

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE

PAR
DOMINIQUE PELLETIER

EFFET DE LA TÊTE POLAIRE DES PHOSPHOLIPIDES SUR L'INTERACTION
ENTRE L'ACTINE ET LES LIPIDES MEMBRANAIRES: UNE ÉTUDE PAR LA
TECHNIQUE DES FILMS MONOMOLÉCULAIRES DE LANGMUIR.

JUIN 1999

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

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

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

Résumé

L'actine est une protéine qui joue un rôle important dans les phénomènes de contraction musculaire et de motilité cellulaire. Elle est également un constituant majeur du cytosquelette. Il est admis dans la littérature que l'actine se fixe aux membranes par l'intermédiaire de protéines membranaires. À l'aide d'un modèle *in vitro* composé de membranes artificielles, les liposomes, et d'actine purifiée, le groupe de Gicquaud a montré l'existence d'une interaction directe entre l'actine et les lipides membranaires. Cette interaction résulte d'une attraction électrostatique entre les charges de l'actine et la tête polaire des lipides. L'objectif de notre travail est d'étudier l'influence de la tête polaire des lipides sur l'interaction actine-lipides. Nous avons donc comparé l'effet de lipides qui contiennent les mêmes chaînes acyles, mais qui ont une tête polaire différente (DMPC, DMPE, DMPS, DMPG et DMPA). Comme il n'est pas possible, dans nos conditions expérimentales, de former des liposomes avec certains lipides, nous avons utilisé la technique des monocouches.

Nous avons tracé les isothermes du DMPC, du DMPE, du DMPS, du DMPG et du DMPA seuls, puis des mêmes lipides mélangés au DMPC, en absence d'actine. Nous avons ensuite tracé les isothermes de ces mêmes lipides en présence d'actineG d'une part, puis d'actineF d'autre part. Nos résultats montrent que l'actine, injectée en sous-phase, remonte à l'interface pour s'insérer entre les molécules de lipides et que l'actine F a plus d'affinité pour l'interface que l'actine G. Lorsque l'on comprime un film mixte d'actine et de lipides, les molécules d'actine

plongent en sous-phase et entraînent avec elles des molécules de lipides ce qui montre l'existence d'une interaction entre l'actine et les lipides. À une pression de surface donnée de 10 mN/m, l'aire occupée par l'actine augmente en fonction de la concentration d'actine. L'actine G est attirée davantage par les lipides neutres (DMPC et DMPE), alors que l'actine F est attirée plutôt par les films composés de lipides anioniques (DMPS, DMPG et DMPA). L'actine a plus d'affinité pour les films qui ne contiennent pas de DMPC. Par contre, le DMPC seul attire aussi les molécules d'actine. Par conséquent, le DMPC semble structurer les molécules de lipides de telle manière qu'elles aient moins d'affinité pour l'actine.

Le calcul du travail requis pour comprimer les films en présence d'actine G montre que l'actine n'interagit pas de façon évidente avec les lipides à l'interface. L'actine F, elle, a un effet fluidifiant sur les films de lipides, ce qui suggère une interaction entre les lipides et l'actine F.

Le calcul du module d'élasticité indique, pour tous les lipides étudiés, une baisse d'élasticité lorsque l'on augmente la concentration d'actine en sous-phase. Cette baisse d'élasticité est plus marquée avec l'actine F qu'avec l'actine G.

Nos travaux ont mis en évidence que la nature de la tête polaire des lipides a un effet sur l'attraction de l'actine G et de l'actine F. Toutefois, il n'y a pas de corrélation entre le nombre de charges sur la tête polaire et l'attraction de l'actine. Nous suggérons que les cations divalents de la sous-phase neutralisent certaines charges des lipides ce qui modifie leur affinité pour l'actine.

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier ceux qui m'ont dirigé au cours de cette longue étape. En premier lieu, un merci particulier à Claude Gicquaud, mon directeur de recherche. Doté d'un sens de l'humour bien particulier, tu as su me relancer sur les rails quand j'ai douté (si! si! ça m'est arrivé!). Vient ensuite Jean-Paul Chauvet qui m'a accueilli à deux reprises dans ses laboratoires de l'École Normale Supérieure et de l'École Centrale de Lyon. Je me suis rapidement senti à l'aise au travail et ça, c'est grâce à sa facilité d'approche et sa grande capacité d'écoute. Merci à vous! Il y a aussi les « collègues de travail », d'autres étudiants gradués qui, comme moi, ont traversé le désert. À Trois-Rivières, j'ai côtoyé des gens de qualité comme Guillaume Grenier, Jean « D'Johnny » Désilets, Isabelle Fournier, Annie Charette, Louis-Robert Villeneuve et Fannie St-Gelais. Merci à vous tous et vous toutes. Que l'avenir soit à la hauteur de vos espérances. À l'École Normale Supérieure de Lyon, j'ai aussi connu des gens formidables qui ont fait s'accélérer le temps. Je tiens à remercier Marianne Cochez et Emmanuelle Cogné pour leur délicatesse et leurs brillants sujets de conversation. Merci aussi à deux camarades de baby-foot: José Maria Perez Victoria et Ismaël Ghalimi. