n'ont été signalées que chez le champignon Amanita virosa, que l'on retrouve en abondance dans le Parc de la Mauricie. Puisque ce champignon est toxique, nous considérons qu'une étude des propriétés des virotoxines pourrait apporter des informations supplémentaires sur le mécanisme d'empoisonnement par les amanites.

Le premier chapitre appelé "Introduction", traite principalement des connaissances actuelles sur la phalloïdine et décrit les raisons qui nous ont amenés à entreprendre la présente étude. Puis viennent les sections "Matériel et méthodes" et "Résultats". Le quatrième chapitre discute des méthodes utilisées et des résultats que nous avons obtenus, parallèlement à d'autres études provenant des laboratoires de Wieland et qui viennent compléter nos résultats. Nous terminons avec la dernière partie, la conclusion finale de ce travail.

Soulignons que ce travail a déjà fait l'objet de deux communications à l'ACFAS en 1981, d'un article qui est sous presse dans la revue Canadienne de biologie et de deux autres dont la rédaction est en cours.

REMERCIEMENTS

Je ne saurais présenter ce rapport sans avoir adressé mes remerciements aux personnes qui m'ont aidé à réaliser ce projet de recherche.

Tout d'abord je tiens à remercier particulièrement mon directeur de thèse, le Dr. Claude Gicquaud pour son enseignement et sa disponibilité remarquable, le Dr. Julian Gruda pour sa collaboration et ses nombreux conseils ainsi que Mme Diane Bégin pour son excellente aide technique.

Je remercie également le Dr. Beatriz Tuchweber, le Dr. Serge St-Pierre ainsi que Marthe Gendreau pour leur précieuse collaboration.

Je tiens aussi à remercier mon mari, Jean-Marc Pollender pour son appui et ses encouragements.

TABLE DES MATIERES

	<u>Page</u>
PREFACE	iii
REMERCIEMENTS	v
TABLE DES MATIERES	vi
LISTE DES TABLEAUX	xi
LISTE DES FIGURES	xii
 CHAPITRE 1 - Introduction	 1
1.0 Description générale des amanites	2
2.0 Symptômatologie de l'intoxication par les amanites ..	3
3.0 L' <u>Amanita virosa</u>	4
3.1 Morphologie de l' <u>Amanita virosa</u>	4
3.2 Description des toxines	5
3.2.1 La phalloïdine	5
3.2.1.1 Propriétés de la phalloïdine	5
3.2.1.2 Effets de la phalloïdine sur l'actine <u>in vitro</u> ..	5
(A) L'actine	7
(B) Mode d'action de la phalloïdine au niveau	
moléculaire	8
3.2.1.3 Effets <u>in vivo</u> de la phalloïdine	13
3.2.1.4 Effet de la phalloïdine sur d'autres cellules	
que les hépatocytes	16

	<u>Page</u>
3.2.2 Virotoxines	17
4.0 Historique du projet de recherche	18
Chapitre 2 – Matériel et méthodes	20
1.0 Préparation de l'actine	21
2.0 Extraction et purification de la phalloïdine et des virotoxines à partir du champignon <u>Amanita</u> <u>virosa</u>	21
2.1 Préparation de l'extrait de toxines	21
2.2 Purification sur Amberlite XAD-4	22
2.3 Chromatographie de l'extrait brut sur Séphadex LH 20	23
2.4 Séparation des virotoxines en fractions A et B	23
2.5 Séparation des virotoxines par chromatographie sur HPLC	26
3.0 Etude de l'interaction virotoxines-F-actine par spectroscopie différentielle	26
4.0 Mesure de l'influence des virotoxines sur la vitesse de polymérisation de l'actine	28
5.0 Antagonisme des virotoxines sur la dépolymérisation de la F-actine par le KI 0,6M	28
6.0 Déstabilisation de la F-actine par la cytochalasine B	29
7.0 Mesure de la dénaturation thermique de l'actine	29
7.1 Mesure de l'effet des virotoxines A et B	29
7.2 Mesure de l'effet des virotoxines pures	30

	<u>Page</u>
8.0 Dépolymérisation de la F-actine par la DNase I	30
9.0 Protéolyse de la F-actine par la trypsine	30
10.0 Destruction de la F-actine par l'acide osmique	31
Chapitre 3 - Résultats	32
1.0 Effet des fractions A et B des virotoxines sur l'actine	33
1.1 Influence des fractions A et B des virotoxines sur la vitesse de polymérisation de l'actine	33
1.2 Protection de la F-actine par les fractions A et B des virotoxines contre l'effet dépolymérisant de l'iodure de potassium 0,6M	36
1.3 Effet des virotoxines sur la déstabilisation de la F-actine par la cytochalasine B	38
1.4 Protection contre la dénaturation thermique de l'actine par les fractions A et B des virotoxines ..	38
1.5 Effet des fractions A et B des virotoxines sur la dépolymérisation de la F-actine induite par la DNase I	41
2.0 Etude des virotoxines purifiées	48
2.1 Séparation des virotoxines	48
2.2 Spectres d'absorption U.V. des virotoxines	48
2.3 Effets des virotoxines purifiées sur l'actine <u>in vitro</u>	49
2.3.1 Interaction F-actine-virotoxines	49
2.3.2 Protection de la F-actine, par les virotoxines purifiées, contre la dénaturation thermique	49

	<u>Page</u>
2.3.3 Influence des virotoxines séparées sur la dépolymérisation de la F-actine par l'iodure de potassium 0,6M	51
2.3.4 Inhibition par les virotoxines séparées de l'action de la cytochalasine B sur la F-actine	54
2.3.5 Antagonisme des virotoxines séparées sur l'action dépolymérisante de la DNase I	56
2.3.6 Effet des virotoxines séparées sur la protéolyse de la F-actine par la trypsine	56
2.3.7 Protection de la F-actine par les virotoxines séparées contre les effets destructeurs de l'acide osmique	58
2.3.8 Mesure de l'influence des virotoxines séparées sur la vitesse de polymérisation de l'actine	63
3.0 Conclusion générale des résultats	65
Chapitre 4 - Discussion	67
1.0 Structure des virotoxines	68
2.0 Activité des virotoxines	74
2.1 Pureté des fractions	74
2.2 Activité des virotoxines pures sur l'actine <u>in vitro</u>	74
2.2.1 Protection des virotoxines sur la F-actine contre la destruction par l'acide osmique	75
2.2.2 Variations de viscosité initiale	78
3.0 Toxicité des virotoxines	79

	<u>Page</u>
4.0 Mécanisme de toxicité des virotoxines	80
5.0 Mode d'interaction des virotoxines avec l'actine au niveau moléculaire	81
6.0 Biosynthèse ou origine des virotoxines pour le champignon <u>Amanita virosa</u>	83
7.0 Caractérisation du champignon <u>Amanita virosa</u>	85
CONCLUSION	86
BIBLIOGRAPHIE	89

LISTE DES TABLEAUX

	<u>Page</u>
TABLEAU 1: Effet des fractions A et B des virotoxines sur la dépolymérisation de la F-actine provoquée par KI	37
TABLEAU 2: Influence des fractions A et B des virotoxines sur la déstabilisation de la F-actine par la cytochalasine B	39
TABLEAU 3: Pourcentage relatif de virotoxines pures obtenues suite à une chromatographie par HPLC à partir d'un mélange A et B de virotoxines	45
TABLEAU 4: Coefficients d'extinction molaire pour chaque virotoxine	47
TABLEAU 5: Influence des virotoxines séparées sur la dépolymé- risation de la F-actine par le KI.	53
TABLEAU 6: Effet des virotoxines séparées sur la déstabilisation de la F-actine par la cytochalasine B	55
TABLEAU 7: Variabilité structurale des chaînes latérales des vi- rotoxines	72

LISTE DES FIGURES

	<u>Page</u>
FIGURE 1: Structure de la phalloïdine (d'après Wieland)	6
FIGURE 2: Profil d'élution d'un extrait méthanolique du champi- gnon <u>Amanita virosa</u>	24
FIGURE 3: Résolution des virotoxines en fractions A et B	25
FIGURE 4: Accélération de la vitesse de polymérisation de l'actine par les fractions A et B des virotoxines	
(A) Diffusion de lumière	34
(B) Viscosimétrie	35
FIGURE 5: Effet des fractions A et B des virotoxines sur la dénaturation thermique de la F-actine	40
FIGURE 6: Effet des fractions A et B des virotoxines sur la dépolymérisation de la F-actine induite par la DNase I	42
FIGURE 7: Chromatogramme d'un mélange de virotoxines obtenu par HPLC	44
FIGURE 8: Spectre d'absorption U.V. de la virotoxine 5	46

	<u>Page</u>
FIGURE 9: Spectre différentiel U.V. de F-actine-virotoxine 3 et F-actine-phalloïdine	50
FIGURE 10: Protection de la F-actine par les virotoxines séparées contre la dénaturation thermique	52
FIGURE 11: Influence des virotoxines séparées sur la dépolymérisa- tion de la F-actine induite par la DNase I	57
FIGURE 12: Action des virotoxines séparées sur la protéolyse de la F-actine par la trypsine	59
FIGURE 13: Protection des virotoxines séparées sur la F-actine, contre l'effet destructeur de l'acide osmique	
(A) par viscosimétrie	61
(B) par spectrophotométrie	62
FIGURE 14: Accélération de la vitesse de polymérisation de l'actine par les virotoxines séparées	64
FIGURE 15: Chromatogramme d'un mélange de virotoxines	
(A) obtenu par Faulstich et coll. (1980)	69
(B) obtenu par nous	69
FIGURE 16: Formule générale des virotoxines	71
FIGURE 17: Spectres d'absorption U.V. de la viroïsine	
(A) obtenu par Faulstich et coll. (1980)	73
(B) obtenu par nous	73

Page

FIGURE 18: Structure de la phalloïdine comparée à 1' [ala ¹]-	
viroïdine	82
FIGURE 19: Séquences de réactions métaboliques pouvant convertir	
les phallotoxines en virotoxines (Faulstich et	
coll., 1981)	84

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.0 DESCRIPTION GENERALE DES AMANITES

Le genre Amanita appartient à la famille des Agarics, qui représente la plus grande famille des champignons charnus (120). Au Québec, on rencontre sept espèces: l'Amanite des Césars, considérée par plusieurs comme le meilleur des champignons sauvages; l'Amanite citrine, amère et sans valeur culinaire; l'Amanite porphyre, comestible mais de très mauvais goût; l'Amanite rougissante, comestible, qui nécessite une cuisson prolongée; l'Amanite tue-mouche, vénéneuse et hallucinogène; l'Amanite vaginée, bon comestible s'il est consommé cuit et finalement l'Amanite vireuse, qui est mortelle (99). L'Amanite vireuse aussi appelée "Ange de la mort" se retrouve surtout au sud du Québec où il est très fréquent dans les bois feuillus et les forêts mixtes. Il affectionne particulièrement les terrains siliceux, sablonneux et humides (3, 5, 69). Deux autres Amanites peuvent aussi causer la mort mais n'ont pas été signalées dans nos régions jusqu'à maintenant. Il s'agit de l'Amanite phalloïde et de l'Amanite printanière (124).

2.0 SYMPTOMATOLOGIE DE L'INTOXICATION PAR LES AMANITES CHEZ L'HOMME

La première caractéristique de cette intoxication est l'apparition tardive des symptômes. En effet, les premiers malaises apparaissent en moyenne 10 à 12 heures après l'ingestion du champignon et peuvent même ne survenir qu'après 48 heures. Au début, les principaux malaises se manifestent par des douleurs gastro-intestinales avec concomitance de vomissements incessants et de diarrhées, responsables d'une déshydratation grave. Si des soins médicaux ne sont pas administrés à cette étape, l'individu peut mourir durant cette phase de l'empoisonnement (5).

La seconde caractéristique de cette intoxication est une période d'accalmie relative succédant aux premiers accès et qui peut donner une fausse impression de rétablissement complet. Cette période peut durer de 10 à 24 heures et même davantage, mais elle se termine par la récurrence des mêmes symptômes. Ces crises successives sont entrecoupées par des apaisements de plus en plus courts. Puis s'ajoutent l'atteinte hépatique, l'atteinte rénale, la léthargie, parfois le délire et enfin le coma (5).

Après 5 à 8 jours généralement, la personne intoxiquée s'éteint graduellement en montrant d'autres signes cliniques comme des convulsions. Même lorsqu'il y a survie, le malade reste dans un état de faiblesse extrême pendant des semaines et peut souffrir de séquelles pénibles comme l'insuffisance rénale chronique. Notons que le taux de mortalité, très élevé, atteint 80% (5, 125).

3.0 L'AMANITA VIROSA

3.1 Morphologie de l'Amanita virosa

Le chapeau est lisse et d'un blanc très pur. On peut facilement le distinguer des autres espèces blanches, car il devient jaune d'or sous l'action de la potasse. Chez le champignon jeune, le chapeau se présente d'abord sous forme de cloche, puis il devient convexe et finalement étalé (4 à 12 cm). Il est brillant et satiné par temps sec, mais visqueux lorsque la température est fraîche et humide. Sa marge se montre lisse ou ondulée, frangée floconneuse, souvent obliquement prolongée et descendante d'un côté (3, 5, 59, 100).

Les lamelles sont libres, plus larges vers le pourtour que vers le pied, serrées, arrondies aux deux extrémités et blanches à arête floconneuse (3, 5, 59, 100).

Le pied est élancé, raide, ferme, charnu et fibreux, cylindrique et nettement marqué de peluches. Il s'amincit légèrement vers le sommet et peut atteindre une longueur de 7 à 9 cm. Il est terminé par un bulbe globuleux ou ovoïde, engainé d'une volve membraneuse, blanchâtre, épaisse et déchirée qui souvent se colle sur le pied (3, 5, 59, 100).

Le pied possède aussi un anneau situé près du sommet sous les lamelles. L'anneau est blanc, membraneux, large et fragile et peut disparaître avec l'âge. Quand le champignon est jeune, l'anneau est suspendu à la marge du chapeau, mais avec l'âge, il se rabat sur le pied (3, 5, 59, 100). Les spores sont blanches, lisses, rondes ou presque rondes. Leur diamètre est de 6 à 10 μm .

3.2 Description des toxines

Le champignon Amanita virosa contient deux principaux groupes de toxines: la phalloïdine, bien connue, et les virotoxines qui font l'objet de ce travail.

3.2.1 La phalloïdine

La plus grande partie du travail analytique fait par d'autres auteurs sur la phalloïdine a été entreprise sur la phalloïdine provenant du champignon Amanita phalloïdes. Cette toxine a été isolée de l'Amanita phalloïdes en 1955 par Wieland (145). La présence de la phalloïdine chez l'Amanita virosa fut démontrée par Faulstich en 1974 (32) et confirmée par Malak en 1976 (83). Contrairement à l'Amanita virosa qui ne contient qu'une seule phallotoxine: la phalloïdine, l'Amanita phalloïdes comprend plusieurs autres phallotoxines (21, 23, 31, 92, 94).

3.2.1.1 Propriétés de la phalloïdine

La phalloïdine est un heptapeptide bicyclique très stable, de poids moléculaire d'environ 800 daltons (96, 118, 126). Sa structure est représentée sur la figure 1. Elle est incolore, principalement cristalline et soluble dans l'eau, le méthanol et autres solvants organiques polaires (24).

3.2.1.2 Effets de la phalloïdine sur l'actine in vitro

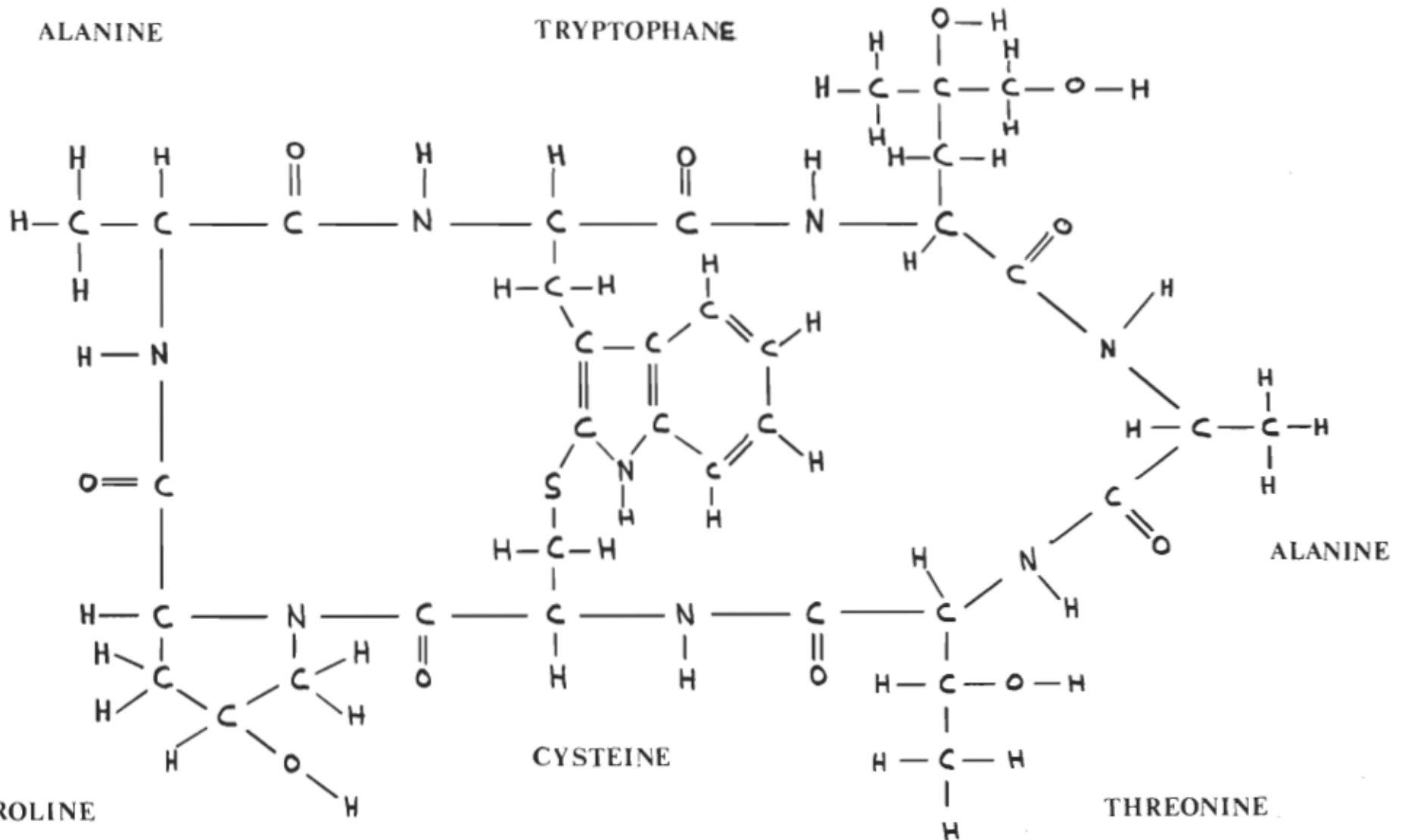
Le mécanisme de toxicité de la phalloïdine est relié à sa grande affinité pour l'actine (77).

FIGURE 1. Structure de la phalloïdine (d'après Wieland).

PHALLOIDINE

ALANINE

TRYPTOPHANE



(A) L'actine

L'actine, découverte par Straub en 1942 est une protéine faisant partie du complexe actomyosine et qui constitue le filament fin du muscle strié (71). C'est donc une protéine contractile impliquée dans le mécanisme de la contraction musculaire (75). Cependant, elle joue aussi un rôle dans la motilité des cellules non-musculaires et peut participer à l'élaboration du cytosquelette (102).

L'actine peut se lier à la myosine, ainsi qu'à d'autres protéines complémentaires (14). Parmi ces protéines se retrouvent entre autres la tropomyosine, la troponine, l'alpha-actinine et d'autres protéines liant l'actine. Ajoutons que l'actine musculaire et non-musculaire possèdent des propriétés physiques, chimiques et structurelles très semblables.

L'actine existe sous deux formes: une dite globulaire (actine monomérique ou actine G) et l'autre filamenteuse (actine polymérisée ou actine F). La principale propriété de cette protéine est donc la polymérisation (20, 64).

L'actine G est constituée d'une seule chaîne polypeptidique (Taylor 1972; Weber et Murray 1973) formant une masse globulaire de 5,5 nm de diamètre (Bendall 1970; Huxley 1969; Laki 1971a; Perry 1967). Son poids moléculaire est d'environ 45 000 daltons (Elzinga et al. 1973; Rees et Young 1967). Chaque molécule d'actine lie un ion Ca^{2+} , ainsi qu'une molécule d'ATP ou d'ADP avec grande affinité (Gergely 1977), nécessaire pour sa polymérisation en actine F. Le filament d'actine est formé de deux chaînes de monomères affectant une disposition quasi vermiculaire, pouvant atteindre une longueur de 4 à 5 microns, un diamètre moyen entre

6 et 8 nm et un tour d'hélice d'environ 74 nm. (Hanson et Lowy 1963; Laki 1971a; Rozsa et al. 1949). Les deux formes d'actine sont représentées dans le schéma de la page suivante.

(B) Mode d'action de la phalloïdine au niveau moléculaire:

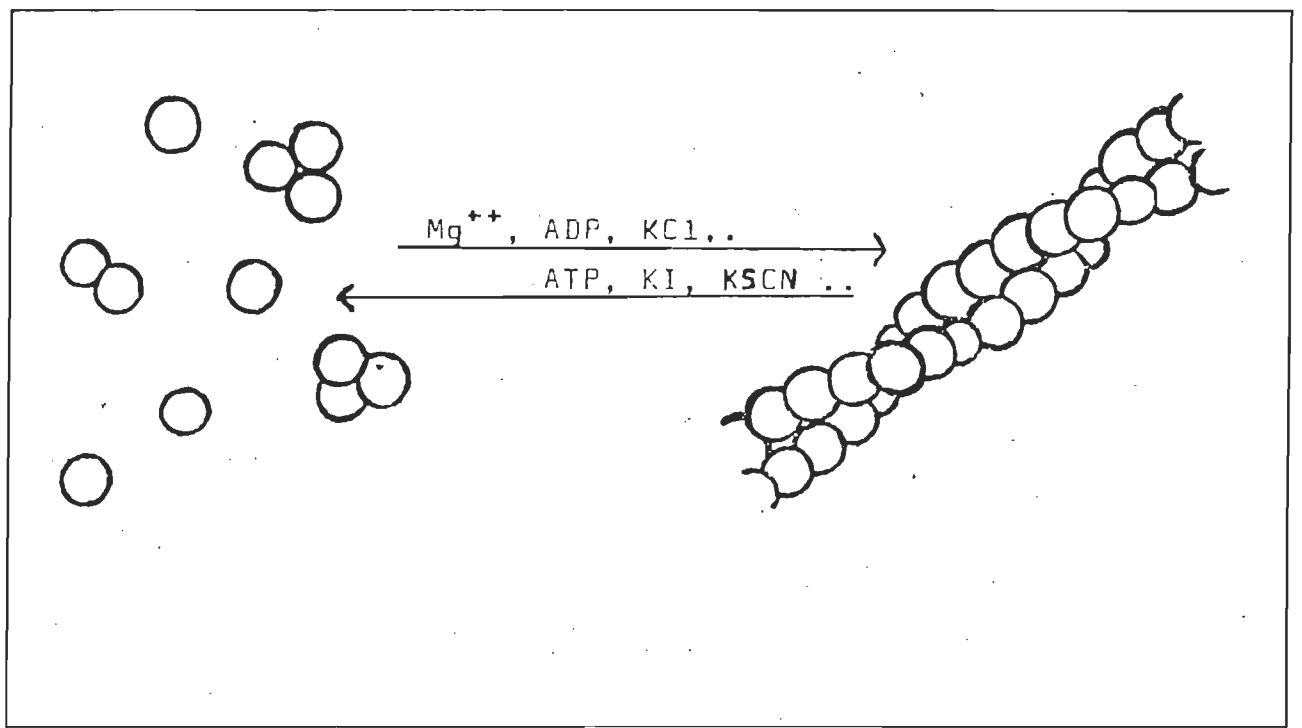
- Identification de l'actine comme protéine cible de la phalloïdine.

L'interaction de la phalloïdine avec l'actine a été mise en évidence en 1972 par Govindan et ses collaborateurs (51). Ceux-ci observèrent, par microscopie électronique, que des membranes plasmiques isolées de foies de rats empoisonnés par la phalloïdine, contenaient des paquets de microfilaments associés avec les fragments de membranes. Or, ces structures étaient rarement visibles dans les préparations de membranes des animaux contrôles.

Bien que ces filaments se comportaient différemment de l'actine par leur résistance au traitement avec du KI 0.6M, la réaction de ces filaments avec la méromyosine lourde, prouve qu'ils étaient constitués d'actine (77,137). Ces expériences furent les premières à démontrer que la phalloïdine réagissait avec l'actine des cellules de foies de rats.

La preuve finale de cette interaction fut fournie avec l'actine musculaire de lapin, qui, en présence de phalloïdine, devenait résistante contre les ions chaotropiques (56, 77). Plus tard, il fut montré qu'une telle stabilisation représentait l'effet spécifique de la toxine sur l'actine. L'actine du muscle et celle des cellules du foie se comportant de façon très similaire avec la phalloïdine, il fut donc décidé d'étudier l'interaction toxine-actine avec l'actine musculaire, qui est plus facile à préparer (40).

Conditions influençant le système F-actine/G-actine.



- Mise en évidence de l'interaction phalloïdine-F-actine.

Wieland et coll. (142, 147) ont montré par spectroscopie différentielle que la phalloïdine se liait à l'actine polymérique ou oligomérique, formant un complexe 1:1 avec les monomères des filaments.

Leurs résultats indiquent que le spectre U.V. est changé à 295 et 305 nm par l'interaction de la toxine avec l'actine. Ces auteurs suggèrent que le changement de spectre à 305 nm provient de la partie indolylthioéther de la toxine qui participe à l'interaction avec la protéine. De plus, des expériences contrôles ont montré que la phalloïdine n'interagit pas avec d'autres protéines comme l'albumine, fournissant ainsi la preuve que l'interaction entre la phalloïdine et l'actine est spécifique. L'actine ainsi complexée est beaucoup plus stable contre divers traitements physiques ou chimiques que l'actine filamenteuse normale. Parmi les agents qui normalement dépolymérisent ou détruisent la F-actine, citons les suivants:

Iodure de potassium 0,6 M:

L'addition de KI 0,6M dépolymérise instantanément la F-actine. Cette dépolymérisation se traduit par une chute de viscosité importante d'une solution d'actine (77). Cependant, l'addition de KI 0,6M à de la F-actine en présence de phalloïdine dépolymérise peu la F-actine, ce qui montre que la toxine protège l'actine contre l'action de l'ion chaotropique (16, 73, 77). De plus, la phalloïdine permet quand même une lente polymérisation de la G-actine dans le KI 0,6M, réaction qui n'est pas observée en absence de la toxine.

DNase I:

La DNase I est une protéine qui se lie à la F-actine en formant un complexe 1:1 avec la G-actine (85, 86). Ceci a pour effet d'abaisser la viscosité spécifique de la F-actine.

Il a été démontré que la phalloïdine empêchait la formation du complexe G-actine-DNase I, maintenant ainsi la forme filamenteuse de l'actine (111). Plus récemment, les résultats d'expériences faites sur des complexes actine-DNase I cristallisés suggèrent que la phalloïdine détruit probablement le complexe actine-DNase I en formant un autre complexe plus fort avec le polymère d'actine (68,74,84).

Cytochalasine B:

La cytochalasine B est un métabolite du champignon "Helminthosporium dematioides". Son action sur l'actine est complexe: D'abord, il a été montré par Dancker et ses collaborateurs (15) que la cytochalasine B favorisait la polymérisation de l'actine. En ajoutant du $MgCl_2$ à de la G-actine préalablement incubée avec de la cytochalasine, ces auteurs observaient une augmentation de la vitesse de polymérisation.

D'autre part, il a aussi été démontré que ce métabolite pouvait provoquer une rupture réversible du filament d'actine, affaiblissant ainsi la structure de ce dernier et inhibant les fonctions cellulaires liées aux filaments d'actine (Wessels 1971; Spudich 1972; Allison 1973; Brenner et coll., 1979; Low et coll., 1979).

La rupture du filament d'actine par la cytochalasine B se traduit par une réduction de la viscosité spécifique de la solution d'actine (76, 113). Cet effet peut être antagonisé par la phalloïdine (138).

La cytochalasine B empêcherait aussi la formation de microfilaments dans les préparations de membranes cellulaires de foies de rats (36, 81). Selon Low et Dancker (76), la cytochalasine n'affecterait les filaments que si ceux-ci ne sont pas stabilisés par du KCl 0,1M.

D'autres agents tels que les ultrasons et un pH acide peuvent également causer des ruptures sur les filaments d'actine (6, 79). Selon Dancker et coll. (16), les filaments d'actine en présence de phalloïdine deviennent plus résistants aux ultrasons. Cette toxine empêche également la dénaturation d'actine causée par des pH extrêmes.

- Dénaturation thermique

De Vries et coll., (18) ont montré que l'actine chauffée pendant 3 minutes à 70°C subit une dénaturation. Par contre, la présence de phalloïdine réduit fortement cette dénaturation.

- Protéolyse

L'effet de la phalloïdine sur la protéolyse de l'actine a été étudié avec diverses protéases. Ainsi, Pollender et Gruda (46, 98) ont démontré que la toxine exerce une protection marquée sur la F-actine contre l'action de la trypsine et de la pronase. De même, les études de De Vries et Wieland (17) révèlent une protection de la phalloïdine sur l'actine contre la digestion par la subtilisine.

- Acide osmique

L'acide osmique est un composé très utilisé comme fixateur en microscopie électronique (101). Son usage soulève cependant quelques problèmes,

notamment lorsqu'il s'agit de visualiser l'actine dans les cellules. En effet, il a été montré que le tétroxyde d'osmium détruisait la F-actine in vitro, par oxydation des cinq résidus cystéine, de 15 des 16 méthionines et de 2 ou 3 lysines. De plus, la fixation des cellules par l'acide osmique entraîne une solubilisation et une extraction des protéines cellulaires et en particulier de l'actine (88, 89). Par contre, Gicquaud et ses collaborateurs (47) ont montré que la phalloïdine protégeait l'actine in vitro contre l'attaque par l'acide osmique.

- Polymérisation de la G-actine:

L'actine G, en présence d'ions Ca^{++} , Mg^{++} ou K^{+} ainsi que d'ADP ou d'ATP, polymérise en actine F. Dancker et coll. (16) ont démontré que la vitesse de polymérisation est fortement accélérée en présence de phalloïdine, dû au déplacement de l'équilibre G-actine \rightarrow F-actine. L'efficacité maximum de la phalloïdine sur l'actine est atteinte à concentration équimolaire.

3.2.1.3 Effets in vivo de la phalloïdine

La spécificité de la phalloïdine pour le foie des mammifères est très élevée (148). Ainsi, chez le rat, deux heures après l'administration de phalloïdine marquée, 57% de la radioactivité était retrouvée dans le foie, comparativement à 9.4% dans le muscle squelettique et 2.7% dans les reins (112). La spécificité de la phalloïdine pour cet organe est due à l'absorption rapide de la toxine par les hépatocytes in situ. Cette spécificité s'explique par le fait que seuls les hépatocytes possèdent une perméase capable de faire pénétrer la phalloïdine.

Du point de vue morphologique, une des altérations les plus importantes provoquée par la phalloïdine est l'augmentation de volume du foie (jusqu'à 2 ou 3 fois son volume normal), qui devient de couleur rouge-noir (122, 135, 145). Ces changements sont dûs à une accumulation excessive d'érythrocytes dans le foie.

Jahn et Lengsfeld (63) suggèrent que la phalloïdine interagit avec l'actine liée aux membranes des hépatocytes, ce qui induit un changement dans cette membrane. La membrane plasmique semble alors se relaxer et s'invagine, permettant la formation de vacuoles, ainsi que la pénétration des érythrocytes et du liquide extracellulaire. Ceci provoque un choc hémodynamique. La formation de ces vacuoles représenterait une des premières étapes conduisant aux symptômes de l'intoxication dans les foies perfusés de rats.

Les hépatocytes isolés sont aussi sensibles à l'action de la phalloïdine (29). Cependant, les cellules développent des protrusions au lieu des vacuoles (130). Il est probable que ces protrusions soient formées à la suite des mêmes changements structuraux dans la membrane plasmique qui, sous la pression de perfusion, produit les vacuoles dans les hépatocytes in vivo (50).

Comme conséquence de la vacuolisation, il y a souvent une rupture des membranes plasmiques, qui peut être observée par microscopie électronique (131). Faulstich (24) a montré que les enzymes cytoplasmiques, lysosomaux et mitochondriaux sont souvent relargués dans le sérum à la suite de ces ruptures. Par contre, aucune action directe de la phalloïdine sur la membrane lysosomale n'a été prouvée (41).

Une autre conséquence de l'intoxication phalloïdienne est l'arrêt de la sécrétion biliaire. Il a été montré par Matschinsky (88) que la sécrétion biliaire cessait environ 6 minutes après l'application de la toxine à des foies perfusés de rats. Le canalicule biliaire dans ces foies perfusés apparaît dilaté et les microvilllis disparaissent. De tels changements morphologiques ont aussi été observés in vivo dans les foies de souris blanches (133). Dans les hépatocytes isolés, les microvilllis sont aussi affectés par la phalloïdine (133).

Frimmer et coll. (37, 41) observèrent que les foies de rats perfusés avec la phalloïdine relarguaient des quantités importantes d'ions K^+ . Un peu plus tard, des études entreprises par Jahn montrèrent que le début du relarguage des ions K^+ (12 minutes après l'intoxication) était subséquent à d'autres effets dont: la libération d'ions Ca^{2+} (3min), l'augmentation de la consommation d'oxygène (2 à 3 min) et l'augmentation de volume du foie (6 min). La sortie d'ions K^+ est donc interprétée comme un effet secondaire de la vacuolisation et du gonflement du foie. La preuve la plus évidente qu'il existe une relation directe entre la vacuolisation et le relarguage d'ions K^+ réside dans le fait que les hépatocytes isolés, qui ne subissent pas de vacuolisation quand ils sont soumis à l'action de la phalloïdine, ne perdent que des quantités minimales de cet ion (39, 42).

Le réticulum endoplasmique des hépatocytes est aussi affecté au cours de l'intoxication phalloïdienne. L'examen au microscope électronique révèle que le réticulum endoplasmique rugueux disparaît graduellement en présence de cette toxine, au profit du réticulum endoplasmique lisse et des ribosomes libres (40, 72, 133).

Von der Decker et coll. (127) remarquèrent une inhibition de la synthèse protéique dans des fractions de foie après intoxication à la phalloïdine. Il est probable que la toxine affecte cette synthèse par la modification du réticulum endoplasmique. Plus récemment, Gravela et coll. (52) observèrent une inhibition de la synthèse protéique des hépatocytes isolés de rats en présence de phalloïdine. Le début de l'inhibition était observé 30 minutes après l'administration de la toxine, ce qui correspond au temps nécessaire pour que les polysomes se désintègrent (53, 60). Cependant, on ne sait pas si la désintégration des polysomes et l'inhibition de la synthèse des protéines liées aux membranes sont des effets primaires de l'intoxication phalloïdienne ou si ces deux événements représentent des lésions secondaires ou tertiaires.

Une autre conséquence de l'intoxication phalloïdienne des cellules du foie in vivo est la diminution de leur contenu en ATP et en glycogène (133). Ce phénomène se produirait à la suite d'autres lésions telles que la vacuolisation ou la perte d'ions potassium (1). La diminution du glycogène a été attribuée à une inhibition de la synthèse plutôt qu'à une hydrolyse (145).

3.2.1.4 Effet de la phalloïdine sur d'autres cellules que les hépatocytes

Peu d'expériences concernant l'effet de la phalloïdine sur des cellules autres que les hépatocytes ont été tentées, vu la spécificité marquée de cette toxine envers les hépatocytes. Quelques expériences ont été faites avec de la phalloïdine libre sur des lymphocytes et ont démontré que le taux d'absorption de la phalloïdine par ces cellules était très lent, malgré les fortes concentrations de toxine utilisée (35, 38).

De plus, quelques expériences ont été entreprises pour étudier l'effet de la phalloïdine sur des cellules imperméables à cette toxine. En effet, il est possible de faire pénétrer la toxine dans des cellules qui normalement absorbent certaines protéines (70). Dans ce cas il s'agit de préparer un conjugué protéine-phalloïdine qui pourra ainsi entrer à l'intérieur de ces cellules. Certaines expériences de ce genre ont été tentées par Barbanti-Brodano (8) dans des macrophages, des cellules de tube proximal dans le rein et des cellules sinusoidales de foie de rats. Le complexe utilisé par ces auteurs était un conjugué albumine-phalloïdine. Les résultats de ces expériences montrent que le réticulum endoplasmique rugueux était dilaté dans les cellules tubulaires. Par contre, les macrophages étaient tués par le conjugué protéine-phalloïdine.

3.2.2 Virotoxines

Au moment où nous avons commencé ce projet de recherche, les connaissances sur les virotoxines étaient très limitées. Nous savions que ces toxines se retrouvaient exclusivement chez le champignon Amanita virosa, que leur poids moléculaire s'apparentait à celui de la phalloïdine (24) et que deux virotoxines avaient été détectées chez ce champignon. Nos études ainsi que celles entreprises dans le laboratoire de Wieland ont apporté des informations supplémentaires sur ce nouveau groupe de peptides qui représente l'objet de ce travail.

4.0 HISTORIQUE DU PROJET DE RECHERCHE

- Origine du projet

Marc Brosseau dans son travail de maîtrise avait pour but de répertorier les champignons toxiques du Québec. Pour vérifier la toxicité, il injectait des extraits bruts de champignons à des souris et déterminait le taux de mortalité. Les résultats de ses expériences s'accordaient à montrer que l'Amanite vireuse était très toxique (11). En fait, il réussit à extraire du champignon deux groupes de composés: les virotoxines et la phalloïdine. Par la suite, le Dr. Julian Gruda observa, par chromatographie, que la fraction contenant les virotoxines révélait deux pics distincts qu'il nomma A et B. Il montra de plus que ces deux virotoxines interagissaient avec l'actine (54, 55).

- But du projet

Etant donné l'importance de la phalloïdine dans l'étude de l'actine et, par conséquent de l'appareil contractile, et vu le fait que les virotoxines interagissaient aussi avec l'actine, nous avons décidé d'entreprendre une étude plus approfondie des propriétés de ces nouveaux peptides toxiques. Est-ce que cette interaction avec l'actine ressemble à celle de la phalloïdine? Les virotoxines agissent-elles sur la polymérisation de la G-actine et stabilisent-elles les filaments d'actine? Si oui, sont-elles plus actives que la phalloïdine?

Si on peut répondre à toutes ces questions par l'affirmative, cette recherche revêt alors un triple intérêt:

- 1) en permettant de caractériser davantage le champignon Amanita virosa.
- 2) en améliorant les connaissances sur le mécanisme d'action des virotoxines.
- 3) en fournissant un outil supplémentaire pour étudier l'actine et les systèmes contractiles dans le cas où les virotoxines ont la même action sur l'actine que la phalloïdine.

- Justification de la démarche globale

Dans un premier temps, nous avons sélectionné et entrepris quelques expériences avec les fractions A et B des virotoxines, afin de connaître leurs effets sur l'actine. Ces expériences furent choisies en fonction de leur pertinence et des possibilités de matériel offert par l'Université du Québec à Trois-Rivières. Par la suite, nous nous sommes demandés s'il était possible de purifier davantage les virotoxines par une méthode plus sophistiquée soit la chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Nous n'avons pas commencé par cette étape pour deux raisons. Premièrement, nous ne possédions pas de HPLC et deuxièmement, si les virotoxines étaient peu actives sur l'actine, il devenait inutile de continuer nos recherches dans ce sens.

C'est grâce à la collaboration du Dr. Serge St-Pierre et de Marthe Gendreau, de l'Université de Sherbrooke, que les virotoxines ont été séparées en 5 composés par HPLC préparative. Nous avons donc repris toutes les expériences déjà faites avec les fractions A et B des virotoxines et complété ces expériences avec les virotoxines séparées.

CHAPITRE 2

MATERIEL ET METHODES

1.0 PRÉPARATION DE L'ACTINE

L'actine que nous avons utilisée provient du muscle de lapin. Elle est préparée à partir de la poudre acétonique suivant la méthode de Spudich et Watt (115), modifiée par Nonomura (93). Cette actine est électrophorétiquement pure. Sauf indication contraire, la G-actine se trouve dans une solution contenant: ATP, 0.5 mM; tampon tris-HCl, 2 mM, pH 8.0; CaCl_2 , 0,2 mM. La F-actine est dans une solution de composition: ATP, 0.2 mM; β -Mercaptoéthanol, 0.5 mM; CaCl_2 , 0.2 mM; KCl, 100 mM; MgCl_2 , 1 mM; tampon tris-HCl, 20 mM, pH 8.0: qu'on appelle tampon F. Pour obtenir de la F-actine, la G-actine est polymérisée par le tampon F.

2.0 EXTRACTION ET PURIFICATION DE LA PHALLOIDINE ET DES VIROTOXINES A PARTIR DU CHAMPIGNON AMANITA VIROSA

Les toxines sont extraites par la méthode de Yocum et Simons (150, 151) que nous avons modifiée. Le principe de la méthode consiste à extraire les toxines par l'alcool et à purifier par une série de chromatographies.

2.1 Préparation de l'extrait de toxines

Les champignons Amanita virosa furent recueillis dans le Parc National de la Mauricie, en septembre 1978 et 1979. Après un rapide nettoyage, ils furent lyophilisés et conservés dans des sacs de polyéthylène à température ambiante.

Environ 15 grammes de champignons sont agités 1 heure dans 300

ml d'eau distillée, puis homogénéisés dans un waring-blender pendant 1 minute. On ajoute par la suite 300 ml d'éthanol 95% et la suspension est agitée pendant 24 heures à température ambiante. Après une centrifugation de 5000 g x 20-25 minutes, le culot est suspendu dans 600 ml de méthanol contenant de l'acide acétique 0.1N, puis agité pendant 24 heures. Cette extraction est répétée 2 fois. Par la suite, les trois filtrats sont combinés, évaporés sous pression réduite à 37°C et le résidu est dissout dans 150 ml d'une solution eau-méthanol 1:1. Cette solution est extraite trois fois avec 200 ml de chloroforme-méthanol 3:1 afin d'éliminer les lipides. Les phases combinées de chloroforme sont réextraites trois fois avec 100 ml d'eau-méthanol 1:1 et toutes les phases aqueuses eau-méthanol sont combinées et évaporées sous pression réduite à 37°C. Le résidu est finalement dissout dans environ 250 ml d'eau, le pH est ajusté à 8.0 avec du NH_4OH 3% et la solution est filtrée sur filtre blüchner.

2.2 Purification sur Amberlite XAD-4

Cette première étape de chromatographie est recommandée par Yocum (51) afin d'éliminer les sels de l'extrait de peptides.

L'extrait brut de peptides est déposé sur une colonne de 2.5 cm x 1m contenant du XAD-4, puis la colonne est éluée avec environ 1 litre d'eau. Les peptides sont adsorbés sur la résine et extraits à l'éthanol (ou méthanol). Le filtrat est ensuite évaporé à 37°C sous pression réduite.

2.3 Chromatographie de l'extrait brut de toxines sur Séphadex LH20

La chromatographie sur Séphadex LH20 sépare les différents groupes de peptides, en particulier la phalloïdine et les virotoxines brutes.

L'extrait de peptides recueilli après passage sur XAD est dissout dans 10 ml de bicarbonate d'ammonium 0,1M. Si cette solution est trouble, elle est centrifugée à 140 000 g x 30-45 minutes. L'échantillon est déposé sur une colonne de 5 cm x 1m contenant du Séphadex LH20. L'élution se fait avec du bicarbonate d'ammonium 0,1M, à une vitesse d'environ 40 ml/h. Des fractions de 10 ml sont recueillies et l'élution est suivie par mesure de l'absorption à 292 nm. Le chromatogramme présente essentiellement 5 pics: A et B (virotoxines) C et D (non identifiés) et E (phalloïdine) (Figure 2). Dans la dernière étape, les fractions A, B et E sont évaporées sous vide à 37°C puis récupérées dans 10 ml d'eau distillée et lyophilisées.

2.4 Séparation des virotoxines en fractions A et B

Cette méthode a été mise au point par le Dr. Julian Gruda (54).

Le résidu des virotoxines est dissout dans 10 ml de bicarbonate d'ammonium 0,1M, puis déposé sur deux colonnes de 2.5 cm x 1m contenant du LH20. Les colonnes sont branchées de façon à former un circuit fermé passant par un détecteur U.V. et une pompe péristaltique qui assure une circulation d'environ 40 ml/h. La circulation est maintenue pendant 5-7 jours. Des fractions de 10 ml sont alors recueillies et l'élution est suivie par mesure de l'absorption à 280 nm. La figure 3 montre un exemple

FIGURE 2. Profil d'élution d'un extrait méthanolique du champignon
Amanita virosa chromatographié sur Séphadex LH 20.

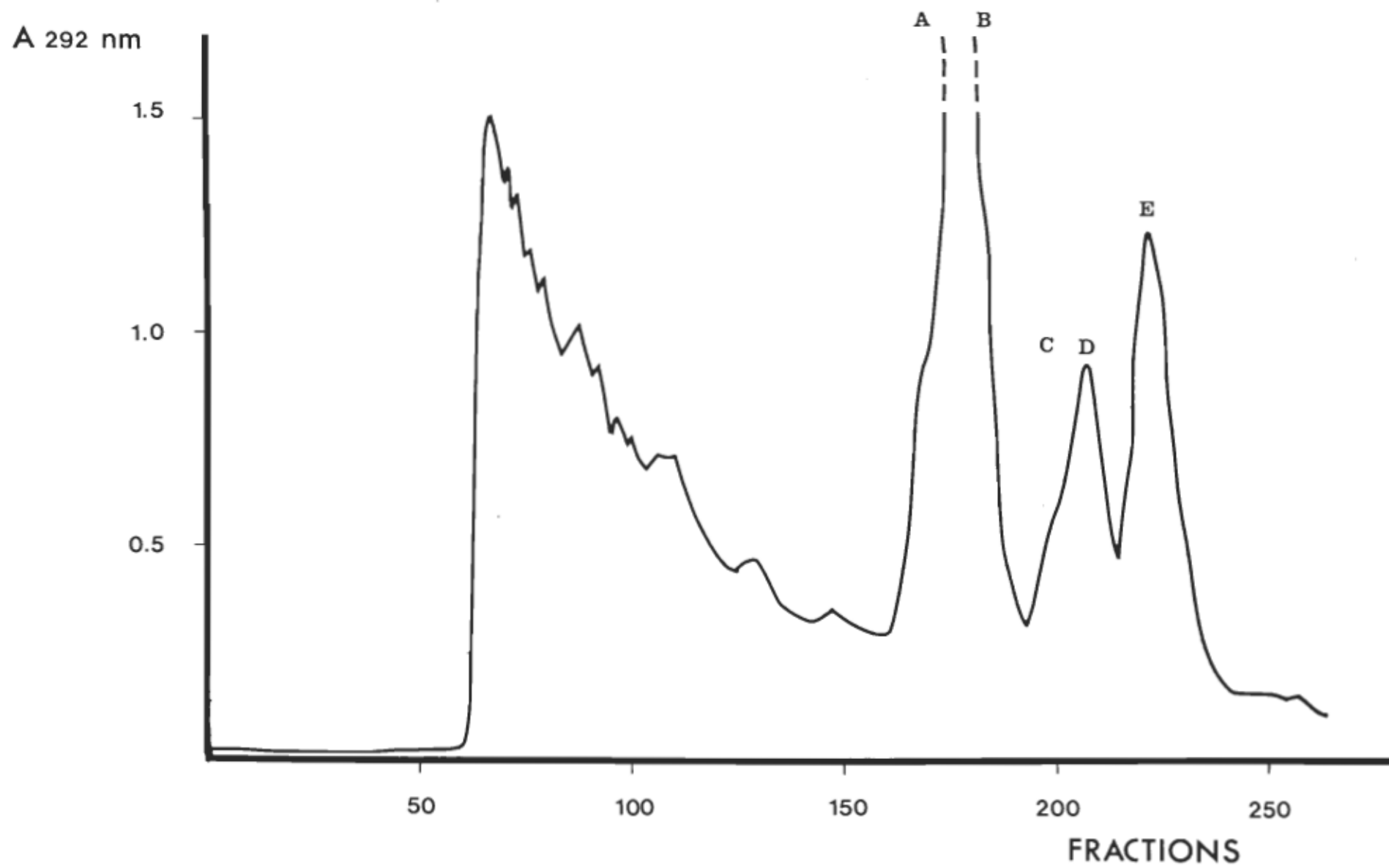
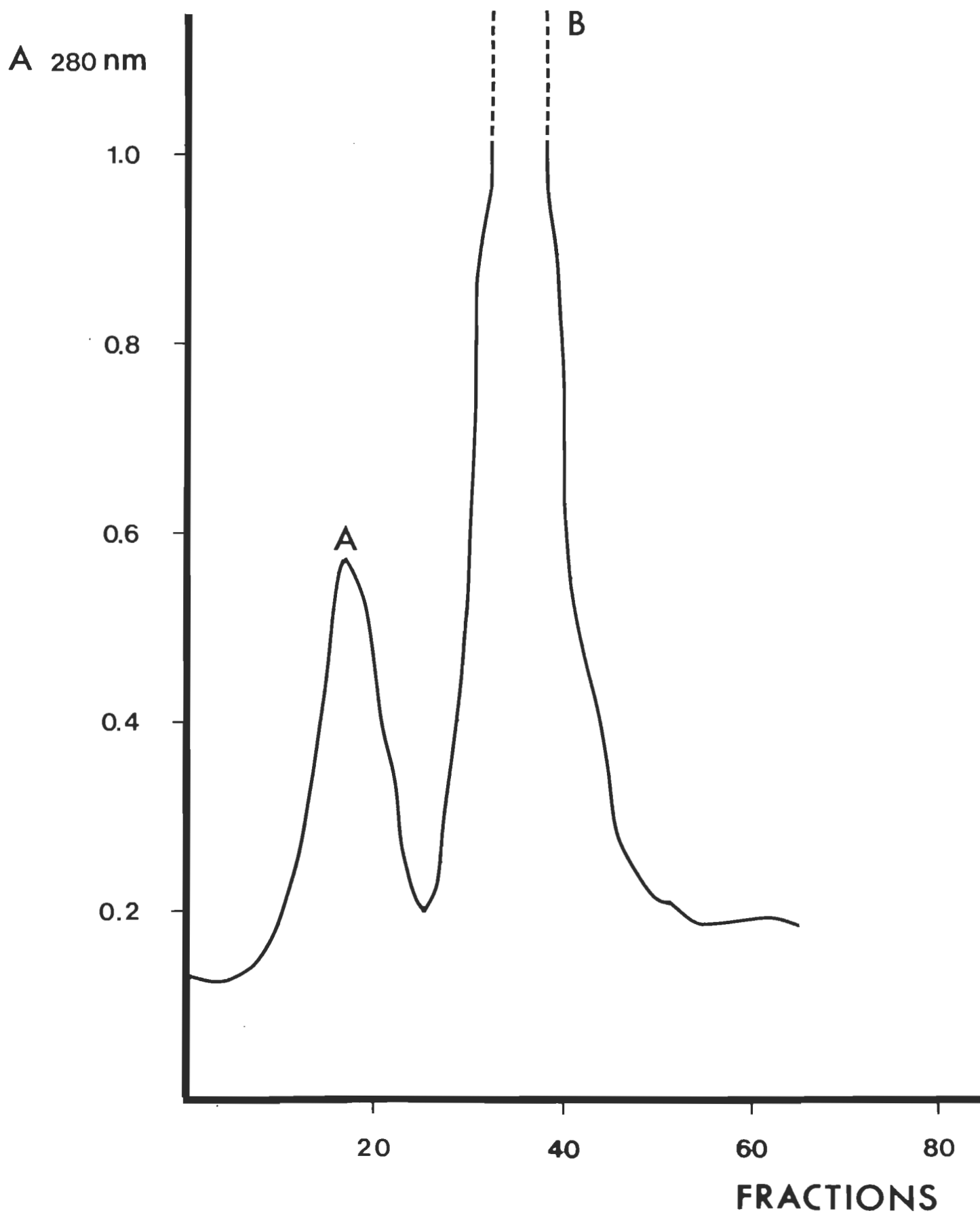


FIGURE 3. Résolution des virotoxines en fractions A et B. Profil d'élution obtenu après chromatographie de recyclage sur Séphadex LH 20.



d'élution obtenue après cette chromatographie de recyclage. La fraction B est celle dont l'absorbance est la plus forte.

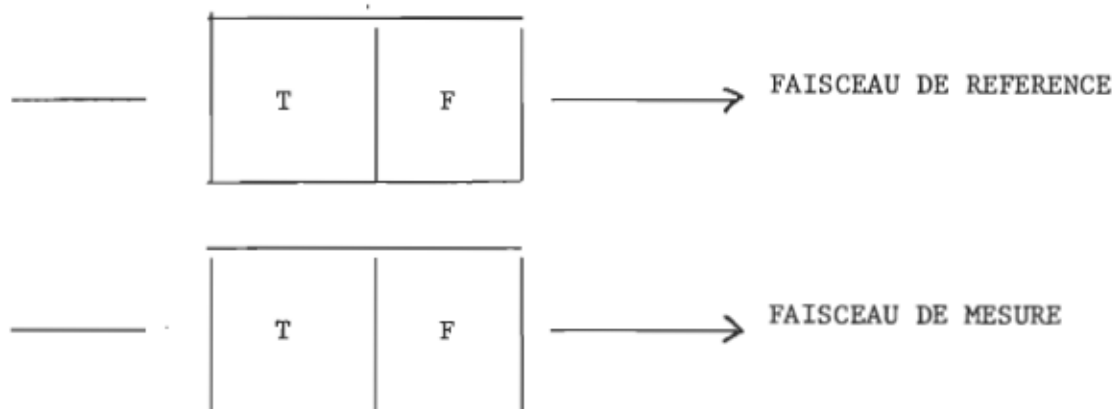
2.5 Séparation des virotoxines par chromatographie sur HPLC

Cette chromatographie du mélange A + B des virotoxines faite selon la méthode de Faulstich et coll. (30) a été modifiée par Gendreau et St-Pierre (44). La séparation est réalisée à l'aide d'un système HPLC de Waters Scientifics. On utilise une colonne C18 μ Bondapak de 7 x 300 mm. Les éluants sont: A, 15% acétonitrile - H₂O et B; 70% acétonitrile - H₂O. Le gradient est linéaire. L'élution se fait à une vitesse de 2 ml / min et elle est suivie par mesure de l'absorption à 254 nm.

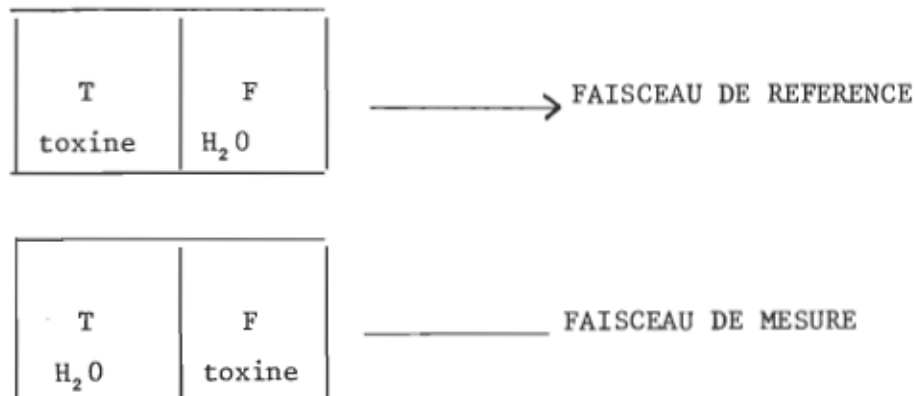
3.0 ETUDE DE L'INTERACTION VIROTOXINES-F-ACTINE PAR SPECTROSCOPIE DIFFERENTIELLE

Les spectres d'absorption des virotoxines 1, 2, 3, 4, 5 sont tracés de 210-350 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Cary 17 D. Les toxines sont dissoutes dans l'eau.

Le spectre différentiel est obtenu selon la méthode de Wieland (147). Dans deux cuvettes tandem, nous introduisons un certain volume de F-actine (F) dans un compartiment et du tampon F (T) dans l'autre, comme illustré par le schéma suivant:



Comme la composition des deux cuvettes est la même, on trace ainsi la ligne de base entre 240 et 340 nm. On rajoute ensuite la toxine au tampon sur le parcours témoin et à la F-actine dans l'essai. On mesure ainsi l'absorption qui résulte de l'interaction entre la toxine et l'actine:



Le spectre différentiel est tracé entre 240 et 340 nm. L'expérience est faite avec les virotoxines 1, 2, 3, 4, 5, ainsi qu'avec la phalloïdine.

4.0 MESURE DE L'INFLUENCE DES VIROTOXINES SUR LA VITESSE DE POLYMERISATION DE L'ACTINE

L'addition de $Mg\ Cl_2$ à une solution de G-actine provoque sa polymérisation en F-actine (16).

A une solution de G-actine on ajoute les toxines à concentration désirée et le tout est incubé pendant 30 minutes à température ambiante. La polymérisation débute par l'addition de $Mg\ Cl_2$. Nous avons suivi l'accélération de la vitesse de polymérisation de la G-actine par les virotoxines et la phalloïdine à la concentration indiquée dans les résultats, en utilisant deux méthodes: la diffusion de lumière et la viscosimétrie. La diffusion de lumière est mesurée à 400 nm, à l'aide d'un spectrofluorimètre Perkin-Elmer MPF 2A. Dans ce cas, l'expérience se déroule à température ambiante. La viscosité spécifique est mesurée à l'aide de viscosimètres de type Cannon-Fenske à 25°C. Le temps d'écoulement du solvant est d'environ 60 s.

5.0 ANTAGONISME DES VIROTOXINES SUR LA DEPOLYMERISATION DE LA F-ACTINE PAR LE KI.

L'effet protecteur des virotoxines contre l'action dépolymérisante du KI est mesuré par viscosimétrie suivant la méthode de Low et Wieland (77).

La F-actine est incubée avec les toxines à température ambiante pendant 30 minutes. La viscosité de ces solutions est ensuite mesurée à 25°C à l'aide de viscosimètres Cannon-Fenske. Du KI en poudre est ajouté directement dans chaque viscosimètre. La viscosité des solutions est

mesurée à plusieurs reprises quelques minutes après l'addition du KI. L'expérience est refaite plusieurs fois et les résultats interprétés statistiquement par calcul de la déviation standard et le test de Student.

6.0 DESTABILISATION DE LA F-ACTINE PAR LA CYTOCHALASINE B

L'effet des virotoxines sur la déstabilisation du filament d'actine par la cytochalasine B a été mesuré par viscosimétrie, selon la méthode de Low et Dancker (76).

La G-actine est polymérisée pendant 24 heures avec seulement du $Mg\ Cl_2$, sans KCl. La F-actine ainsi obtenue est incubée à température ambiante avec les virotoxines ou la phalloïdine. Par la suite, la viscosité des solutions est mesurée à 35°C, avant et après l'addition de cytochalasine B, dissoute dans le diméthylsulfoxyde. Au témoin est rajouté le diméthylsulfoxyde, sans CB. L'expérience est reprise plusieurs fois et les résultats interprétés statistiquement par calcul de la déviation standard et le test "T" de Student.

7.0 MESURE DE LA DENATURATION THERMIQUE DE L'ACTINE

La dénaturation thermique de l'actine est mesurée par la méthode de De Vries et coll. (18).

7.1 Mesure de l'effet des virotoxines A et B

Quatre séries de tubes contenant de la F-actine sont plongées dans un bain à 70°C, pendant des temps d'incubation de 0-10 min. Une des quatre séries ne contient que de la F-actine sans toxine. Les autres ont été préincubées à température ambiante en présence de virotoxines A,

de virotoxines B ou de phalloïdine (rapport molaire toxine: actine = 2:1) pendant environ 30 minutes. La réaction est arrêtée par immersion dans un bain d'eau à 0°C et la dénaturation est quantifiée par mesure de la turbidité à 400 nm., à l'aide d'un spectrophotomètre Varian.

7.2 Etude de l'effet des virotoxines pures

La F-actine est incubée avec les virotoxines 1, 2, 3, 4, 5 ou la phalloïdine pendant environ 30 minutes à température ambiante. La concentration des toxines varie entre 0 et $4.17 \times 10^{-5} \text{M}$. Ces échantillons sont alors chauffés dans un bain à 70°C durant 10 minutes. La réaction est arrêtée par immersion dans un bain d'eau à 0°C et la turbidité est mesurée par spectrophotométrie à l'aide d'un spectrophotomètre Varian.

8.0 DEPOLYMERISATION DE LA F-ACTINE PAR LA DNase I

L'action dépolymérisante de la DNase I est mesurée par viscosimétrie selon la technique de Schäfer et coll., (111).

La F-actine est mise en présence des toxines, puis incubée à 25°C pendant quelques minutes. Les concentrations des réactifs sont indiquées dans les résultats. La DNase I est rajoutée à concentration équimolaire avec l'actine et la viscosité est mesurée pendant 2 heures à 25°C.

9.0 PROTEOLYSE DE LA F-ACTINE PAR LA TRYPSINE

La cinétique de la protéolyse de la F-actine est suivie par viscosimétrie selon la méthode de Pollender et Gruda (98).

La F-actine est mise en présence des virotoxines 1, 2, 3, 4, 5 ou de la phalloïdine (concentration équimolaire avec l'actine) et incubée pendant environ 30 minutes à 37°C. Après addition de la trypsine, la viscosité est mesurée pendant 3 heures.

10.0 DESTRUCTION DE LA F-ACTINE PAR L'ACIDE OSMIQUE

L'effet destructeur de l'acide osmique sur la F-actine a été suivi par viscosimétrie et spectrophotométrie, selon les techniques de Gicquaud et coll., (47).

A de la F-actine en solution dans du tampon phosphate de potassium, sans β -Mercaptoéthanol (pH 6,3), on ajoute les virotoxines 1, 2, 3, 4, 5 ou de la phalloïdine à concentration équimolaire et le tout est incubé 30 minutes à 20°C. L'acide osmique est ensuite ajouté dans les solutions. La cinétique de cette réaction est suivie par spectrophotométrie à 400 nm, à l'aide d'un spectronic 20 Bauch and Lomb. L'expérience se déroule à 20°C. Des contrôles sont faits afin de vérifier si l'acide osmique réagit avec les virotoxines. Les témoins ne contiennent que de l'eau, du tampon phosphate de potassium, de l'acide osmique et les différentes toxines, 10 fois plus concentrées que dans l'essai.

Cette réaction est aussi suivie par viscosimétrie à l'aide de viscosimètres de type Cannon-Fenske. Les expériences de viscosimétrie ont lieu à 20°C.

CHAPITRE 3

RESULTATS

Ce chapitre se divise en deux parties: la première décrit les résultats obtenus avec les fractions A et B des virotoxines et la seconde, ceux obtenus avec les 5 virotoxines purifiées.

1.0 EFFET DES FRACTIONS A ET B DES VIROTOXINES SUR L'ACTINE

1.1 Influence des fractions A et B des virotoxines sur la vitesse de polymérisation de l'actine

La vitesse de polymérisation de l'actine étant fortement accélérée en présence de phalloïdine (16), nous avons aussi étudié l'influence des fractions A et B des virotoxines sur la polymérisation de l'actine.

La figure 4 A représente la polymérisation de l'actine, initiée par le $Mg\ Cl_2$, suivie par diffusion de lumière. L'actine est en absence ou en présence des fractions A ou B des virotoxines ou de la phalloïdine à un rapport molaire toxine: actine de 2:1. Ce graphique montre que les virotoxines accélèrent la vitesse de polymérisation de l'actine, de façon moins marquée que la phalloïdine et que la fraction B des virotoxines est plus active que la fraction A.

La figure 4 B montre l'influence des fractions A ou B des virotoxines sur la vitesse de polymérisation de l'actine, suivie par viscosimétrie. Les concentrations d'actine et de toxines sont les mêmes que dans l'expérience précédente. Ce graphique montre que les virotoxines accélèrent un peu moins la vitesse de polymérisation de l'actine que la phalloïdine, et que la fraction B des virotoxines est plus active que la fraction A.

FIGURE 4A. Accélération de la vitesse de polymérisation de l'actine par les fractions A et B des virotoxines, suivie par diffusion de lumière à 20°C. G-actine, $2,2 \times 10^{-5}M$; $Mg\ Cl_2$, 0,8 mM; fractions A et B des virotoxines et phalloïdine, rapport molaire toxine: actine de 2:1 \blacklozenge —, G-actine; \bullet ----, G-actine et virotoxine A; \circ ----, G-actine et virotoxine B; \diamond —, G-actine et phalloïdine.

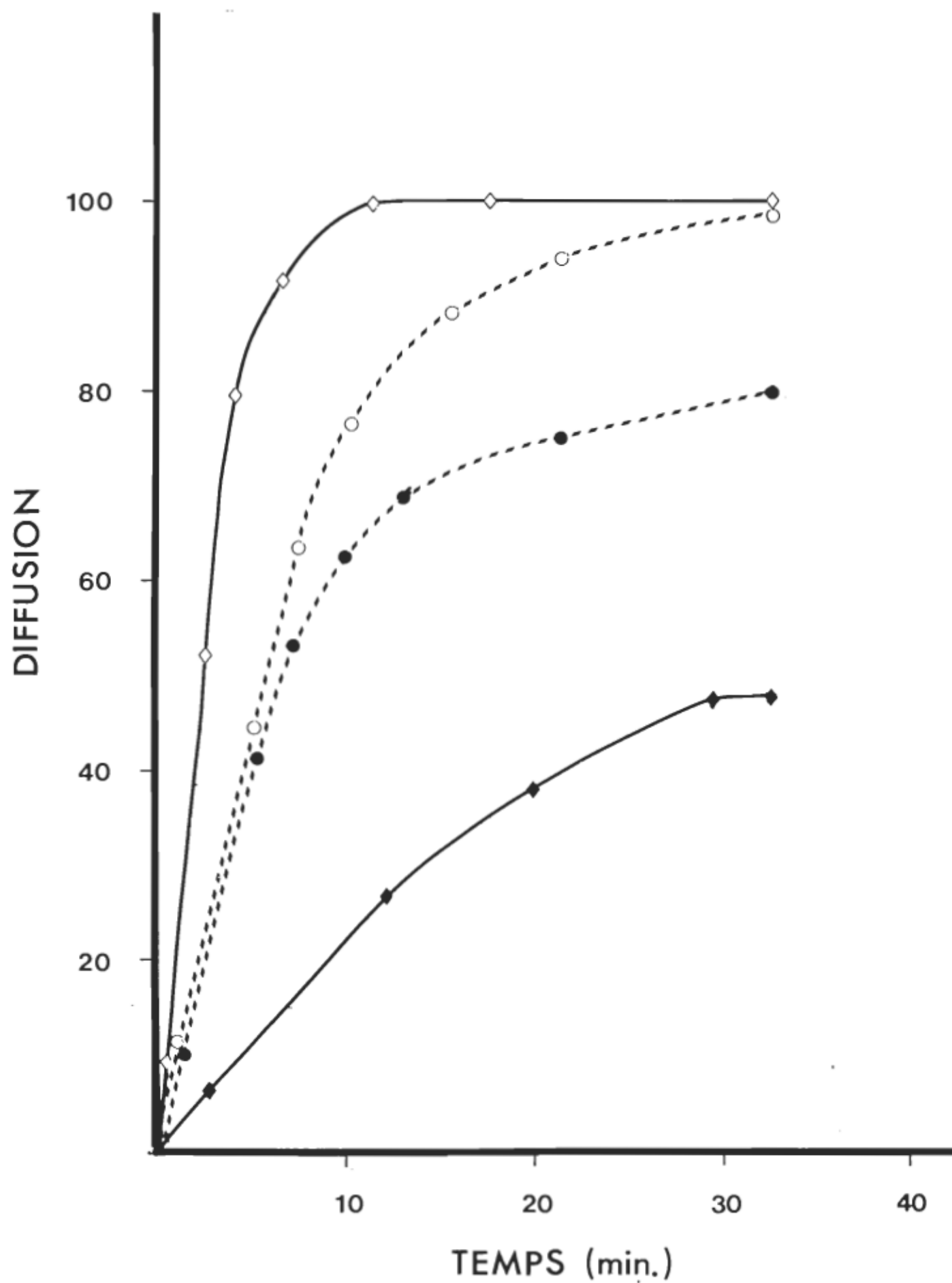
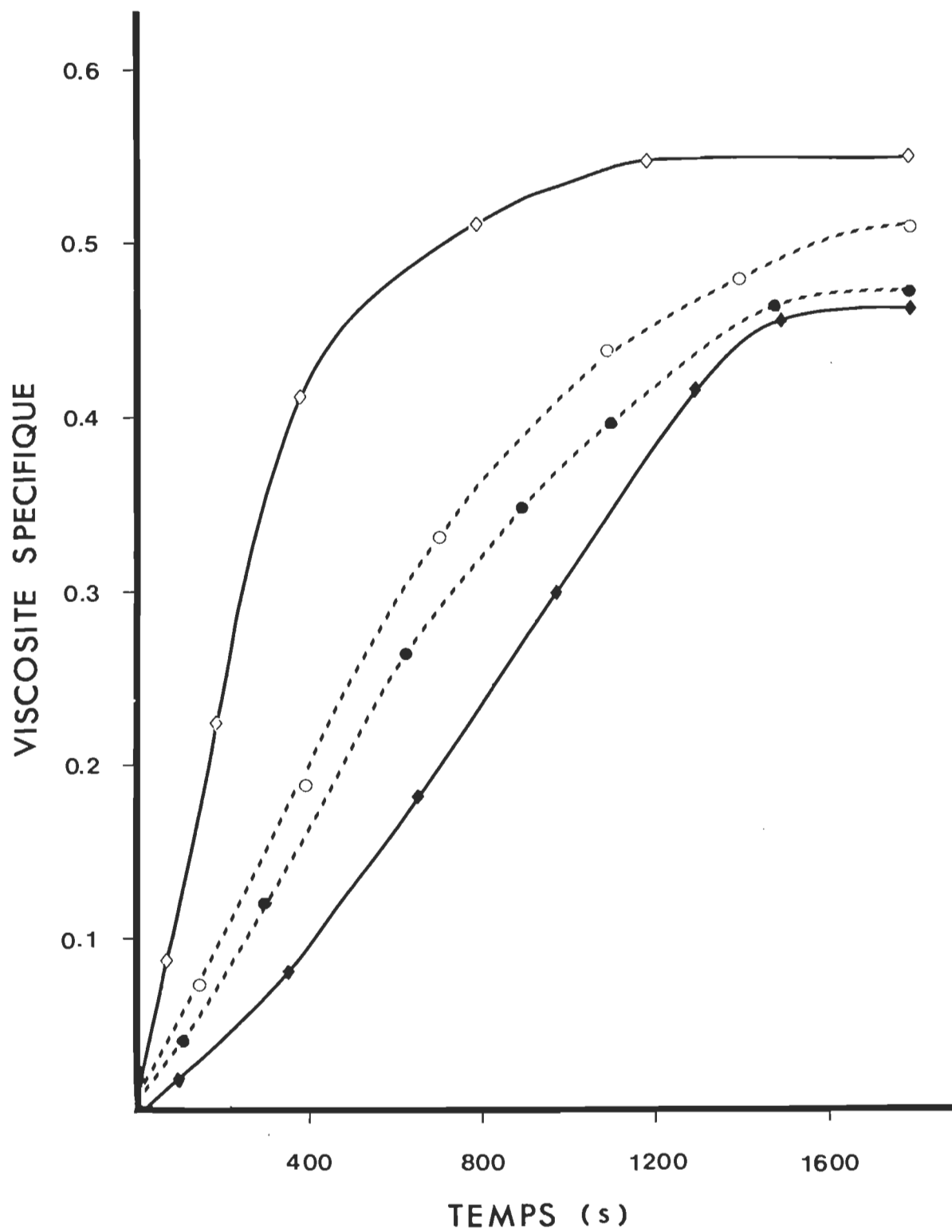


FIGURE 4B. Accélération de la vitesse de polymérisation de l'actine par les fractions A ou B des virotoxines, suivie par viscosimétrie à 25°C. G-actine, $2,2 \times 10^{-5}M$; $Mg Cl_2$, 0,8 mM; fractions A et B des virotoxines et phalloïdine, rapport molaire toxine: actine de 2:1 ◆——, G-actine; ●---- G-actine et virotoxine A; ○----, G-actine et virotoxine B; ◇—— G-actine et phalloïdine.



Les courbes obtenues pour les deux expériences ont un aspect différent. Celles qui représentent la polymérisation de l'actine suivie par viscosimétrie présentent une forme sigmoïdale, alors que les courbes obtenues en diffusion de lumière sont asymptotiques. Au début, lorsque l'actine polymérise, les petits fragments d'actine formés accroissent très peu la viscosité de la solution, mais augmentent beaucoup la diffusion de lumière. Ceci explique la plus faible vitesse initiale obtenue par viscosité que par diffusion de lumière. L'aspect de ces courbes est très semblable à celui observé par Low et Dancker aux cours d'expériences différentes (15).

1.2 Protection de la F-actine par les fractions A ou B des virotoxines contre l'effet dépolymérisant de l'iodure de potassium 0,6M

La F-actine est rapidement dépolymérisée par l'iodure de potassium 0,6M. La phalloïdine stabilise l'actine et la rend plus résistante à l'action de cet ion chaotropique (77). Nous avons repris cette expérience avec les fractions A et B des virotoxines.

Le tableau 1 donne la viscosité spécifique de la F-actine, avant et après l'addition de KI 0,6M, en présence ou en absence des fractions A ou B des virotoxines ou de la phalloïdine.

La solution de F-actine seule, après l'ajout de l'iodure de potassium, subit une forte chute de viscosité spécifique, indiquant une dépolymérisation totale de l'actine. Par contre, en présence des fractions A ou B des virotoxines ou de la phalloïdine, la viscosité de la solution de F-actine ne diminue que peu après addition de KI, ce qui montre que ces

TABLEAU 1. Effet des fractions A et B des virotoxines sur la dépolymérisation de la F-actine provoquée par K I, mesurée par viscosimétrie à 25°C. F-actine, $1,1 \times 10^{-5}M$; fraction A et B des virotoxines et phalloïdine. $1,1 \times 10^{-5}M$, rapport molaire toxine: actine de 1:1; K I, 0,6 M. Les résultats représentent la moyenne de 18 lectures.

$P \geq 99.9\%$

	VISCOSITE SPECIFIQUE	
	avant 0.6M KI	après 0.6M KI
F-actine seule	0,29 \pm 0,02	0,02 \pm 0,01
F-actine et virotoxine A	0,29 \pm 0,02	0,24 \pm 0,03
F-actine et virotoxine B	0,30 \pm 0,02	0,22 \pm 0,01
F-actine et phalloidine	0,30 \pm 0,03	0,28 \pm 0,02

toxines protègent l'actine contre l'action de l'ion chaotropique.

D'après le test de Student ($P \geq 99.9\%$) les résultats sont significatifs.

1.3 Effet des virotoxines sur la déstabilisation de la F-actine par la cytochalasine B

La cytochalasine B provoque une diminution de la viscosité spécifique d'une solution de F-actine polymérisée en absence de KCl. La phalloïdine protège l'actine contre l'action de la cytochalasine B (76, 113).

Le tableau 2 montre l'effet de la cytochalasine B (10 CB: 1 G-actine) sur la viscosité spécifique d'une solution de F-actine, en absence ou en présence des fractions A ou B des virotoxines ou de la phalloïdine. La fraction B, ainsi que la phalloïdine protègent totalement la F-actine contre l'action de la cytochalasine B, et la fraction A est légèrement moins efficace. D'après le test de Student ($P \geq 99.9\%$) les résultats sont statistiquement significatifs.

1.4 Protection contre la dénaturation thermique de l'actine par les fractions A et B des virotoxines

La F-actine chauffée à 70°C se dénature, ce qui entraîne une augmentation de la turbidité de la solution d'actine. La phalloïdine protège l'actine contre l'action de la chaleur (18). La figure 5 représente l'influence des fractions A et B des virotoxines sur la turbidité d'une solution de F-actine chauffée à 70°C , pendant des temps d'incubation de 0 - 10 minutes. La fraction B et la phalloïdine protègent presque complètement l'actine contre la dénaturation thermique à cette température. La fraction A des virotoxines protège aussi la F-actine

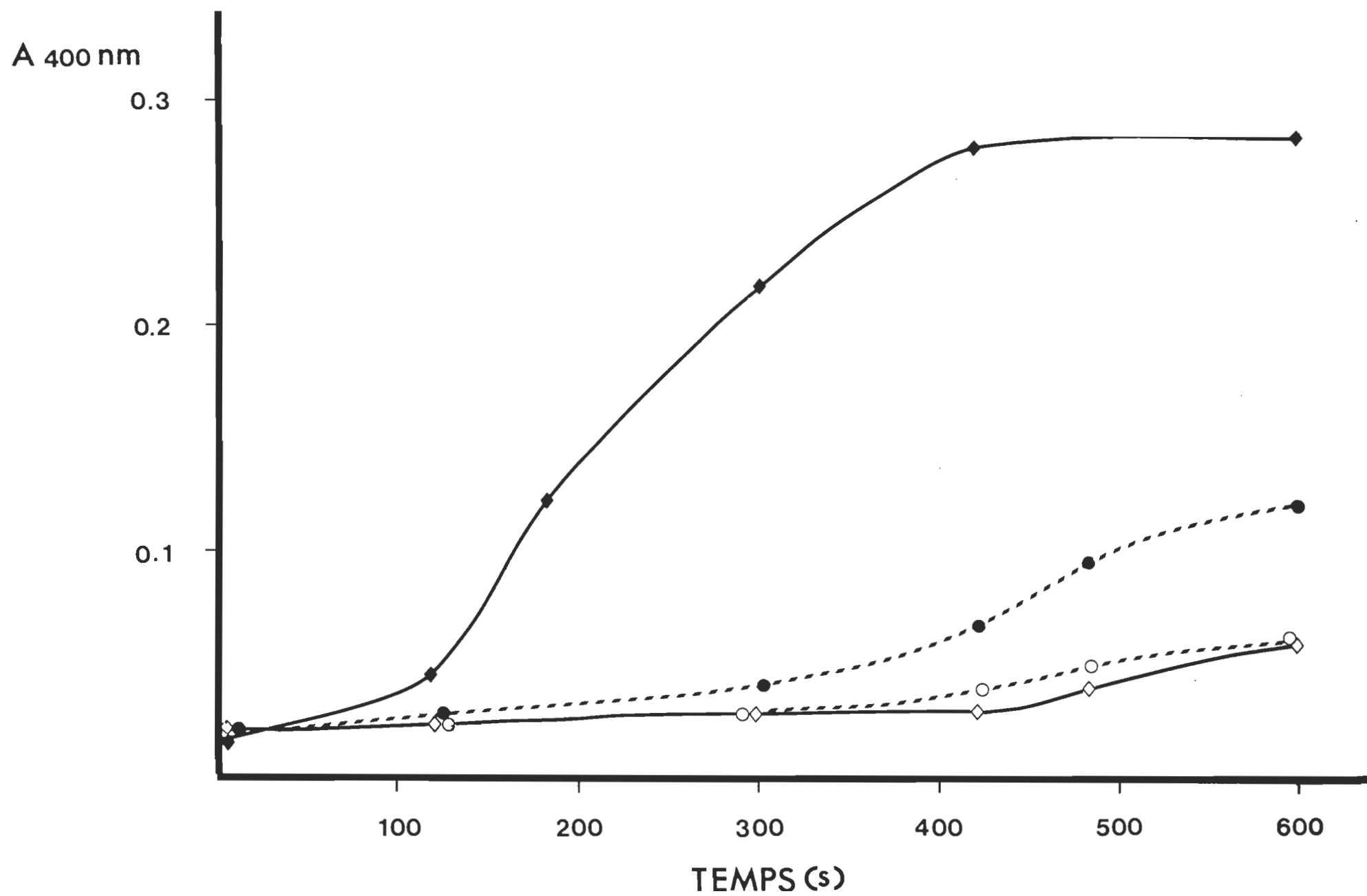
TABLEAU 2. Influence des fractions A et B des virotoxines sur la déstabilisation de la F-actine par la cytochalasine B, suivie par viscosimétrie à 35°C. F-actine, $2,2 \times 10^{-5}M$ (polymérisée dans un tampon F, sans KCl); virotoxine A, virotoxine B et phalloïdine, rapport molaire toxine-actine de 1:1; cytochalasine B, rapport molaire cytochalasine B: G-actine: 10:1.

Les résultats représentent la moyenne de 18 lectures.

P > 99.9%

	VISCOSITE SPECIFIQUE	
	avant CB	après CB
F-actine seule	0.73 ± 0.04	0.53 ± 0.05
F-actine et virotoxine A	0.73 ± 0.03	0.64 ± 0.04
F-actine et virotoxine B	0.75 ± 0.04	0.72 ± 0.04
F-actine et phalloidine	0.74 ± 0.02	0.71 ± 0.04

FIGURE 5. Effet des fractions A et B des virotoxines sur la dénaturation thermique de la F-actine à 70°C, suivie par spectrophotométrie à 400 nm. F-actine, $2,2 \times 10^{-5}$ M; Virotoxine A, virotoxine B et phalloïdine, rapport molaire toxine-actine de 1:1. ◆——, F-actine; ●--- F-actine et virotoxine A; ○--- F-actine et virotoxine B; ◇——, F-actine et phalloïdine.



contre cette dénaturation, mais elle est moins efficace que les deux autres toxines.

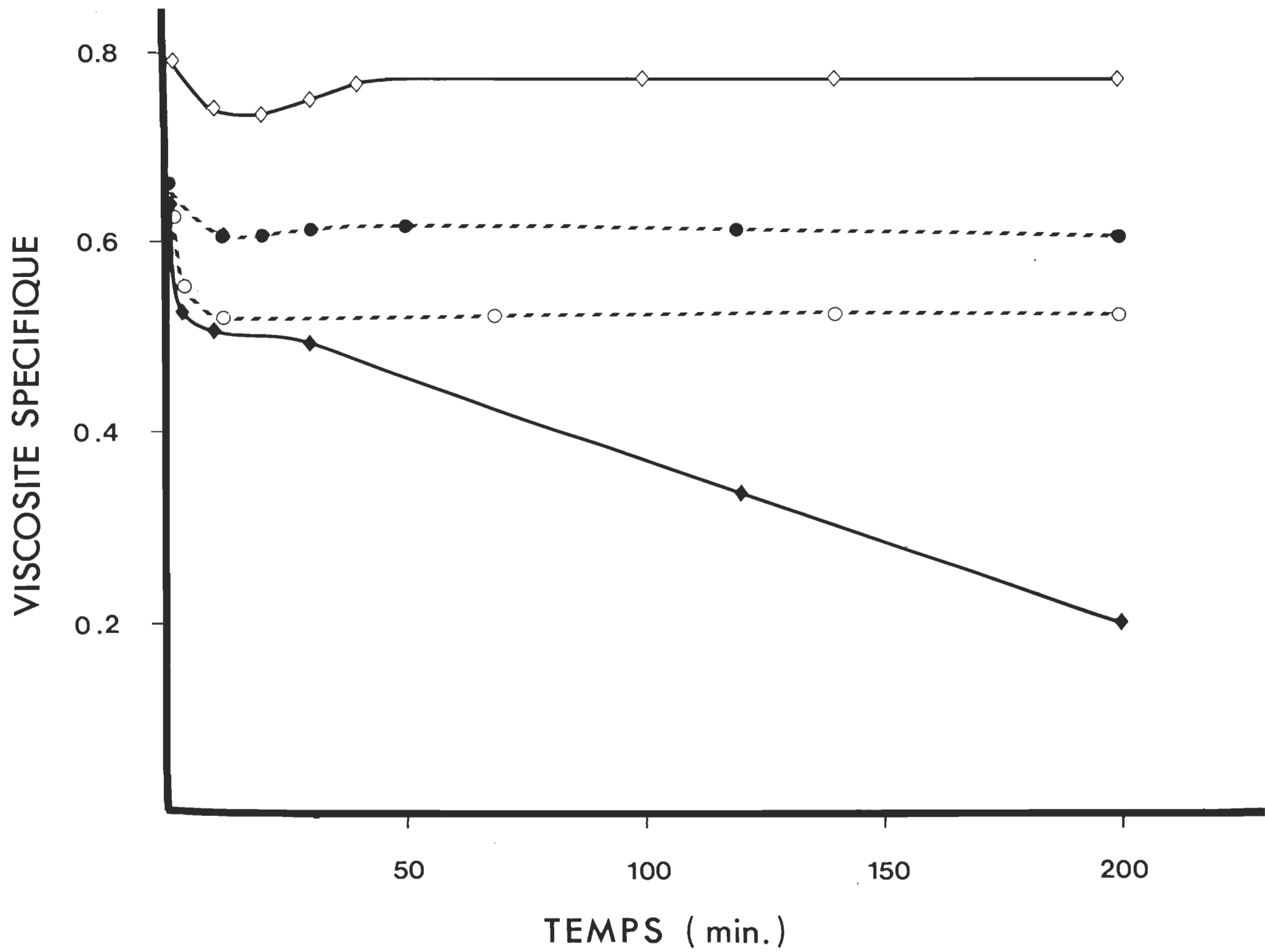
1.5 Effet des fractions A et B des virotoxines sur la dépolymérisation de la F-actine induite par la DNase I

La DNase I dépolymérise la F-actine. Cette action est antagonisée par la phalloïdine (85, 86, 111).

La figure 6 montre l'effet de la DNase I sur la viscosité spécifique d'une solution de F-actine en absence ou en présence des fractions A et B des virotoxines ou de la phalloïdine. Après l'addition de DNase I, la F-actine est dépolymérisée. Dans nos conditions expérimentales, la vitesse de dépolymérisation de la F-actine seule est de 1.7×10^{-3} unités de viscosité spécifique / min. Par contre, en présence des fractions A ou B ou de phalloïdine, la diminution de la viscosité est presque nulle. (Fraction A, 1×10^{-4} unité de viscosité spécifique / min; Fraction B et phalloïdine, 0 unité de viscosité / min). Nous pouvons donc en conclure que ces toxines exercent une certaine protection sur la F-actine contre l'action de la DNase I. Pour effectuer ces calculs nous n'avons considéré la chute de viscosité qu'entre 40 et 200 minutes. Dans les 40 premières minutes, il se produit une chute rapide de viscosité, suivie d'une stabilisation de la réaction. Ceci est dû à un phénomène qui nous est inconnu mais qui semble totalement indépendant des toxines utilisées puisqu'il se produit en absence de toxines.

Finalement, soulignons que le graphique de la figure 6 représente le résultat d'une seule expérience. Cependant, cette expérience a été répétée trois fois et elle est reproductible.

FIGURE 6. Effet des fractions A et B des virotoxines sur la dépolymérisation de la F-actine induite par la DNase I, suivie par viscosimétrie à 25°C. F-actine $2,2 \times 10^{-5}M$; virotoxine A, Virotoxine B et phalloïdine, rapport molaire toxine-actine de 1:1; DNase I, 1mole DNase: 1mole actine. \blacklozenge — , F-actine; \bullet - - - - F-actine et virotoxine A; \circ - - - , F-actine et virotoxine B; \diamond — , F-actine et phalloïdine.



Cette expérience clôtura finalement nos études sur l'effet des fractions A et B des virotoxines sur l'actine. Nous avons déjà publié les résultats de cette première partie (48).

Ces essais préliminaires nous permettent de conclure que les fractions A et B des virotoxines ont qualitativement la même action sur l'actine in vitro que la phalloïdine. De plus, dans la plupart des expériences, la fraction B est plus active que la fraction A, mais moins active que la phalloïdine. Ceci soulève une question. Est-il possible que cette différence d'activité entre les deux virotoxines provienne d'un plus grand nombre d'impuretés chez la fraction A? Nous avons donc décidé d'entreprendre une séparation plus élaborée des virotoxines brutes. Nous avons réalisé cette purification par chromatographie liquide à haute performance, grâce à la collaboration du Dr Serge St-Pierre et de Marthe Gendreau de l'Université de Sherbrooke. Les résultats de cette purification ont été présentés sous forme d'une communication scientifique (44). Nous entreprenons donc la seconde partie de ce chapitre qui décrit les résultats obtenus avec les virotoxines purifiées.

2.0 ETUDE DES VIROTOXINES PURIFIEES

2.1 Séparation des virotoxines

La figure 7 montre un chromatogramme représentant la séparation des virotoxines par HPLC. Ce résultat indique qu'il y a en fait 5 virotoxines, que nous avons nommées virotoxines 1, 2, 3, 4, 5.

Le tableau 3 donne la quantité de chaque virotoxine obtenue par cette méthode, par rapport au total.

2.2 Spectres d'absorption U.V. des virotoxines

Les virotoxines ayant été purifiées pour la première fois, nous avons tracé le spectre d'absorption U.V. de ces substances, illustré sur la figure 8.

Toutes les virotoxines ont les mêmes pics d'absorption dû au tryptophane, soit un maximum à 278 nm et deux épaulements, dont l'un à 295 et l'autre à 305 nm. La hauteur des pics ne variant que légèrement d'une toxine à l'autre, nous n'avons représenté que le spectre de la virotoxine 5.

Le tableau 4 donne le coefficient d'extinction molaire des virotoxines calculé à partir des spectres d'absorption U.V.

FIGURE 7. Chromatogramme d'un mélange de virotoxines obtenu par HPLC sur une colonne C18 μ Bondapack et mesuré par densité optique à 254 nm.

A 254 nm

1.0

0.8

0.6

0.4

0.2

10

20

30

40

50

TEMPS (min.)

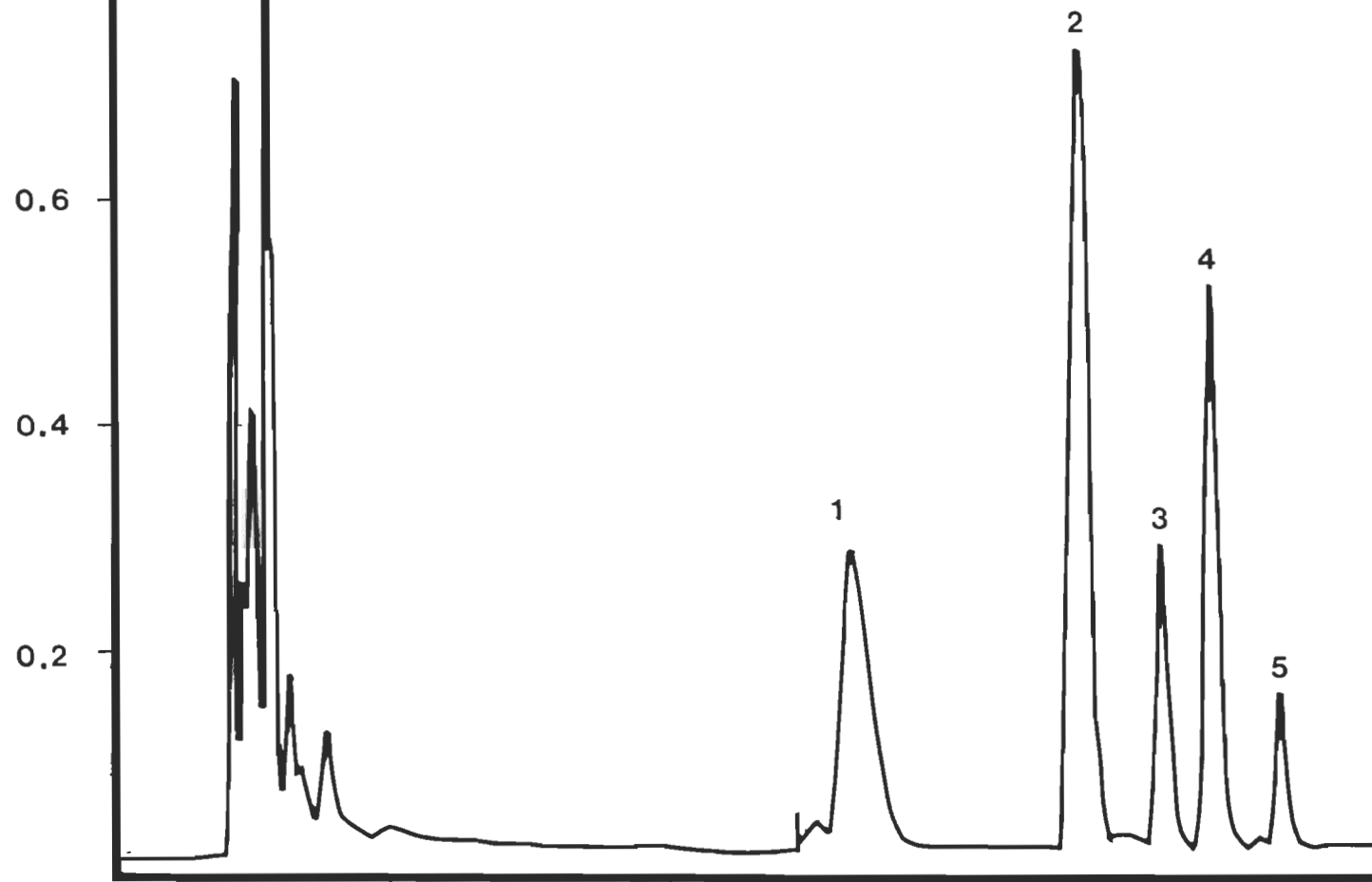


TABLEAU 3 - Pourcentage relatif de virotoxines pures, obtenues à la suite d'une chromatographie du mélange de virotoxines (A + B) par HPLC. (Total injecté = 20 mg)

No Pic	% relatif
1	8.8
2	53.5
3	11.2
4	20.9
5	5.7

FIGURE 8. Spectre d'absorption U.V. de la virotoxine 5
($2,45 \times 10^{-5}$ M dans H₂O).

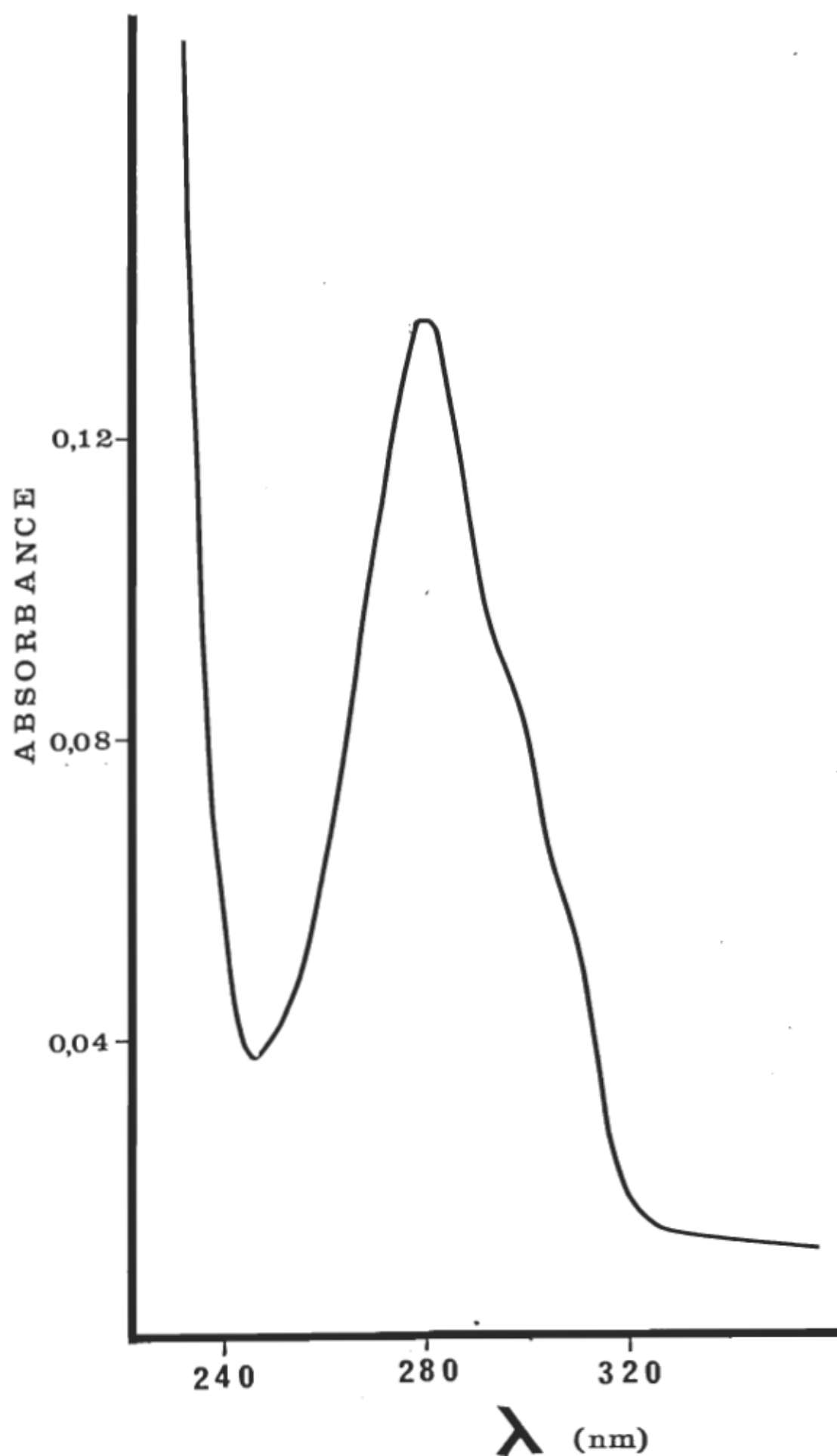


TABLEAU 4 - Coefficients d'extinction molaire ϵ pour chaque virotoxine calculés à partir de leurs spectres d'absorption.

(Absorbance à $\lambda = 278$ nm) Concentration des toxines = 2.45×10^{-5} M dans H_2O .

Fraction	Absorbance 278 nm	ϵ
1	0.114	10 600
2	0.120	11 200
3	0.09	8 400
4	0.107	10 000
5	0.122	11 400

2.3 Effet des virotoxines purifiées sur l'actine in vitro

2.3.1 Interaction F-actine-virotoxines

L'interaction des virotoxines avec l'actine a été mise en évidence par spectroscopie différentielle, selon la méthode de Wieland et collaborateurs (147).

La figure 9 représente les résultats de l'interaction de la virotoxine 3, ainsi que de la phalloïdine avec l'actine, à rapport molaire toxine-actine de 1:1. La virotoxine 3 montre 3 pics, soit à 286 nm, 297 nm et 310 nm. Toutes les autres virotoxines donnent le même spectre différentiel avec l'actine.

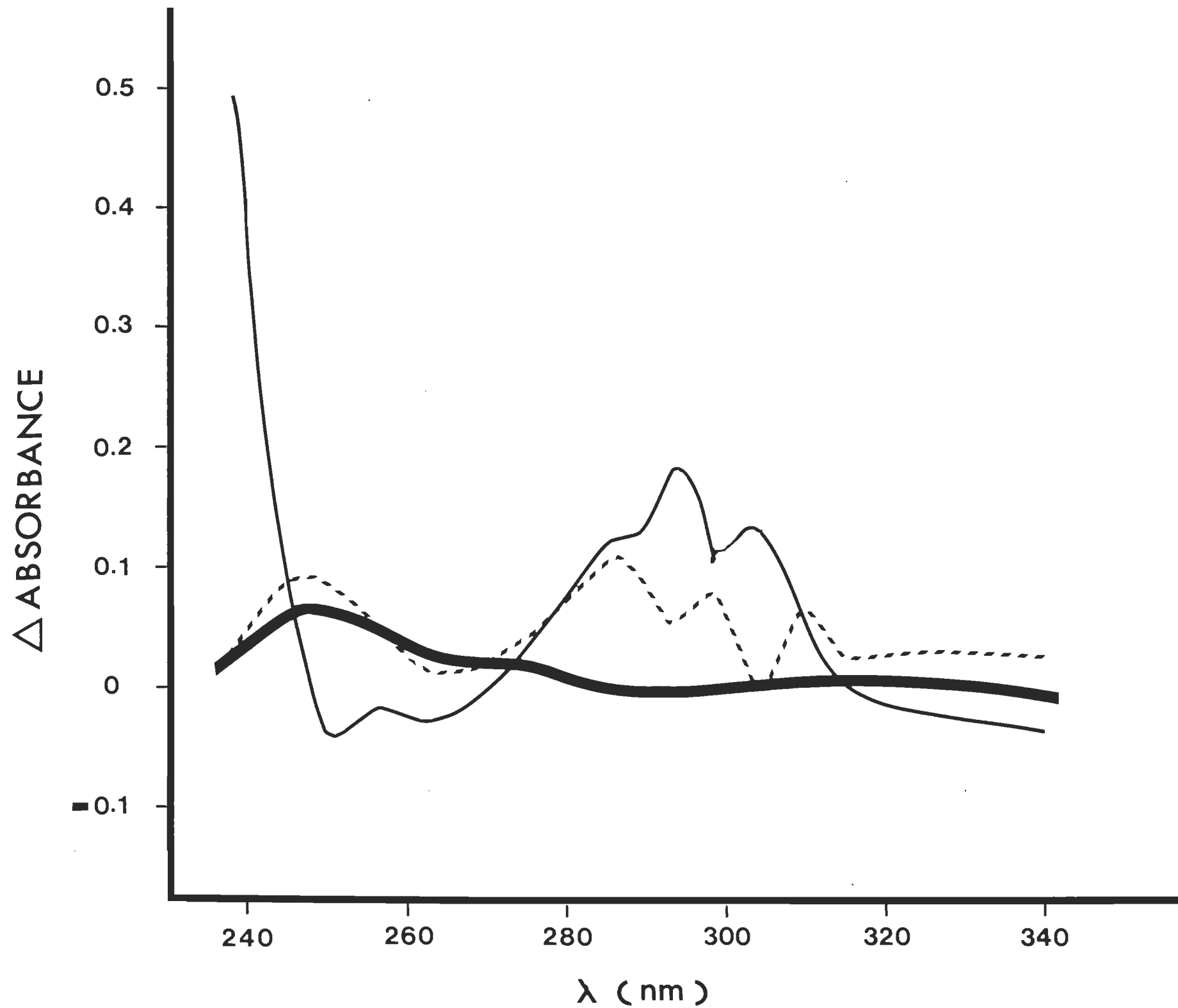
On peut remarquer sur la figure 9 que le spectre différentiel F-actine-virotoxine 3 est différent de celui de l'interaction F-actine-phalloïdine. Celui-ci montre aussi 3 pics, mais décalés à 286 nm, 292 nm et 305 nm. D'autre part, l'intensité relative de ces pics est différente.

En conclusion, cette expérience prouve qu'il y a interaction entre les virotoxines et la F-actine et que cette interaction doit être différente de celle de la phalloïdine.

2.3.2 Protection de la F-actine, par les virotoxines purifiées, contre la dénaturation thermique

Cette expérience est sans doute la plus importante de toutes celles que nous avons entreprises, puisqu'elle représente la seule étude montrant l'effet des virotoxines purifiées sur l'actine en fonction de leurs concentrations. Etant donné les quantités très limitées de viro-

Figure 9. Spectre différentiel U.V. obtenu en mélangeant $2,2 \times 10^{-5} \text{M}$ de F-actine (ATP 0,1 mM) avec une solution contenant la virotoxine 3, $2,2 \times 10^{-5} \text{M}$ (ligne hachurée) ou de la phalloïdine $2,2 \times 10^{-5} \text{M}$ (ligne continue). Le trait épais représente la ligne de base.



toxines, cette expérience a été faite dans le but de déterminer le rapport molaire virotoxines-actine pour lequel l'activité des toxines est maximum.

La figure 10 représente la dénaturation de la F-actine chauffée à 70°C pendant 10 minutes, en fonction de concentrations variables de toxines. Toutes les virotoxines, comme la phalloïdine, protègent l'actine contre la dénaturation thermique. Les virotoxines exercent la même activité aux erreurs expérimentales près. Par contre, la phalloïdine est un peu moins active.

Cette expérience permet aussi de montrer que l'activité maximum des virotoxines se situe au rapport molaire de 1 toxine: 1 actine. Pour des rapports supérieurs, l'activité n'augmente que très peu, comme nous pouvons le voir sur la figure 10. Toutes les autres expériences ont donc été faites avec ce rapport toxine-actine.

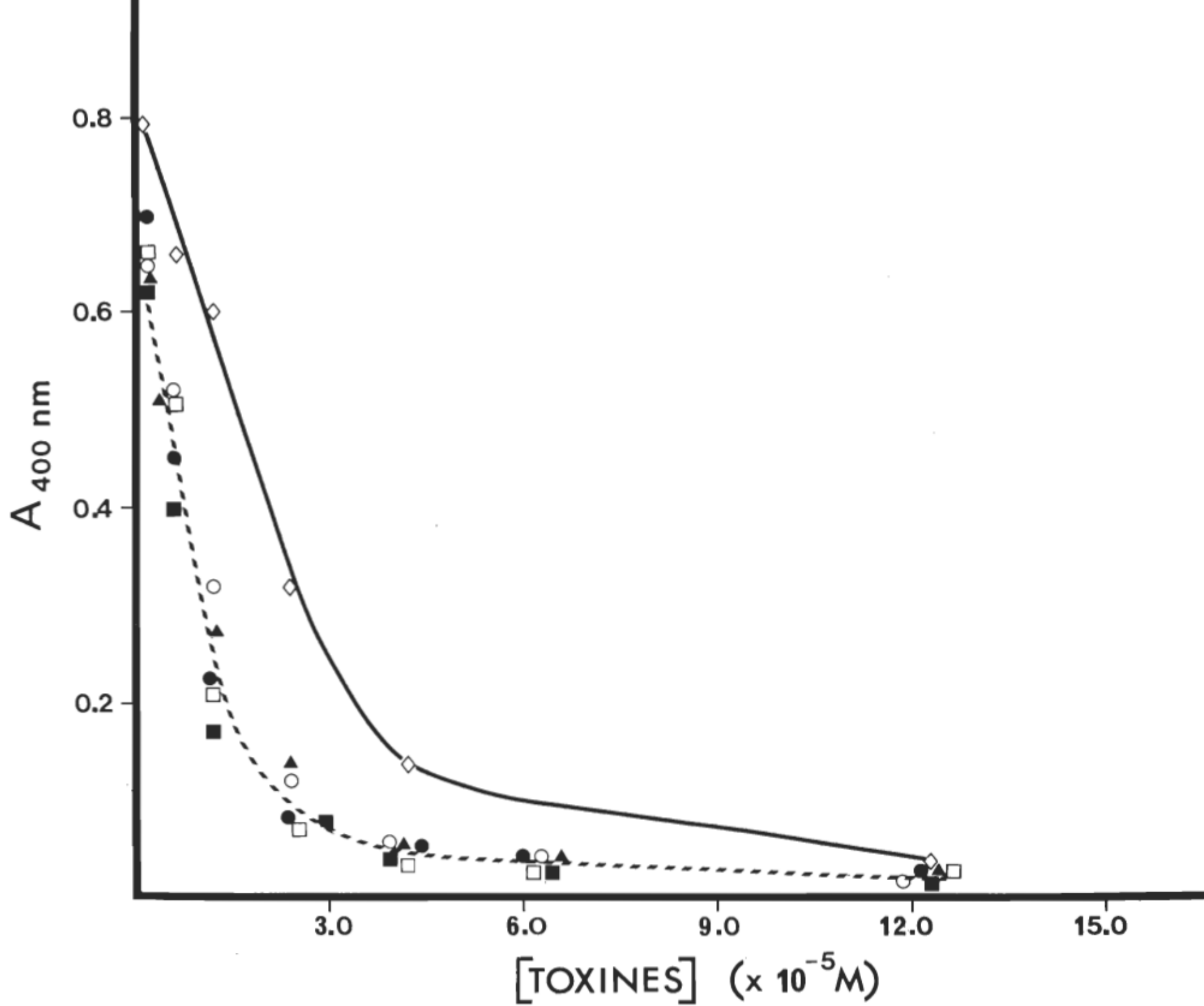
2.3.3 Influence des virotoxines séparées sur la dépolymérisation de la F-actine par l'iodure de potassium 0,6M

Le tableau 5 montre la viscosité spécifique d'une solution de F-actine, avant puis après l'addition de KI 0,6M en présence ou en absence des virotoxines.

Le KI 0,6M dépolymérise fortement la F-actine. Par contre, en présence des virotoxines ou de phalloïdine, la baisse de viscosité spécifique de la solution d'actine est beaucoup plus faible, montrant ainsi la protection exercée par ces toxines sur l'actine. La virotoxine 4 est légèrement plus efficace que les autres virotoxines. Comme pour l'expé-

FIGURE 10. Protection de la F-actine par les virotoxines séparées contre la dénaturation thermique, suivie par spectrophotométrie à 400 nm. F-actine, $4 \times 10^{-5} \text{M}$; virotoxines 1, 2, 3, 4, 5 et phalloïdine, $0 - 12,5 \times 10^{-5} \text{M}$; $T = 70^{\circ}\text{C}$; temps de dénaturation: 10 minutes.

▲----, F-actine et virotoxine 1; ●----, F-actine et virotoxine 2; ○---, F-actine et virotoxine 3; □---, F-actine et virotoxine 4; ■---, F-actine et virotoxine 5; ◇——, F-actine et phalloïdine.



TABLERAU 5. Influence des virotoxines séparées sur la dépolymérisation de la F-actine par le KI, mesurée par viscosimétrie à 25°C. F-actine, $2,2 \times 10^{-5}M$; virotoxines 1, 2, 3, 4, 5 et phalloïdine, $2,2 \times 10^{-5}M$; KI, 0,6 M. Les résultats représentent la moyenne de 9 lectures.

P \geq 98%.

	VISCOSITE SPECIFIQUE	
	avant 0.6M KI	après 0.6M KI
F-actine seule	0,77 ± 0,02	0,17 ± 0,06
F-actine et virotoxine 1	0,87 ± 0,04	0,72 ± 0,02
F-actine et virotoxine 2	0,88 ± 0,03	0,78 ± 0,02
F-actine et virotoxine 3	0,84 ± 0,01	0,67 ± 0,01
F-actine et virotoxine 4	0,84 ± 0,02	0,77 ± 0,02
F-actine et virotoxine 5	0,86 ± 0,03	0,74 ± 0,04
F-actine et phalloïdine	0,79 ± 0,05	0,69 ± 0,03

rience précédente, la virotoxine 3 est la moins active.

On peut remarquer sur ce tableau que les virotoxines, ainsi que la phalloïdine provoquent une hausse de la viscosité spécifique de la solution d'actine, en absence de KI. La remontée produite par la phalloïdine est cependant un peu plus faible que pour les virotoxines. Ce phénomène peut être expliqué par le fait que les toxines complètent la polymérisation de l'actine. Il est donc possible que le degré de protection de celles-ci, indiqué par l'écart de viscosité avant et après l'addition du KI soit inexact, dû à cette augmentation de la viscosité. Cependant, cette expérience nous permet quand même de prouver que les virotoxines protègent l'actine contre la dépolymérisation par l'iodure de potassium 0,6M. D'après le test de Student, ($P \geq 98\%$) les résultats sont statistiquement significatifs.

2.3.4 Inhibition par les virotoxines séparées de l'action de la cytochalasine B sur la F-actine

Le tableau 6 montre les viscosités spécifiques d'une solution de F-actine, avant et après l'addition de cytochalasine B, en absence ou en présence des virotoxines. Toutes les virotoxines, ainsi que la phalloïdine antagonisent complètement l'effet de la cytochalasine sur l'actine. Comme dans le cas précédent, la viscosité spécifique en présence des toxines est supérieure à la viscosité spécifique de la F-actine seule, ceci étant dû à l'augmentation de la polymérisation de l'actine. Les virotoxines 3, 4 et la phalloïdine sont un peu moins efficaces pour compléter la polymérisation de l'actine que les virotoxines 1, 2 et 5. D'après le test de Student ($P \geq 90\%$), les résultats sont statistiquement significatifs.

TABLEAU 6. Effet des virotoxines séparées sur la déstabilisation de la F-actine par la cytochalasine B, suivie par viscosimétrie à 35°C. F-actine, $2,2 \times 10^{-5}M$ (polymérisée dans un tampon F, sans KCl); virotoxines 1, 2, 3, 4, 5 et phalloïdine, $2,2 \times 10^{-5}M$ (rapport molaire toxine: actine de 1:1); cytochalasine B, rapport molaire CB: G-actine de 10:1. Les résultats représentent la moyenne de 5 lectures.

P > 90%.

	VISCOSITE SPECIFIQUE	
	- CB	+ CB
F-actine seule	$0.66 \pm .04$	$0.40 \pm .02$
F-actine et virotoxine 1	$0.78 \pm .01$	$0.77 \pm .01$
F-actine et virotoxine 2	$0.85 \pm .05$	$0.82 \pm .01$
F-actine et virotoxine 3	$0.68 \pm .04$	$0.68 \pm .01$
F-actine et virotoxine 4	$0.72 \pm .01$	$0.68 \pm .02$
F-actine et virotoxine 5	$0.86 \pm .02$	$0.84 \pm .03$
F-actine et phalloïdine	$0.76 \pm .01$	$0.69 \pm .01$

2.3.5 Antagonisme des virotoxines séparées sur l'action dépolymérisante de la DNase I

La figure 11 représente la chute de viscosité d'une solution de F-actine après addition de DNase I. En absence de toxines, la DNase I dépolymérise la F-actine à une vitesse de 6.25×10^{-5} unités de viscosité spécifique / seconde. Par contre, en présence des virotoxines 1, 2, 3, 4, 5 ou de phalloïdine, la baisse de viscosité est presque nulle (inférieure à 2×10^{-6} unités de viscosité spécifique / seconde). Ceci indique la protection amenée par les toxines sur la F-actine contre l'action de la DNase I. Ces pentes ont été calculées entre 2000 et 12000 s., car entre 0 et 2000 s., on assiste à une chute rapide de viscosité suivie d'une stabilisation de la réaction, comme nous l'avions observé au cours de la même expérience avec les fractions A et B des virotoxines.

D'après la figure 11, les virotoxines 3 et 5 sont celles qui augmentent le moins la viscosité initiale de l'actine et la virotoxine 2, celle qui l'augmente le plus. Cependant, toutes les virotoxines antagonisent autant l'action de la DNase I.

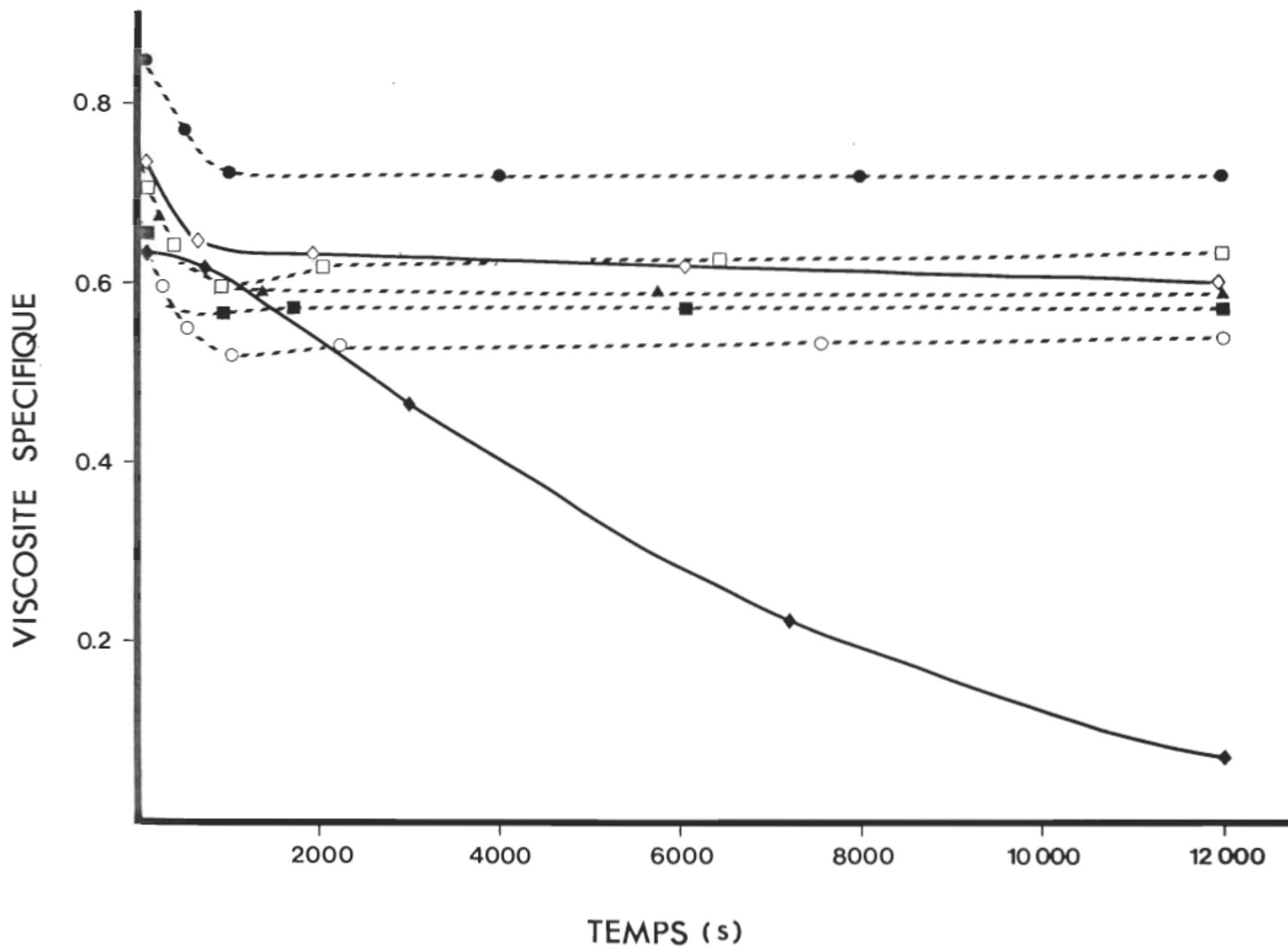
2.3.6 Effet des virotoxines séparées sur la protéolyse de la F-actine par la trypsine

La trypsine est une protéase qui peut dégrader l'actine (71). L'effet de la trypsine sur l'actine se traduit par une chute importante de la viscosité d'une solution de F-actine.

Il a été montré par Pollender et Gruda que la phalloïdine protégeait la F-actine contre l'action de cette protéase (93). Nous

FIGURE 11. Influence des virotoxines séparées sur la dépolymérisation de la F-actine induite par la DNase I, suivie par viscosimétrie à 25°C. F-actine, $2,2 \times 10^{-5}M$; virotoxines 1, 2, 3, 4, 5 et phalloïdine, $2,2 \times 10^{-5}M$; DNase I, rapport molaire DNase I; G-actine de 1:1.

◆——, F-actine; ▲---, F-actine et virotoxine 1; ●---, F-actine et virotoxine 2; ○---, F-actine et virotoxine 3; □---, F-actine et virotoxine 4; ■---, F-actine et virotoxine 5; ◇—— F-actine et phalloïdine.



avons étudié l'influence des virotoxines sur cette réaction.

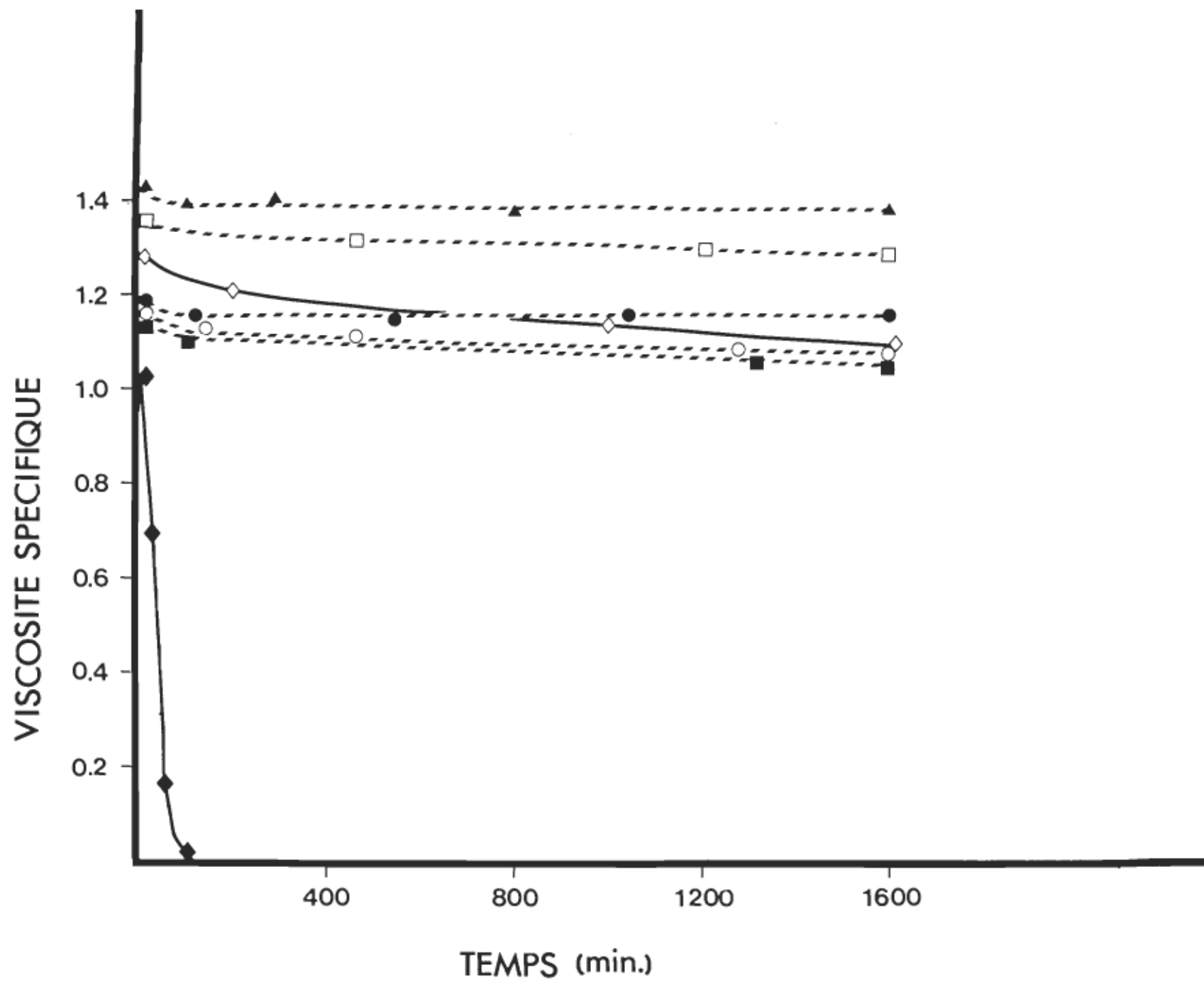
La figure 12 montre l'effet des virotoxines séparées sur la protéolyse de l'actine par la trypsine, suivie par viscosimétrie. La viscosité spécifique de la F-actine seule chute très rapidement après l'addition de la trypsine. En effet, la F-actine se dégrade à une vitesse de 0,016 unités de viscosité spécifique / minute. Par contre, en présence des virotoxines 1, 2, 3, 4, 5, la baisse de viscosité est inférieure à 4×10^{-5} unités de viscosité spécifique / minute, tandis que la phalloïdine entraîne une chute de 6.7×10^{-5} unités de viscosité spécifique / minute.

On peut donc conclure que toutes les virotoxines protègent la F-actine contre l'action de la trypsine avec la même efficacité et que la phalloïdine est légèrement moins efficace. L'effet observé n'est pas dû à une inhibition de la trypsine par les toxines, car ces toxines ne modifient pas la protéolyse d'autres protéines telle l'albumine, par la trypsine. Comme dans les expériences précédentes, la viscosité initiale de l'actine en présence de virotoxines ou de phalloïdine est supérieure à la viscosité initiale de l'actine seule. Les virotoxines 3 et 5 sont celles qui augmentent le moins cette viscosité initiale.

2.3.7 Protection de la F-actine, par les virotoxines séparées, contre les effets destructeurs de l'acide osmique

Le tétroxyde d'osmium détruit la F-actine in vitro par coupure oxydante. Il se forme alors un complexe brun-noir probablement composé de bioxyde d'osmium. (89). La coupure de l'actine peut être suivie par viscosimétrie et l'apparition du complexe brun-noir par spectrophotométrie.

FIGURE 12. Action des virotoxines séparées sur la protéolyse de la F-actine par la trypsine, suivie par viscosimétrie à 37°C. F-actine, 1,5 mg/ml ($3,3 \times 10^{-5}$ M); trypsine, 0,1 mg/ml; virotoxines 1, 2, 3, 4, 5 et phalloïdine, $3,3 \times 10^{-5}$ M. \blacklozenge —, F-actine; \blacktriangle ---, F-actine et virotoxine 1; \bullet ---, F-actine et virotoxine 2; \circ ---, F-actine et virotoxine 3; \square --- F-actine et virotoxine 4; \blacksquare ---, F-actine et virotoxine 5; \diamond —, F-actine et phalloïdine.



Gicquaud et ses collaborateurs ont montré que la phalloïdine protégeait l'actine in vitro contre l'attaque par l'acide osmique (47). Nous avons étudié l'effet des virotoxines sur cette réaction par viscosimétrie et spectrophotométrie.

La figure 13A représente l'influence des virotoxines sur la vitesse de dégradation de la F-actine par l'acide osmique, suivie par viscosimétrie. L'addition d'acide osmique à la F-actine seule provoque une chute rapide de la viscosité, laquelle devient presque nulle après 2 heures. En présence des virotoxines 2 et 4, la baisse de viscosité de la solution est beaucoup plus lente. En fait, la viscosité spécifique met environ 6 heures avant de devenir nulle. Par conséquent, les virotoxines 2 et 4 protègent l'actine contre les effets destructeurs de l'acide osmique. Par contre, les virotoxines 3 et 5 protègent très peu l'actine contre l'action de l'acide osmique. Quant à la virotoxine 1 et à la phalloïdine, leur protection est intermédiaire.

Dans les 40 premières minutes de la réaction, on remarque pour toutes les courbes que la chute de viscosité est très faible. Ceci est dû à des réactions de pontage entre l'acide osmique et l'actine et ces réactions tendent à compenser les coupures de l'actine.

Fait intéressant à noter, la viscosité spécifique de la F-actine, en présence des virotoxines 2 et 4, descend immédiatement après l'addition d'acide osmique, puis elle reste constante pendant une quinzaine de minute avant de diminuer de nouveau plus rapidement. Or, on n'observe pas ce genre de plateau en présence de la phalloïdine et des virotoxines 1, 3 et 5.

FIGURE 13A. Protection des virotoxines séparées sur la F-actine, contre l'effet destructeur de l'acide osmique. La cinétique de la réaction est suivie par viscosimétrie à 20°C. F-actine, $2,2 \times 10^{-5}M$. La F-actine se trouve en solution dans: KCl 0,1M, $CaCl_2$ 0,2 mM, ATP 0,2 mM, $MgCl_2$ 1mM, tampon phosphate de potassium 25 mM, pH 6,3; virotoxines 1, 2, 3, 4, 5 et phalloïdine $2,2 \times 10^{-5}M$; OsO_4 , 3 mM. \blacklozenge —, F-actine; \blacktriangle — — —, F-actine et virotoxine 1; \bullet — — —, F-actine et virotoxine 2; \bigcirc — — —, F-actine et virotoxine 3; \square — — —, F-actine et virotoxine 4; \blacksquare — — —, F-actine et virotoxine 5; \diamond —, F-actine et phalloïdine.

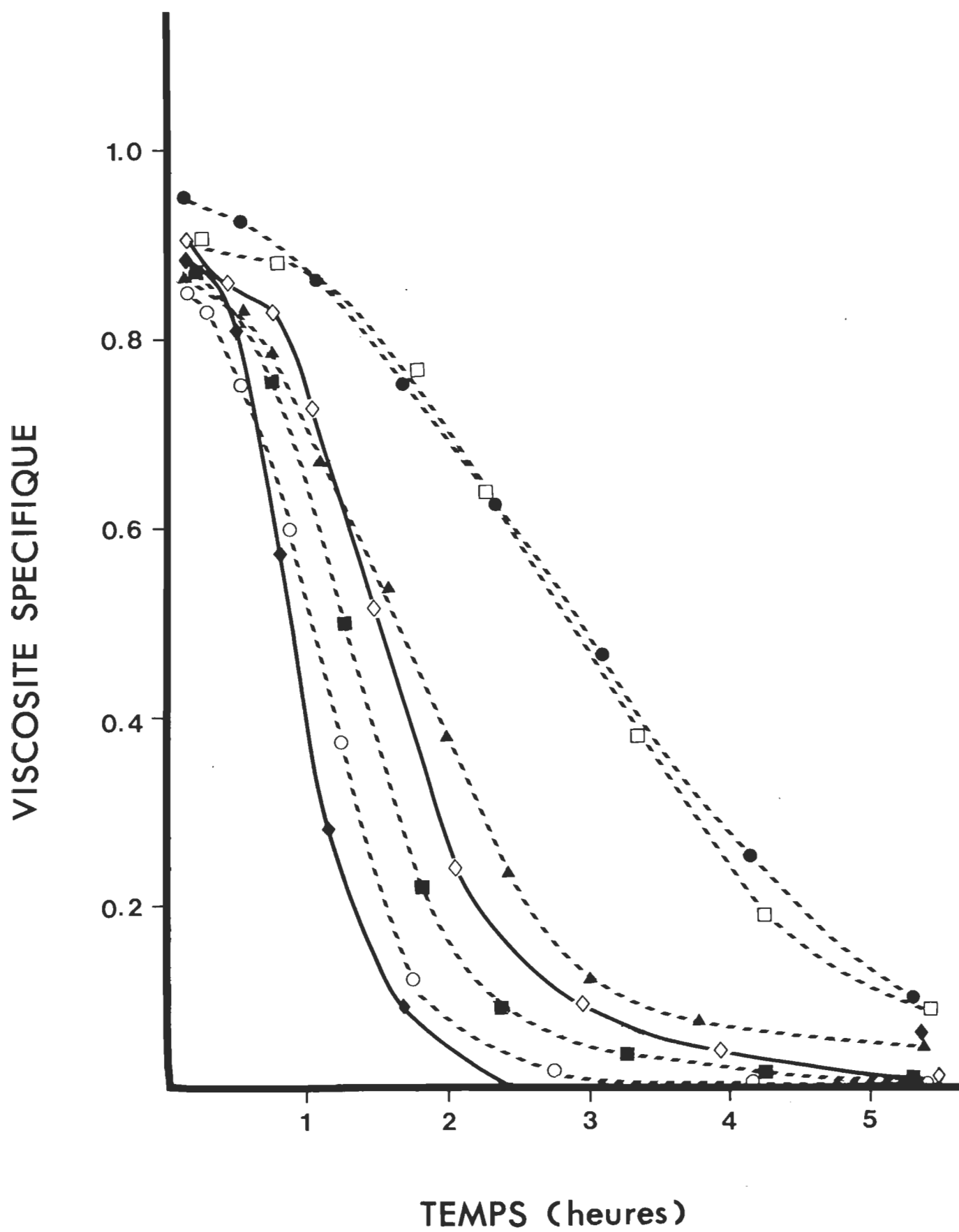
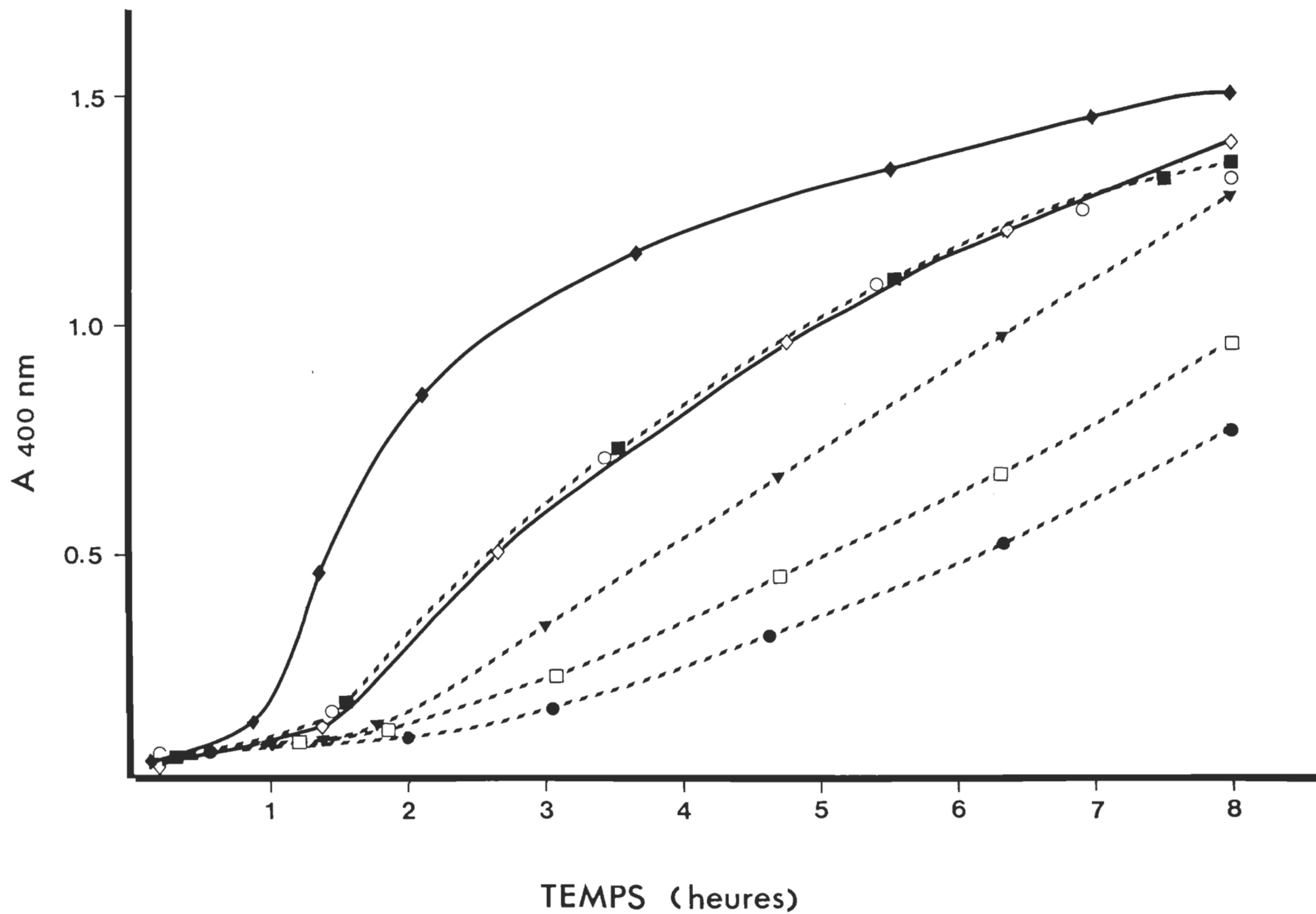


FIGURE 13B. Protection des virotoxines séparées sur la F-actine, contre l'effet destructeur de l'acide osmique. La cinétique de la réaction est suivie par spectrophotométrie à 20°C. F-actine, $2,2 \times 10^{-5}M$. La F-actine se trouve en solution dans: KCl 0,1M, $CaCl_2$ 0,2 mM, ATP 0,2 mM, $MgCl_2$ 1mM, tampon phosphate de potassium 25 mM, pH 6,3; virotoxines 1, 2, 3, 4, 5 et phalloïdine $2,2 \times 10^{-5}M$; OsO_4 , 3 mM. \blacklozenge — , F-actine; \blacktriangle — — —, F-actine et virotoxine 1; \bullet — — —, F-actine et virotoxine 2; \circ — — —, F-actine et virotoxine 3; \square — — —, F-actine et virotoxine 4; \blacksquare — — —, F-actine et virotoxine 5; \diamond — — —, F-actine et phalloïdine.



La figure 13 B montre une expérience analogue suivie par spectrophotométrie. Les courbes représentant la cinétique de la réaction entre l'acide osmique et l'actine sont divisées en deux groupes: d'abord celui constitué par les virotoxines 2 et 4 qui ralentissent beaucoup la réaction, ensuite les virotoxines 3, 5 et la phalloïdine qui ont une action beaucoup moins marquée. La virotoxine 1 exerce une protection intermédiaire.

Afin de montrer que l'inhibition de la réaction entre l'acide osmique et l'actine n'est pas due à une neutralisation de l'acide osmique par ces toxines, nous avons mélangé des virotoxines avec l'acide osmique et suivi la réaction au spectrophotomètre. Aucune réaction n'a pu être mise en évidence par cette méthode, même à une concentration de toxine 10 fois supérieure à celle de l'essai.

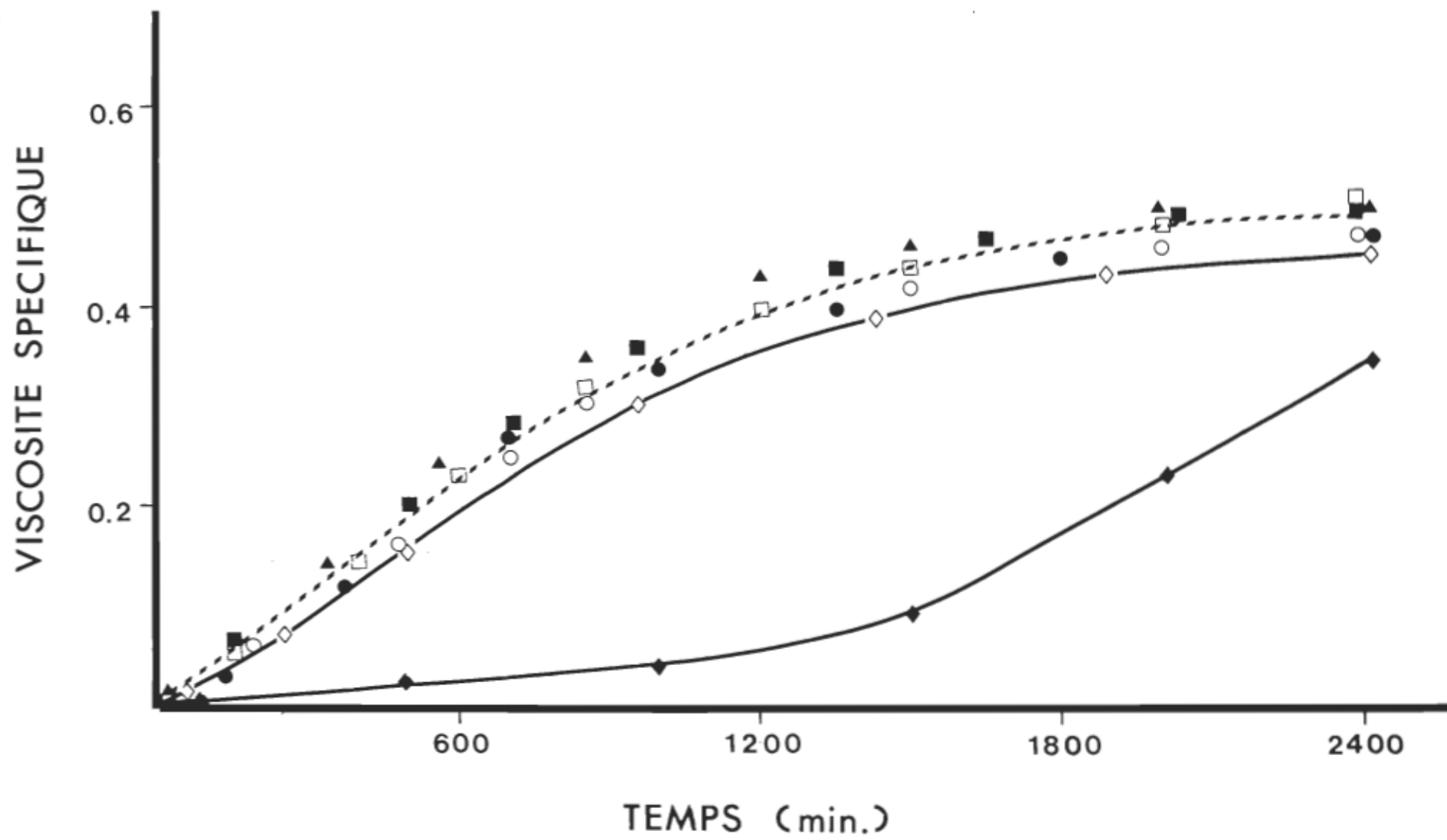
2.3.8 Mesure de l'influence des virotoxines séparées sur la vitesse de polymérisation de l'actine

La figure 14 représente l'effet des virotoxines 1, 2, 3, 4, 5 sur la vitesse de polymérisation de la G-actine, observée par viscosimétrie.

Ces résultats indiquent que les virotoxines 1, 2, 4, 5 accélèrent la vitesse de polymérisation de l'actine de manière aussi marquée que la phalloïdine. La virotoxine 3 est cependant légèrement moins efficace que les autres. L'expérience a été refaite plusieurs fois et est reproductible.

FIGURE 14. Accélération de la vitesse de polymérisation de l'actine par les virotoxines séparées, suivie par viscosimétrie à 25°C. G-actine, $2,2 \times 10^{-5}M$; $MgCl_2$, 0,8 mM; Virotoxines 1, 2, 3, 4, 5 et phalloïdine, $2,2 \times 10^{-5}M$.

◆ — , G-actine; ▲ — — , G-actine et virotoxine 1;
 ● — — — , G-actine et virotoxine 2; ○ — — — , G-actine et virotoxine 3; □ — — — , G-actine et virotoxine 4; ■ — — — , G-actine et virotoxine 5; ◇ — — , G-actine et phalloïdine.



3.0 CONCLUSION GÉNÉRALE DES RÉSULTATS

En résumé, nous avons montré que:

- Les virotoxines se lient à l'actine et donnent un spectre différentiel virotoxines-actine différent du spectre phalloïdine-actine.
- Les virotoxines protègent la F-actine contre l'iodure de potassium 0,6M, la cytochalasine B, la chaleur, la DNase I, la trypsine et l'acide osmique.
- Les virotoxines accélèrent la vitesse de polymérisation de la G-actine en F-actine. Dans les expériences faites par viscosimétrie, il arrive que les courbes de viscosité spécifique ne débutent pas à la même valeur, dans les mêmes conditions de molarité et de rapports actine-toxine. Il est normal que de tels écarts se manifestent d'une préparation d'actine à l'autre pour diverses raisons dont des différences dans la pureté de l'actine d'une préparation à l'autre, ainsi que dans son état de polymérisation. Cependant, malgré ces variations, chaque expérience était reproductible.
- Les virotoxines ont sensiblement la même efficacité, sauf en ce qui concerne la protection contre l'acide osmique, où les virotoxines 1 et 4 préservent beaucoup plus l'actine que leurs homologues 1, 3 et 5.
- L'effet de protection des virotoxines sur l'actine est optimum pour un rapport de 1 virotoxine: 1 actine. A des rapports plus élevés, l'efficacité des toxines augmente très peu.
- Les virotoxines ajoutées à de l'actine déjà polymérisée, augmentent encore le degré de polymérisation. La viscosité initiale la plus faible

est toujours donnée par la fraction 3 et la plus élevée presque toujours par la fraction 2.

- La phalloïdine est généralement moins efficace sur l'actine que les virotoxines.

CHAPITRE 4

DISCUSSION

Nos résultats montrent que les virotoxines que nous avons préparées ont qualitativement la même action sur l'actine in vitro que la phalloïdine.

Il est important de préciser que nous n'avons pas présenté les résultats des courbes sous forme de moyenne, à cause de la faible quantité de toxines disponibles (exemple: 0.5 mg de virotoxine 1, et 0.3 mg de virotoxine 5 pour toutes les expériences), ce qui limitait le nombre d'expériences. Toutefois, chaque expérience a été reproduite au moins trois fois et les résultats dans tous les cas étaient reproductibles. Les courbes illustrent donc une expérience représentative.

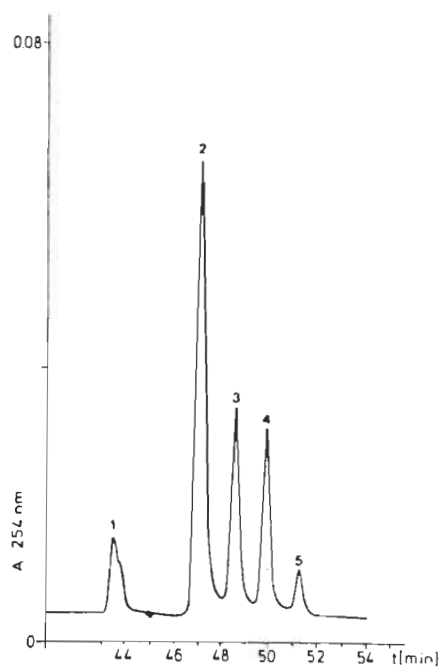
1.0 STRUCTURE DES VIROTOXINES

A la fin de notre expérimentation, nous avons appris que Faulstich et ses collaborateurs (30), de l'Institut Max Planck en Allemagne, avaient réussi à purifier les virotoxines par HPLC. La figure 15 A représente le diagramme d'élution obtenu par ces auteurs, comparativement au nôtre sur la figure 15 B. On constate que ces deux chromatogrammes sont presque identiques. En fait, la principale différence provient de la proportion des pics 3 et 4.

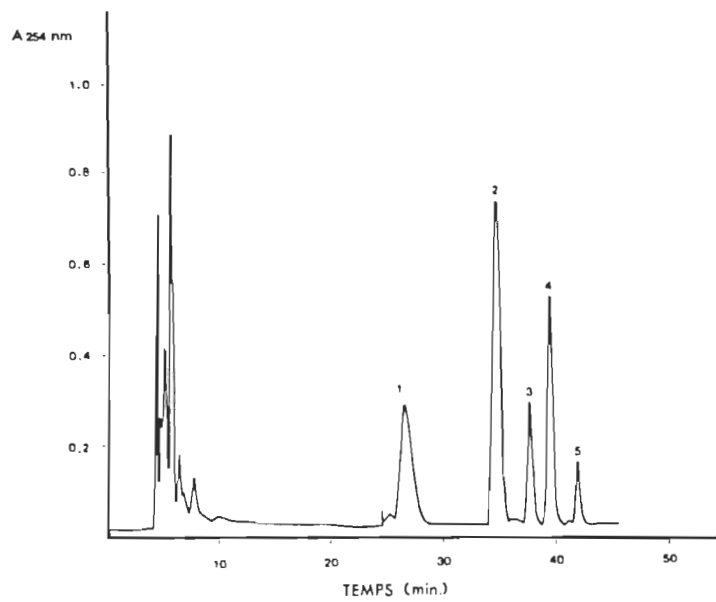
Dans notre exemple de diagramme d'élution, l'absorbance du pic 3 est inférieure à celle du pic 4, alors que dans les résultats de Faulstich, le pic 3 a une absorbance légèrement plus élevée que le pic 4. De plus, le pic 1 obtenu sur le chromatogramme de Faulstich possède un épaulement que nous n'avons pas observé sur notre chromatogramme. Une chromatographie sur couche mince du mélange de virotoxines extraites par ces auteurs a montré que celles-ci étaient formées de 6 composés, alors que

FIGURE 15. Chromatogramme d'un mélange de virotoxines obtenu par
Faulstich et coll., 1980 (A); comparé au nôtre (B)

A



B



nous en avons trouvé 5. Comme nos champignons n'ont pas été cueillis au même endroit que l'équipe d'Allemagne, nous pensons que ces différences peuvent provenir des origines du champignon lui-même. En effet, on sait que la composition en peptides de Amanita virosa est d'autant plus complexe qu'elle varie avec l'origine du champignon.

Faulstich et coll. (30) ont aussi identifié la structure générale des virotoxines, illustrée sur la figure 16 et dans le tableau 7. Si on compare la quantité relative de chaque virotoxine obtenue dans la purification de Faulstich et dans la nôtre, on s'aperçoit que le résultat est très similaire. Nous nous sommes donc basés sur les résultats de Faulstich pour identifier nos fractions en comparant la vitesse de migration des virotoxines. Ainsi, notre fraction 1 correspondrait à l'[ala¹]-viroïdine, la fraction 2 à la viroïsine, la fraction 3 à la désoxoviroïsine, la fraction 4 à la viroïdine et la fraction 5 à la désoxoviroïdine.

Ces auteurs ont aussi tracé le spectre d'absorption de la viroïsine (Figure 17A). On peut constater que ce spectre ressemble en tous points au nôtre (Figure 17B), avec un maximum près de 280 nm, suivi de deux épaulements à 295 et 305 nm. Finalement, il est important de noter que nous ne possédons aucune preuve chimique que nos toxines sont les mêmes que celles obtenues par Faulstich. Cependant, la similitude des résultats décrits ci-dessus nous permet de le croire.

FIGURE 16. Formule générale des virotoxines identifiée par Faulstich et coll., 1980.

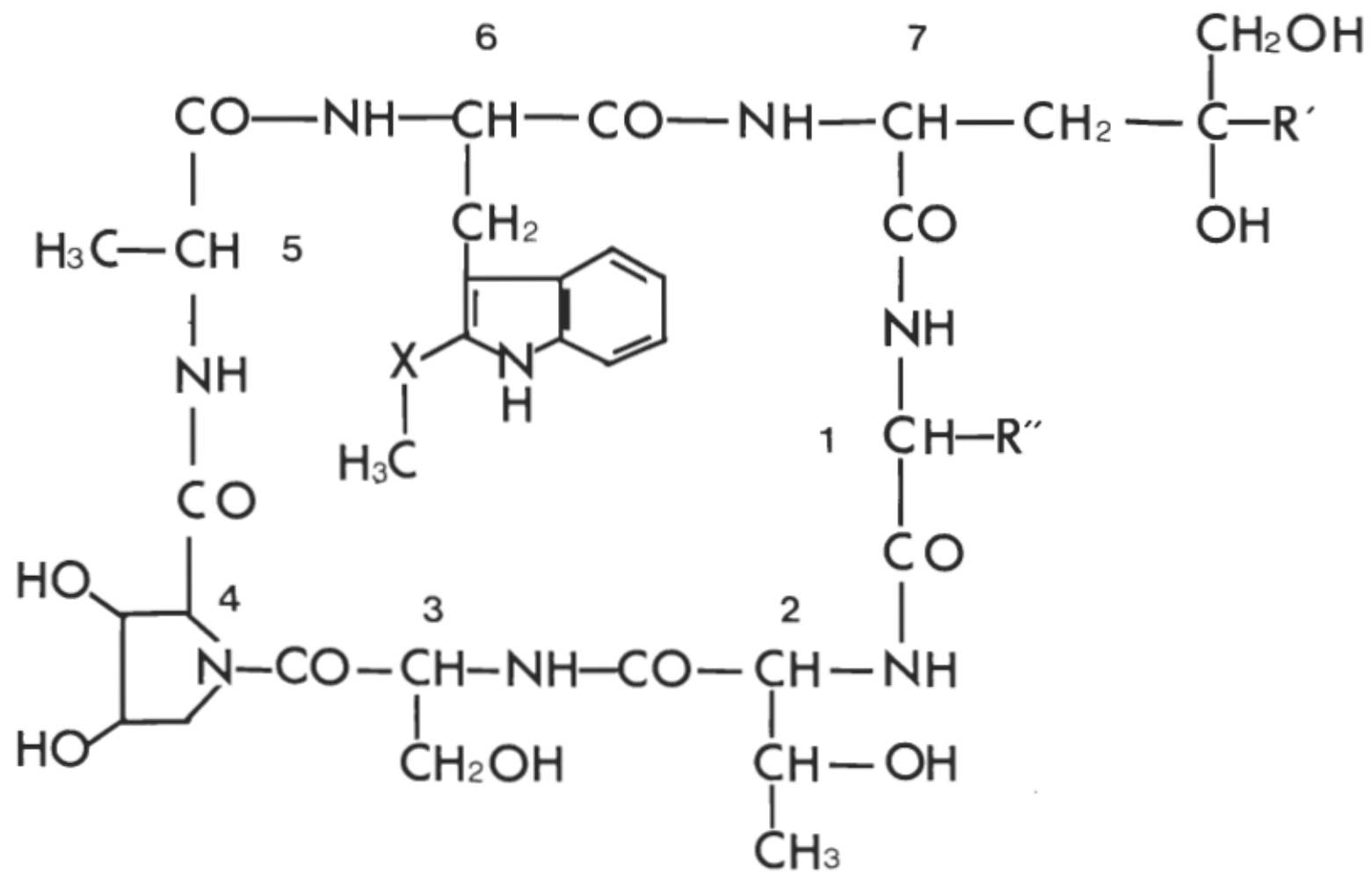
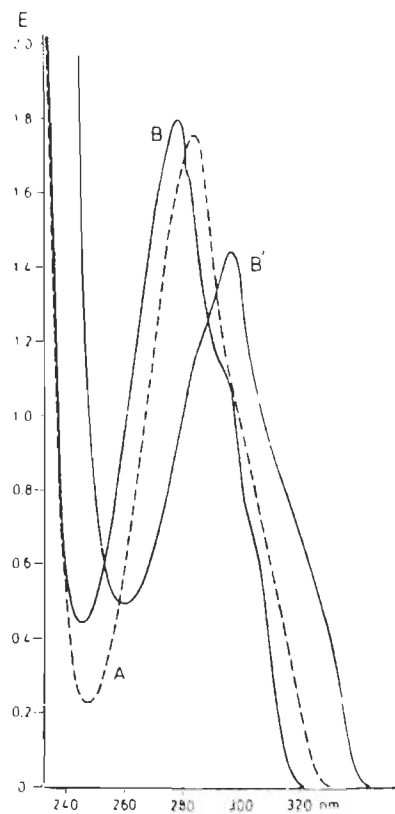


TABLEAU 7: Variabilité structurale des chaînes latérales des positions 1, 6 et 7 des virotoxines (Faulstich et coll., 30).

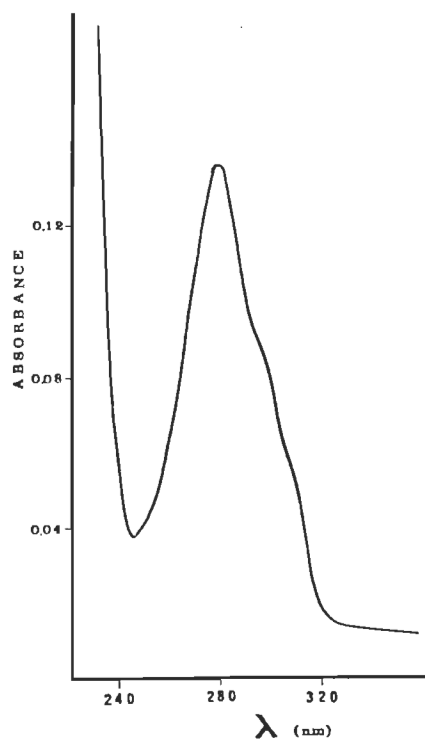
No. pic.	Composé	X	R'	R''	%
1	[Ala ¹] viroïdine	SO ₂	CH ₃	CH ₃	10%
1	[Ala ¹] desoxoviroïdine	SO	CH ₃	CH ₃	
2	viroïsine	SO ₂	CH ₂ OH	CH(CH ₃) ₂	49%
3	desoxoviroïsine	SO	CH ₂ OH	CH(CH ₃) ₂	19%
4	viroïdine	SO ₂	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	18%
5	desoxoviroïdine	SO	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	4%

FIGURE 17. (A), Spectre d'absorption U.V. de la phalloïdine sulfone (courbe A), de la viroïsine à pH 7 (courbe B) et de la viroïsine à pH 11 (courbe B') Faulstich et coll. 1980; (B) Spectre d'absorption U.V. de la viroïsine à pH 8,0, obtenu par nous.

A



B



2.0 ACTIVITÉ DES VIROTOXINES

2.1 Pureté des fractions

Nous avons vu qu'utilisées à concentration égale, les fractions A et B des virotoxines étaient moins actives que la phalloïdine et que la fraction B était plus active que la fraction A. Nous avons déjà publié ces résultats (48, 123). Nous croyons maintenant que la différence d'activité de ces deux fractions provient de la présence de plus d'impuretés chez la fraction A, puisque les virotoxines ont été purifiées en 5 composés par HPLC, et que ces composés ont en gros la même activité sur l'actine.

Nous nous sommes également demandés quel était le degré de pureté de notre phalloïdine, car cette toxine n'avait pas été purifiée par HPLC. Une analyse récente de la pureté de notre préparation de phalloïdine par HPLC a montré qu'elle était pure à 90%. Par conséquent, nous avons utilisé un rapport molaire phalloïdine-actine un peu plus faible. L'activité de la phalloïdine est sans doute supérieure à celle que nous avons mesurée.

2.2 Activité des virotoxines pures sur l'actine in vitro

Nos résultats montrent que les virotoxines pures ont qualitativement la même action sur l'actine in vitro que la phalloïdine. Il a d'ailleurs été démontré par Faulstich et coll. (27, 20) que les constantes de dissociation apparentes pour la phalloïdine et la viroïdine avec l'actine sont semblables ($K_d = 2 \times 10^{-8} M$). De plus, nos résultats montrent que toutes les virotoxines ont sensiblement la même activité sur l'actine in vitro,

sauf pour ce qui concerne l'effet des virotoxines sur la dégradation de l'actine par l'acide osmique:

2.2.1 Protection des virotoxines sur la F-actine contre la destruction par l'acide osmique

Nos résultats montrent que la viroisine (virotoxine 2) et la viroïdine (virotoxine 4) protègent beaucoup plus les filaments d'actine de la destruction par l'acide osmique que les autres virotoxines et la phalloïdine. La différence essentielle entre les virotoxines et les désoxovirotoxines est la nature du groupement X. (voir fig. 16). Pour la viroïdine et la viroïsine, le groupement X est un SO_2 , tandis que pour la désoxoviroïdine et la désoxoviroïsine, le groupement X est un SO . L'état d'oxydation du soufre dans cette molécule est donc important pour la protection contre l'acide osmique.

Par contre, la nature du groupe R' ne semble pas jouer un grand rôle, puisque la viroïsine et la viroïdine qui ont des groupes R' différents, CH_2OH et CH_3 , ont la même activité.

Or, l' $[\text{ala}^1]$ -viroïdine possède un groupement X qui est un SO_2 , mais ne fournit qu'une protection intermédiaire sur la F-actine contre la destruction par l'acide osmique. Puisque des changements dans la nature du groupe R' ne semblent pas modifier l'activité des peptides, nous pensons donc que la différence d'activité de l' $[\text{ala}^1]$ -viroïdine comparée à la viroïdine et la viroïsine provient de la nature du groupe R'' . Pour la viroïdine et la viroïsine, R'' est représenté par un $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, alors que l' $[\text{ala}^1]$ -viroïdine possède un CH_3 dans cette position.

- Hypothèse sur le mécanisme de protection des virotoxines sur la F-actine contre la destruction par l'acide osmique.

Nous avons vu que le principal effet des virotoxines est de prolonger le temps de latence de la réaction entre la F-actine et l'acide osmique (Fig. 13). Puisque la viroïdine et la viroïsine prolongent davantage ce temps de latence que les autres virotoxines et la phalloïdine, on peut émettre les hypothèses suivantes:

Première hypothèse

Puisque le tétroxyde d'osmium est un oxydant très puissant, la différence d'activité de ces toxines pourrait être due à une destruction des virotoxines par l'acide osmique, en particulier des toxines qui possèdent le groupe SO?

Nous avons cherché à mettre en évidence une interaction entre l'acide osmique et les virotoxines en mélangeant ces deux composés à fortes concentrations. Nous n'avons noté aucune formation de noir d'osmium après plusieurs heures. Cependant, on ne peut pas exclure une réaction entre l'acide osmique et les virotoxines qui ne conduirait pas à la formation de noir d'osmium. En effet, M. Bahr (7) considère que l'apparition du noir d'osmium représente un des critères d'interaction entre une substance et l'acide osmique. S'il en est ainsi, les différences d'activités observées entre les virotoxines pourraient être dues à la structure même de la molécule. Ceci n'est probablement pas le cas car on devrait noter aussi une forte différence dans les autres expériences. Néanmoins, une dernière vérification pourrait être faite en préincubant

les virotoxines avec l'acide osmique et en analysant par la suite leur activité.

Deuxième hypothèse

La cinétique de la réaction entre l'actine et l'acide osmique suivie par spectrophotométrie donne une courbe d'aspect sigmoïdal avec un temps de latence (Figure 13). On peut remarquer que la réaction s'accélère au bout de 2 heures, ce qui correspond au temps où la viscosité spécifique tend vers zéro, c'est-à-dire lorsque les filaments d'actine sont fortement fragmentés. On peut penser que la F-actine contiendrait au moins deux types de sites réactionnels pour l'acide osmique. En premier lieu, il existerait un ou des sites immédiatement accessibles au fixateur. La réaction de ce dernier avec ces sites provoquerait la rupture du filament d'actine et la libération subséquente des autres sites réactionnels. Ceux-ci, plus nombreux, entraîneraient une accélération de la réaction. Il est donc possible que les virotoxines, comme la phalloïdine, protègent surtout les sites superficiels de l'actine. Une fois que ces sites ont réagi, les toxines n'exerceraient plus de protection sur les autres sites. Cette hypothèse expliquerait la diminution de protection des toxines après un certain temps d'incubation avec le fixateur.

- Utilité des virotoxines pour améliorer la qualité de la fixation des cellules en microscopie électronique.

Selon Porter et Kallman (101), ainsi que Bahr (7), la fixation de cellules par l'acide osmique entraîne une solubilisation et une extraction des protéines cellulaires. De plus, il a été démontré par Maupin-Szamier et Pollard (89) que l'acide osmique détruisait la F-actine

in vitro. Puisque l'actine constitue un élément essentiel de la cellule et que l'acide osmique est un fixateur universellement répandu en microscopie électronique, il est donc possible que l'observation de la protéine ait été rendue impossible dans plusieurs cellules.

Bien que nos résultats montrent que les virotoxines protègent la F-actine contre l'attaque de l'acide osmique, nous ne sommes pas sûrs qu'elles pourraient être efficaces pour améliorer la fixation des cellules et ceci pour deux raisons. D'abord, l'usage des virotoxines est limité par le fait qu'elles sont imperméables à la plupart des cellules. Ces résultats proviennent d'expériences faites avec les virotoxines brutes. Deuxièmement, l'observation de filaments d'actine dans une cellule fixée en présence de virotoxines ne signifie pas nécessairement que ces toxines soient efficaces pour la visualisation des filaments. En effet, il est difficile de savoir si ceux-ci ont été formés par suite de l'action des virotoxines ou s'ils ont été protégés contre l'effet de fixateur. Gicquaud et coll. (47) en étaient arrivés aux mêmes conclusions avec la phalloïdine. Il faut donc être prudents quant à l'interprétation des résultats concernant l'effet des virotoxines sur l'actine par microscopie électronique.

2.2.2 Variations de viscosité initiale

L'étude de l'effet des virotoxines sur la dégradation de l'actine par l'acide osmique représente la seule expérience où l'on a observé des différences marquées de protection chez les virotoxines. On ne peut donc dire de façon générale que telle virotoxine est plus active qu'une autre. Cependant, nous avons aussi noté, dans les expériences de viscosimétrie, des variations de la viscosité spécifique initiale de la solution de

F-actine, en présence des virotoxines. Ainsi, la viscosité spécifique initiale la plus élevée était presque toujours donnée par la virotoxine 2 et la plus faible par la virotoxine 3. Il serait donc possible que la virotoxine 3 complète moins la polymérisation de l'actine que les autres virotoxines.

3.0 Toxicité des virotoxines

Dans notre article sur l'étude des fractions A et B des virotoxines (48), Mme Tuchweber a mis en évidence la toxicité de ces fractions chez la souris, par injection intra-péritonéale. Les résultats montrent que la fraction A cause 90% de mortalité pour des concentrations de 8.5 mg / kg et que la fraction B cause 100% de mortalité à des concentrations de 5 mg / kg. L'autopsie a révélé que le seul organe affecté était le foie, qui devenait de couleur rouge sombre, en raison de l'accumulation d'érythrocytes. En conclusion, il ressort de ces travaux que nos fractions de virotoxines ont les mêmes effets toxiques que la phalloïdine.

Faulstich et coll. (30) ont étudié la toxicité in vivo de la viroïsine, par injection intrapéritonéale de la toxine chez la souris blanche. Leurs résultats montrent une valeur de LD50 identique à celle de la phalloïdine, c'est-à-dire 2.5 mg / kg. De plus, dans les deux cas les animaux mouraient d'une sévère hémorragie du foie, de 2 à 5 heures après l'administration de viroïsine ou de phalloïdine.

Ces auteurs n'ont utilisé que la viroïdine dans leurs études de toxicité à cause de la plus grande abondance de cette toxine. Cependant, il a déjà été démontré par Low et Wieland (22, 77) pour les composés de la famille des phallotoxines, que plus une toxine était active sur l'actine, plus elle était toxique. Puisque nos résultats montrent que l'interaction des virotoxines séparées avec l'actine est sensiblement la même pour toutes les toxines, nous croyons que leur toxicité pourrait être la même.

4.0 Mécanisme de toxicité des virotoxines

D'après Faulstich et coll. (30, 33, 34, 141), l'interaction des phallotoxines avec l'actine des cellules du foie, représente probablement la cause de leur toxicité. En effet, on sait que l'actine joue un rôle dans l'élaboration du cytosquelette de l'hépatocyte, entre autre au niveau du canalicule biliaire, et dans le maintien des microvillosités. De plus, elle participe aux phénomènes de motilité intracellulaire comme la sécrétion biliaire. La présence de phalloïdine dans l'hépatocyte entraîne la polymérisation irréversible de l'actine, donc une accumulation de filaments, auxquels on attribue une large part dans certains événements comme: la perte de microvillosités, l'altération du canalicule biliaire, la vacuolisation et l'endocytose (43, 105, 121, 134, 140).

Puisque nos études in vitro et les études in vivo de Tuchweber et coll. (en cours de publication) montrent que les virotoxines se comportent de la même façon que la phalloïdine, nous pensons que le mécanisme de toxicité des virotoxines est le même que celui de la phalloïdine, bien que la structure de ces deux groupes de peptides soit différente.

5.0 Mode d'interaction des virotoxines avec l'actine au niveau moléculaire

D'après Faulstich et coll. (30), si les effets biologiques des virotoxines et de la phalloïdine sont identiques, le mode d'interaction au niveau moléculaire de ces deux peptides avec l'actine serait différent. La phalloïdine est un peptide bicyclique rendu rigide par le pont thio éther entre le tryptophane⁶ et la cystéine³ (Fig. 18 a). Selon Faulstich et Wieland (23), la phalloïdine se lierait de manière rigide avec l'actine par l'intermédiaire de 4 groupes fonctionnels: la cystéine³, le méthyl de l'alanine⁵, l'alcohydroxy de la proline⁴ et le groupe indole du tryptophane⁶. La rupture du pont thio indole rend la molécule monocyclique et plus flexible, supprimant ainsi son interaction avec l'actine et toute activité biologique.

D'après le spectre différentiel U.V. représentant le lien des virotoxines à l'actine, le groupe indole fait aussi partie du site liant. On pense que les autres parties essentielles pour le lien de la phalloïdine avec l'actine sont aussi impliquées chez les virotoxines, quoiqu'on n'ait pas encore de preuve à ce sujet (33, 34). Cependant, les virotoxines étant dépourvues du pont thio indole possèdent une nature monocyclique (Fig. 18 B). On suppose donc que la topologie du site liant doit posséder plus de flexibilité que dans la phalloïdine. En conséquence, on pensait que les virotoxines montreraient une plus faible affinité à l'actine. Or, nos résultats montrent que les virotoxines possèdent une activité égale ou supérieure avec l'actine que la phalloïdine. Ceci peut être expliqué par la présence de sites additionnels d'interaction avec l'actine, absents

FIGURE 18. Structure de la phalloïdine (A), comparée à 1' [ala¹]-viroïdine (B). Les parties probablement impliquées dans le lien à l'actine sont indiquées par des lettres ou des traits plus foncés. Les parties qui contribuent spécialement au lien de 1' [ala¹]-viroïdine à l'actine sont indiquées par des lettres ouvertes (Faulstich et coll. 1981).

chez la phalloïdine. Ces sites peuvent être: la chaîne latérale de la D-sérine et le groupe hydroxy additionnel de la proline (Fig. 18 B). Buku a fourni une évidence préliminaire pour cette hypothèse (12). Un analogue des virotoxines, préparé à partir de la phalloïdine ne possédant pas le second groupe hydroxy de la proline et contenant de la L-alanine au lieu de la D-sérine, était complètement dépourvu d'activité biologique.

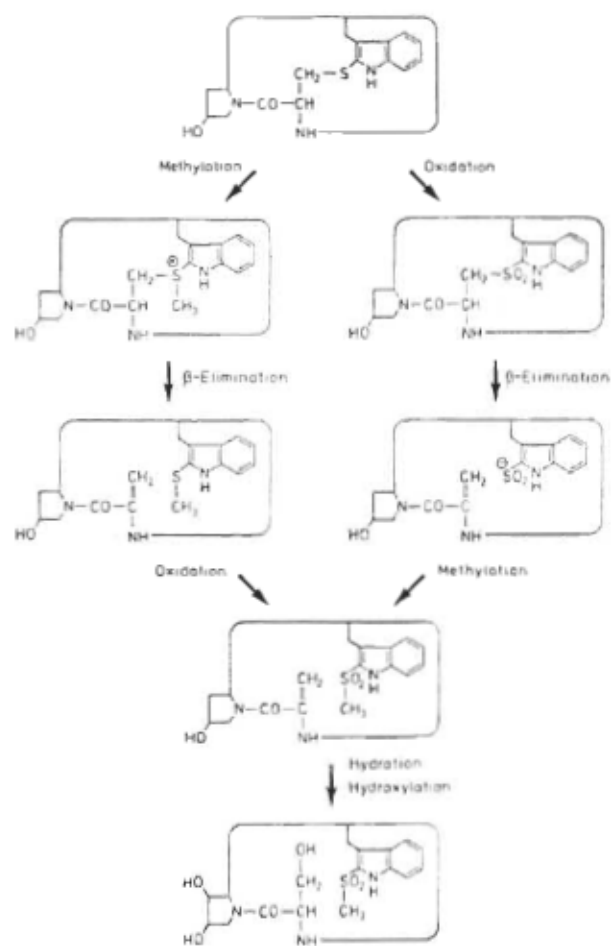
Selon Faulstich et coll. (30), la plus grande flexibilité du cycle des virotoxines leur permettait de s'adapter au site actif de l'actine, par un mécanisme d'induction qui serait renforcé par les fonctions hydroxy supplémentaires.

6.0 Biosynthèse ou origine des virotoxines pour le champignon *Amanita virosa*

Selon Faulstich et coll. (33), environ 60% de la structure de la viroisine est composée d'acides aminés présents chez les phallotoxines alors que 40% des acides aminés restant contiennent de nouvelles parties qui, cependant, sont apparentées à celles trouvées chez les phallotoxines. Pour ces raisons, les auteurs croient que les virotoxines peuvent être engendrées des phallotoxines, ou, au moins, proviennent de molécules précurseurs communes. La figure suivante montre deux séquences métaboliques qui pourraient convertir les phallotoxines en virotoxines.

Quoiqu'il en soit, le champignon *Amanita virosa* possède deux groupes de peptides toxiques montrant la même activité biologique, mais différant distinctement dans leur structure. Puisqu'on a détecté aucun constituant ou intermédiaire sans activité biologique, il semble probable que la nature ait produit et préservé ces peptides pour une fonction physiologique qui demeure inconnue.

FIGURE 19. Deux séquences de réactions métaboliques pouvant convertir les phallotoxines en virotoxines (Faulstich et coll., 1981).



7.0 CARACTERISATION DU CHAMPIGNON AMANITA VIROSA

Il a été montré que la β , la γ et l' ϵ - amanitine, trois des amatoxines considérées parmi les plus toxiques chez le champignon Amanita phalloïdes, sont absentes chez l'espèce Amanita virosa (25, 151). Par contre le champignon Amanita virosa provenant d'Europe contient une quantité considérable d' α -amanitine, une autre amatoxine naturelle très toxique, ainsi qu'un nouveau peptide identifié récemment par Buku comme de l'amaninamide (13). L'Amanita virosa provenant d'Amérique du Nord ne renferme pas d'amanitines, mais seulement de l'amaninamide. Selon Buku, il est possible que l'amaninamide d'Amanita virosa soit le précurseur de l' α -amanitine, par suite d'une réaction d'hydroxylation. Cette réaction serait possible chez le champignon Amanita virosa européen, mais pas chez son homologue d'Amérique du Nord.

Puisque le champignon Amanita virosa diffère largement de l'Amanita phalloïdes dans son contenu en amatoxines, en phallotoxines et par la présence des virotoxines, il est possible que ce champignon représente ainsi une espèce différente.

CONCLUSION

Les résultats de nos travaux démontrent que les virotoxines, comme la phalloïdine, se lient à l'actine, accélèrent la vitesse de polymérisation de l'actine G en actine F et stabilisent cette dernière contre des conditions physiques et chimiques qui normalement dépolymérisent ou déstabilisent le filament d'actine. Bref, les virotoxines ont qualitativement la même action sur l'actine in vitro que la phalloïdine. Utilisées à concentrations égales, les virotoxines sont au moins aussi actives que la phalloïdine. Quoiqu'il en soit, malgré le fait que la phalloïdine et les virotoxines aient qualitativement la même action sur l'actine in vitro, la différence de structure de ces deux groupes de peptides suggère que leur mécanisme d'interaction avec l'actine doit être différent.

D'autre part, nous avons montré que les cinq virotoxines sont toutes aussi actives sur l'actine, malgré la variabilité de leurs chaînes latérales, sauf en ce qui concerne la protection contre la dégradation par l'acide osmique, où la viroïsine et la viroïdine préservent beaucoup plus l'actine que leurs homologues désoso.

Cette recherche revêt donc une triple importance. Premièrement, elle nous a permis de mieux caractériser le champignon Amanita virosa qui semble être une espèce unique par son contenu en toxines. Ainsi, il serait donc possible d'utiliser ce champignon en chemotaxonomie, en particulier pour le distinguer de champignons morphologiquement très semblables, comme l'Amanita bisporigera. De plus, les virotoxines en stabilisant la F-actine représentent un outil supplémentaire pour étudier le rôle de l'actine dans la cellule et, par conséquent, de l'appareil

contractile. Finalement, les résultats de nos travaux apportent une contribution à l'élucidation du mécanisme d'interaction des virotoxines. Il va sans dire que des recherches ultérieures s'imposent afin de mieux comprendre ce mécanisme d'interaction, ainsi que le mécanisme d'empoisonnement par les amanites.

BIBLIOGRAPHIE

1. AGOSTINI, B., V.M. Govindan and W. Hofmann (1975). Morphological changes induced by phalloidin in the rat liver. In Pathogenesis and Mechanisms of liver Cell Necrosis (D. Keppler, ed.), pp. 175-192. MTP Press, Lancaster, p. 175-192.
2. AGOSTINI, B., V.M. Govindan, W. Hofmann and T. Wieland (1975). Phalloidin-induced proliferation of actin filaments within rat hepatocytes. Z. Naturforsch., 30c, 793-795.
3. ALEXOPOULOS, C.J. and C. Mims (1979). Introductory mycology, third edition, John Wiley and Sons, 461-462.
4. ALLISON, A.C. (1973). The role of microfilaments and microtubules in cell movement, endocytosis and exocytosis. Ciba Foundation, Symp. 14, Amsterdam-London-New-York, Assoc. Sci. Publ., 109-112.
5. ARENA, J.M. (1974). Poisoning toxicology symptoms and treatments. Third edition, Charles C. Thomas, U.S.A., 500-502
6. ASAKURA, S. (1961). F-actin adenosine triphosphate activated under sonic vibration. Biochim. Biophys. Acta, 52, 65-75.
7. BAHR, G. (1954). Osmium tetroxide and ruthenium tetroxide and their reactions with biologically important substances. Exptl. Cell. Res.

- 7, 457-479.
8. BARBANTI-BRODANO, G., M. Derenzini and L. Fiume (1974). Toxic action of a phalloidin-albumin conjugate on cells with a high protein uptake. *Nature (London)* 248, 63-65.
 9. BENDALL, J.R. (1970). *Muscles Molecules and Movement*, 2e édition, Heinemann Educational Books Ltd, Londres, 1-219.
 10. BRENNER, S.L. and E.D. Korn (1979). The effects of cytochalasins on actin polymerization and action. ATPase provide insights into the mechanism of polymerization. *J.Biol.Chem.* 255 (3), 841-844.
 11. BROSSEAU, M. communication personnelle.
 12. BUKU, A., unpublished results. Ref. 150, 190.
 13. BUKU, A., T. Wieland, H. Bodenmuller and H. Faulstich (1980). Amaninamide, a new toxin of Amanita virosa mushrooms. *Experientia.* 36, 33-34.
 14. DANCKER, P. and M. Hoffmann (1973). Interaction of Actin and Myosin in the Absence and Presence of ATP. *Z. Naturforsch.* 28c, 401-421.
 15. DANCKER, P. and I. Low (1979). Complex influence of cytochalasin B on actin polymerization. *Z. Naturforsch.* 34c, 555-557.

16. DANCKER, P., I. Low, W. Hasselbach and T. Wieland (1975). Interaction of actin with phalloidin; polymerization and stabilization of F-actin. *Biochim. Biophys. Acta* 400, 407-414.
17. DE VRIES, J. and T. Wieland (1978). Influence of phallotoxins and metal ions on the rate of proteolysis of actin. *Biochem.* 17, 1965-1968.
18. DE VRIES, J.X., A.J. Schafer, H. Faulstich and T. Wieland (1976). Protection of actin from heat denaturation by various phallotoxins. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 357, 1139-1143.
19. ELZINGA, M., J.H. Collins, W.M. Kuehl and R.S. Adelstein (1973). Complete Amino-Acid Sequence of Actin of Rabbit Skeletal Muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70, 2687-2691.
20. ENEEL, J., H. Fasold, F.W. Hulla, F. Waechter and A. Wegnes (1977). The polymerization reaction of Muscle Actin. *Mol. Cell. Biochem.* 18, 3-13.
21. FAHRENHOLZ, F., H. Faulstich and T. Wieland (1971). Components of the green deathcap Toadstool, Amanita phalloides. *Justus Liebigs Ann. Chem.* 743, 83-94.
22. FAULSTICH, H. and T. Wieland (1971). Relation of toxicity and conformation of phallotoxins as revealed by optical rotatory dispersion studies. *Eur. J. Biochem.* 22, 79-86.
23. FAULSTICH, H. and T. Wieland (1975). Peptides, Chemistry Structure and Biology (R. Walter and Meienhofer, J. Eds) Ann. Arbor

Science Publishers, Ann. Arbor M I. 927-933.

24. FAULSTICH, H. and T. Wieland (1978). Amatoxins, phallotoxins, phalloalysin and antamanide; the biologically active components of poisonous Amanita mushrooms. CRC Critical Rev. Biochem. 5, 184-260.
25. FAULSTICH, H., W. Jahn and S. Zebely. The uptake of Amanita toxins by the perfused rat liver, in preparation. Référence 24, page 230.
26. FAULSTICH, H., E. Nebelin and T. Wieland (1973). Peptide-synthesen LIV. Synthesen einiger Analoga des Norphalloins. Justus Liebigs Ann. Chem. 50-58.
27. FAULSTICH, H., A.J. Schafer and M. Weckauf (1977). The dissociation of the phalloidin-actin complex. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 181-184.
28. FAULSTICH, H., T. Wieland and C.H. Jochum (1968). Components of green Amanita. XXXIV. Indoles in comparaison with Amanita poisons. 7. The Sulfoxides amanine and amanitines. Justus Liebigs Ann. Chem. 713, 186-195.
29. FAULSTICH, H., C. Wilbertz and B. Ungemach. Growth inhibition of cultured hepatocytes by Amanita toxins and their derivatives. Experimentia, in press.
30. FAULSTICH, H., A. Buku, H. Bodenmuller and T. Wieland (1980). Virotoxins: actin-binding cyclic peptides of Amanita virosa Mushrooms. Biochem. 19, 3334-3343.
31. FAULSTICH, H., D. Georgopoulos, M. Bloching and T. Wieland (1973).

- Quantitative chromatographic analysis of toxins in single mushrooms of Amanita phalloides. J. Chromat. 79, 257-265.
32. FAULSTICH, H., D. Georgopoulos, M. Bloching and T. Wieland (1974). Analysis of the toxins of amanitin containing mushrooms. Z. Naturforsch C. Biosci. 29c, 86-88.
 33. FAULSTICH, H., A. Buku, H. Bodenmuller, J. Dabrowski and T. Wieland (1979). Structure and biological activity of virotoxins. Pept., Struct. Biol. Funct. Proc. Am. Pept. Symp. 6th, Edited by Groves, Erhard, Meienhofer, Johannes, Pierce Chem. Co.: Rockford III, pp. 137-140.
 34. FAULSTICH, H., A. Buku, H. Bodenmuller, J. Dabrowski and T. Wieland (1981). New toxic cyclopeptides from Amanita virosa mushrooms. Structure and activity of natural peptides. Ed. W. Voelter, G. Weitzel. pp. 189-199.
 35. FAULSTICH, H., T. Wieland, H. Schimassek, A.K. Walli and N. Ehler (1977). Mechanism of phalloidin intoxication in: Membrane alteration as barrier of liver injury, Falk-Symposium NO. 22, MTP Press Ltd., Lancaster, 301.
 36. FLANAGAN, M.D. and Lin Shin (1980). Cytochalasins block actin filament elongation by binding to high affinity sites associated with F-actin. J. Biol. Chem. 255 (3), 835-838.
 37. FRIMMER, M. (1972). Temperature dependance of potassium depletion in the phalloidin poisoned perfused rat liver. Schmiedeberg's Arch. Pharmakol. 272, 354.

38. FRIMMER, M. (1979). Phalloidin, a liver specific fungal toxin. *Biologie in unserer Zeit* 9, 147-152.
39. FRIMMER, M. and R. Kroker (1973). Phalloidin poisoning of isolated hepatocytes; lack of enzyme release. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 279, 99.
40. FRIMMER, M., S. Herrmann and F. Lutz (1973). Release from the phalloidin Poisoned Rat Liver of a Cytotoxic Principle Producing Liver Cell Swelling, Potassium Release and Hemolysis. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 276, 187-197.
41. FRIMMER, M., J. Gries, D. Hegner and B. Schner (1967). The mechanism of action of phalloidin. Release of lysosomal enzymes and potassium. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 258, 197-214.
42. FRIMMER, M., E. Petzinger, K. Ziegler and J.B. Veil (1980). Uptake of ³H-Demethylphalloin by isolated hepatocytes in the presence of various concentrations of phalloin or phalloidin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 311, 91-94.
43. GABBIANI, G., R. Montesano, B. Tuchweber, M. Salas and L. Orci (1975). Phalloidin-induced hyperplasia of actin filaments in rat hepatocytes. *Lab. Invest.* 33, 562-569
44. GENDREAU, M., A. Turcotte, C. Gicquaud and S. St-Pierre (1981). Séparation des peptides toxiques de l'*Amanita virosa* par chromatographie liquide à haute performance. 49e congrès de l'ACFAS, Sherbrooke.

45. GERGELY, J. (1977). Molecular aspects of muscle contraction and regulation. *Basic Res. Cardiol.* 72, 109-117.
46. GICQUAUD, C., J. Gruda et D. Begin (1980). Mise en évidence par microscopie électronique de l'effet de la phalloïdine sur la protéolyse de l'actine. *Biol. Cel.* 37, 297-298.
47. GICQUAUD, C., J. Gruda et J.M. Pollender (1980). La phalloïdine protège la F-actine contre les effets destructeurs de l'acide osmique et du permanganate. *Eur. J. Cell. Biol.* 20, 234-239.
48. GICQUAUD, C., A. Turcotte, B. Tuchweber et J. Gruda (1982). Effets in vivo et in vitro d'extraits de peptides de Amanita virosa. *Rev. Can. Biol. Exptl.* 41, 23-34.
49. GOVINDAN, V.M. and T. Wieland (1975). Isolation and Identification of an actin from Rat liver. *FEBS Letters* 51, 117-119.
50. GOVINDAN, V.M., G. Rohr, T. Wieland and B. Agostini (1973). Binding of a phallotoxin to protein filaments of plasma membrane of liver cell. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 354, 1159-1161.
51. GOVINDAN, V.M., H. Faulstich, T. Wieland, B. Agostini and W. Hasselbach (1972). In vitro effect of phalloidin on a plasma membrane preparation from rat liver. *Naturwissenschaften* 59, 521-522.
52. GRAVELA, E. and G. Poli (1977). Phalloidin poisoning of isolated hepatocytes: inhibition of protein synthesis. *Experientia*, 33, 603-604.
53. GRAVELA, E., M.F. Zuretti and G. Poli (1975). Early polyribosomal

- and lysosomal changes in the liver of rats poisoned with Amanita phalloides or phalloidin. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 12, 101-110.
54. GRUDA, J., J.M. Pollender et D. Begin (1979). Préparation à partir d'Amanita virosa de substances analogues aux phallotoxines. 47e Congrès de l'ACFAS.
 55. GRUDA, J., J.M. Pollender, C. Gicquaud and D. Begin (1979). Protection of F-actin by phalloidin and related peptides from Amanita virosa. XIth International Congress of Biochemistry. Toronto.
 56. HANSON, J. and J. Lowy (1963). The Structure of F-Actin and of Actin Filaments Isolated from Muscle. J. Mol. Biol. 6, 46-50.
 57. HARWELL, O.D., M.L. Sweeney and F.H. Kirkpatrick (1980). Conformation changes of actin during formation of filaments and paracrystals and upon interaction with DNase I, cytochalasin B, and phalloidin. J. Biol. Chem. 255 (3), 1210-1220.
 58. HEBER, H., H. Faulstich and T. Wieland (1974). Synthesis of further analogues of norphalloin. Int. J. Pept. Protein Res. 6, 381-389.
 59. HEIM, R., (1978). Les champignons toxiques et hallucinogènes. Société nouvelle des éditions Bouëpie, Paris, pp. 210.
 60. HOMANN, J. and M. Frimmer (1975). Glucose-6-phosphatase (E.C. 3.1.3.9) and esterase (E.C.3.1.1.1) activities of microsomes prepared from perfused rat livers after partial out flow block of phalloidin poisoning. Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 288, 87-96.

61. HUXLEY, H.E. (1957). The double assay of filaments in cross-striated muscle. J. Biophys. Biochem. Cytol. 3, 631-648.
62. HUXLEY, H.E. (1969). The Mechanism of Muscular Contraction. Science 164, 1356-1366.
63. JAHN, W. and A. Lengsfeld (1974). Untersuchung der von den perfusionsbedingungen abhängigen aufnahme und abgabe hochmolekularer substanz an der, isobilierten rattenleber. Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmakol. 281, 241-256.
64. KAWAMURA, M. and K. Maruyama (1970). Polymorphism of F-actin. Three forms of paracrystals. J. Biochem. 68, 885-899.
65. KESSEL, R.G. and C.V. Shih (1974). Scanning electron microscopy in biology. Springer, Berlin, Heidelberg, New-York, 71-80.
66. KURODA, M. and K. Maruyama (1972). Polymorphism of F-actin II. ATPase activity at acid pH. J. Biochem. 71, 39-45.
67. LAKI, K. (1971). Contractile proteins and muscle, Laki, K., ed., Marcel Dekker Inc., New-York, 97-133.
68. LAZARIDES, R. and V. Lindberg (1974). Actins, the naturally occurring inhibitor of desoxyribonuclease I. Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 71, 4742-4746.
69. LEBRUN, D. et A.M. Guérineau (1981). Champignons du Québec et de l'est du Canada, éditions France-Amérique, Montréal, 72-73.
70. LEESON, T.S. and E.S. Leeson (1971). Histologie, éditeurs: Masson et Cie, Paris, 325-330.

71. LEHNINGER, A.L. (1972). Biochimie, Flammarion Médecine-Sciences, Paris, 97, 169-434.
72. LENGSELD, A. and W. Jahn (1974). Endocytose an der isoliert perfundierten Rattenleber nach phalloidin vergiftung. Cytobiologie A. Exp. Zellforsch 9, 391.
73. LENGSELD, A.M., I. Low, T. Wieland, P. Dancker and W. Hasselbach (1974). Interaction of phalloidin with actin. Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.) 71, 2803-2807.
74. LINDBERG, V. (1974). Purification of an inhibitor of pancreatic deoxyribonuclease from calf spleen. Biochim. Biophys. Acta 82, 237-248.
75. LOUISOT, P. (1972). Biochimie Structurale, vol. 5, Simep-Editions, Lyon, 24-30.
76. LOW, I. and P. Dancker (1976). Effect of cytochalasin B on formation and properties of muscle F-actin. Biochem. Biophys. Acta 430, 361-374.
77. LOW, I. and T. Wieland (1974). The interaction of phalloidin, some of its derivatives and of other cyclic peptides with muscle actin as studied by viscosimetry. FEBS Letters 44, 340-343.
78. LOW, I., P. Dancker and T. Wieland (1975). Stabilization of F-actin by phalloidin; reversal of the destabilizing effect of cytochalasin B. FEBS Letters 54, 263-265.
79. LOW, I., P. Dancker and T. Wieland (1976). Stabilization of actin polymer structure by phalloidin: ATPase activity of actin induced by phalloidin at low pH. FEBS Letters 65 (3), 358-360.

80. LOW, I., A. Lengsfeld and T. Wieland (1974). Prevention by aging or by cytochalasin B of phalloidin stimulated formation of micro-filaments in cell membrane preparation of rat liver. *Histochemistry* 38, 253-258.
81. LOW, I., W. Jahn, T. Wieland, S. Sekita, K. Yoshihira and S. Natori (1979). Interaction between rabbit muscle actin and several chaetoglobosins or cytochalasins. *Anal. Chem.* 95, 14-18.
82. LUTZ, G., H. Glossmann and M. Frimmer (1972). Binding of ^3H -Desmethylphalloin to isolated plasma membranes from rat liver. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 273, 341-351.
83. MALAK, S.H.A. (1976). Occurrence of phallotoxins in American collections of Amanita virosa. *Planta Med.* 29, 80-85.
84. MANNHERZ, H.G., W. Habsch and R. Lebermann (1977). Crystals of skeletal muscle actin: pancreatic DNase I complex. *FEBS Letters* 73, 141-143.
85. MANNHERZ, H.G., J. Barrington-Leigh, H. Lebermann and H. Pfrang (1975). A specific 1:1 G-Actin DNase I complex formed by the action of DNase on F-actin. *FEBS Letters* 60, 34-38.
86. MANNHERZ, H.G., R.S. Goody, M. Konrad and E. Nowak (1980). The interaction of bovine pancreatic deoxyribonuclease I and skeletal muscle actin. *Eur. J. Biochem.* 104, 367-379.
87. MATSCHINSKY, F. and O. Wieland (1960). Über Scrimveränderungen und Störungen der Mitochondrienfunktion bei experimenteller phalloidin

- Vergiftung. Biochem. Z. 333, 60.
88. MATSCHINSKY, F., U. Meyer and O. Wieland (1960). Die Wirkung des Knollenblätterpilzgiftes phalloidin auf die isolierte Rattenleber. Biochem. Z. 333, 48.
 89. MAUPIN-SZAMIER, P. and T. Pollard (1978). Actin filament destruction by osmium tetroxide. J. Cell Biol. 77, 827-853.
 90. MILLER, F. and O. Wieland (1967-68) Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Leber von Maus und Ratte bei akuter phalloidin-Vergiftung. Arch. Pathol. Anat. Physiol. 343, 83.
 91. MOOSEKER, M. and L. Tilney (1975). The organization of an actin filament-membrane complex, filament polarity and membrane attachment in the microvilli of intestinal epithelial cells. J. Cell Biol. 67, 725-743.
 92. MUNEKATA, E., H. Faulstich and T. Wieland (1977). Rapid Access to Analogues of Phalloidin by Replacing Alanine-1 in The Natural Toxin by other Amino Acids. J. Amer. Chem. Soc. 99, 6151-6153.
 93. NONOMURA, Y., E. Katayama and S. Ebashi (1975). Effect of phosphate on the structure of the actin filaments. J. Biochem. (Tokyo) 78, 1101-1104.
 94. PALYZA, V. (1972). Chromatographie der Amanita-Toxine. New methode zur identifizierung von amanitatoxinin durch dunnschichtchromatographie. J. Chromatogr. 64, 317-325.

95. PALYZA, V. and V. Kulhanek (1970). Über die chromatographische analyse von toxinen aus amanita phalloides. J. Chromatogr. 53, 545-558.
96. PATEL, D.J., A.E. Tonelli, P. Pfaender, H. Faulstich and T. Wieland (1973). Experimental and Calculated conformational characteristics of the Bicyclic Heptapeptide Phalloidin. J. Mol. Biol. 79, 185-196.
97. PERRY, S.V. (1967). The Structure and Interactions of Myosin. Prog. Biophys. Mol. Biol. 17, 325-381.
98. POLLENDER, J.M. et J. Gruda (1979). Effect of phalloidin on actin proteolysis as measured by viscosimetry and fluorimetry. Can. J. Biochem. 57, 49-55.
99. POMERLEAU, R. (1951). Champignons de l'est du Canada et des Etats-Unis. Les éditions chantecler Ltée, Montréal, 57-63.
100. POMERLEAU, R. (1980). Flore des champignons au Québec et régions limitrophes. Editions La Presse, Montréal, pp. 127-130, 522.
101. PORTER, K. and F. Kallman (1953). The properties and effects of osmium tetroxide as a tissue fixative with special reference to its use for electron microscopy. Exptl. Cell Res. 4, 127-141.
102. PRENTKI, M., C. Chaponnier, B. Jeanrenaud and G. Gabbiani (1979). Actin microfilaments, cell shape and secretory processus in isolated rat hepatocytes. J. Cell Biol. 81, 592-607.
103. RAY, T.K. (1970). A modified method for the isolation of the plasma membrane from the liver. Biochem. Biophys. Acta 196, 1-9.

104. REES, M. and M. Young (1967). Studies on the Isolation and Molecular Properties of Homogeneous Globular Actin. *J. Biol. Chem.* 242, 4449-4458.
105. REHBINDER, D., G. Löffler, O. Wieland and T. Wieland (1963). Studien über den mechanismus der giftwirkung des phalloidins mit radioaktiv makierten giftstoffen. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 331, 132.
106. ROHR, G. and H.G. Mannherz (1979). The activation of actin: DNase I complex with rat liver plasma membranes. *FEBS Letters* 99 (2), 351-356.
107. ROZSA, G., A. Szent-Gyorgyi and R.W.G. Wyckoff (1949). The Electron Microscopy of F-Actin. *Biochem. Biophys. Acta* 3, 561-569.
108. RUGGIERO, G. (1973). Rate of release of cytoplasmic and mitochondrial enzymes from the isolated and perfused rat liver treated with phalloidin. *J. Lab. Clin. Med.* 82, 695-703.
109. RUGGIERO, G., R. Utili and E. Izzo (1973). Enzyme changes during phalloidin poisoning of the isolated rat liver. *Isol. Liv. Perfus. Applic.*, Edited by Bartosek I., Raven Press: New-York, N.Y., 135-138.
110. SCHAFER, A.J. and H. Faulstich (1977). A protein binding assay for phallotoxins using muscle actin. *Anal. Biochem.* 83, 720-723.
111. SCHAFER, A., J.X. De Vries, H. Faulstich and T. Wieland (1975). Phalloidin counteracts the inhibitory effect of actin on deoxyribonuclease I. *FEBS Letters* 57, 51-54.

112. SIESS, E., O. Wieland and F. Miller (1970). Elektronmikroskopische untersuchungen Zur phalloidin toleranz neugeborener ratten mouse und kavinchen. Virchows Arch. B. 6, 151-165.
113. SPUDICH, J.A. (1973). Effects of Cytochalasin B on Actin Filaments. Cold Spring Harbor, Quant. Biol. 37, 585-593.
114. SPUDICH, J.A. and L. Shin (1972). Cytochalasin B, its interaction with actin and actomyosin from muscles. Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.) 69, 442-446.
115. SPUDICH, J. and S. Watt (1971). The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. 1. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. J. Biol. Chem. 246, 4866-4871.
116. SZAMIER, P., T. Pollard and K. Fujiwara (1975). Tropomyosin prevents the destruction of actin filaments by osmium tetroxide. J. Cell Biol. 67, 424a.
117. TAYLOR, E.W. (1972). Chemistry of Muscle Contraction. Ann. Rev. Biochem. 41, 577-616.
118. THEVENIN, M., J.R. Claude et R. Truhaut (1976). L'amanite phalloïde et ses toxines 1. L'évaluation des connaissances sur l'identité des principes toxiques. Eur. J. Toxicol. 9 (4), 197-211.
119. TILNEY, L. (1975). Actin filaments in the acrosomal reaction of limbus sperm. Motion generated by alterations in the packing of the filaments. J. Cell Biol. 64, 289-310.

120. TOSCO, U. (1972). Les champignons. Editions Atlas, Paris, 73-87.
121. TUCHWEBER, B. and G. Gabbiani (1975). Phalloidin-induced hyperplasia of actin filaments in rat hepatocytes. In: The liver, Quantitative Aspects of Structure and Function (R. Preisig, J. Bitcher and G. Paumgartner eds.) Editio Cantor Aulendorf
122. TUCHWEBER, B., K. Kovacs, J. Khandekar and B. Garg (1973). Peliosis-like changes induced by phalloidin in the rat liver. J. Med. 4, 327-345.
123. TURCOTTE, A., C. Gicquaud, M. Gendreau et S. St-Pierre (1981). Séparation et propriétés des peptides toxiques de Amanita virosa. 49e congrès de l'A.C.F.A.S. Sherbrooke.
124. TYLER, V.E. Jr, R.G. Benedict, L.R. Brady and J.E. Robbers (1966). Occurrence of Amanita Toxins in American collections of deadly Amanitas. J. Pharm. Sci. 55, 590-593.
125. VIOLA, S. (1976). Connaissance des champignons. Editions Atlas, Paris, pp. 29-32, 59.
126. VOGT, M. (1938). The crystalline poison "Phalloidin" from Agaricus phalloides. Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 190, 406-416.
127. VON DER DECKER, A., I. Low and T. Hultin (1960). Über die primären wirkungen von phalloidin in leberzellen. Biochem. Z. 332, 503.
128. WEBER, A.M. and J.M. Murray (1973). Molecular Control Mechanisms in Muscle Contraction. Physiol. Rev. 53, 612-673.

129. WEHLAND, J., M. Osborn and K. Weber (1977). Phalloidin-induced actin polymerization in the cytoplasm of cultured cells interferes with cell locomotion and growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 71 (12), 5613-5617.
130. WEHLAND, J., W. Stockem and K. Weber (1978). Cytoplasmic streaming in *Amoeba proteus* is inhibited by the actin-specific drug phalloidin. *Exptl. Cell Res.* 115, 451-454.
131. WEISS, E., I. Sterz, M. Frimmer and R. Kroker (1973). Electron microscopy of isolated rat hepatocytes before and after treatment with phalloidin. *Beitr. Pathol.* 150, 345.
132. WESSELS, N.K., B.S. Spooner, J.F. Ash, M.O. Bradley, M.A. Luduena, E.L. Taylor, J.T. Wrenn and K.M. Yamada (1971). Microfilaments in cellular and developmental processes. *Science* 171, 135-143.
133. WIELAND, O. (1965). Changes in liver metabolism induced by the poisons of Amanita phalloides. *Clin. Chem. (N.Y.)* 11, 323-338.
134. WIELAND, T. (1968). Poisonous Principles of Mushrooms of the Genus Amanita. *Science* 159, 946-953.
135. WIELAND, T. (1972). The toxic peptides of Amanita Species. In S. Kadis, A. Ciegler, S.J. Ajl (Editors), *Microbial Toxins*, Vol. 8, Academic Press, N.Y. London, pp. 249-280.
136. WIELAND, T. (1972). Aspects on syntheses of biologically active peptides. *Pept. Proc. Eur. Pept. Symp.*, 12th., 38-49.

137. WIELAND, T. (1976). Phallotoxins and microfilaments, in Molecular basis of motility, Heilmeyer, L., Ruegg, J.L., and Wieland, T., Eds., Springer-Verlag, Berlin, 203-214.
138. WIELAND, T. (1977). Interaction of phallotoxins with actin in: Advances in Enzymes regulations, vol. 15. Ed. George Weber. Pergamon press. Oxford and N.Y. 285-295.
139. WIELAND, T. (1977). Modification of actins by phallotoxins. Naturwissenschaften 64, 303-309.
140. WIELAND, T. (1981). Amatoxins and phallotoxins. Structure and toxicity. Structure and activity of natural peptides. Editors: W. Voelter, G. Weitzal by Walters de Gruyter, Berlin. N.Y., pp 23-40.
141. WIELAND, T. and H. Faulstich (1979). The phalloidin story in: Frontiers in bioorganic chemistry and molecular biology (Ovchinnikov, Y.A. and Kolosov, M.N. Eds.) p. 97-112, Elsevier/North-Holland, Amsterdam.
142. WIELAND, T. and V.M. Govindan (1974). Phallotoxins bind to actins. FEBS Letters 46 (1), 351-353.
143. WIELAND, T. and I. Low (1980). Concentration-dependant influence of various cytochalasins and chaetoglobosins on the phalloidin-induced polymerization of G-actin in 0,6M Potassium iodide. Biochem. 19, 3363-3368.
144. WIELAND, T. and G. Schmidt (1952). Über die Gigtstoffe des Knollenblätterpilzes. Justus Liebigs Ann. Chem. 577, 215-233.

145. WIELAND, T. and W. Schon (1955). Über die Giftstoffe des grünen Knollenblätterpilzes. X. Die Konstitution des phalloidins. Justus Liebigs Ann. Chem. 593, 157.
146. WIELAND, T., L. Wirtz and E. Fisher (1949). Über die Giftstoffe des Knollenblätterpilzes, VII, β -Amanitine, eine 3 Komponente des Knollenblätterpilzes. Justus Liebigs Ann. Chem. 564, 152.
147. WIELAND, T., J.X. De Vries, A. Schafer and H. Faulstich (1975). Spectroscopic evidence for the interaction of phalloidin with actin. FEBS Letters 54, 73-75.
148. WIELAND, T., A. Schafer, V.M. Govindan and H. Faulstich (1975). Interaction of phalloidin with actin - Pathogenesis and mechanisms of liver cell necrosis. D. Keppler. MTP Press, Lancaster. p. 193-197.
149. WULF, E., A. Deboen, F.A. Bautz, H. Faulstich and T. Wieland (1979). Fluorescent Phallotoxin, a tool for the visualization of cellular actin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 4498-4502.
150. YOCUM, R.R. and O.M. Simons (1977). Amatoxins and phallotoxins in Amanita Species of the Northeastern United States. Lloydia 40 (2), 178-190.
151. YOCUM, R.R. (1978). New laboratory scale purification of β -Amanitin from american Amanita phalloides. Biochem. 17, 3786-3789.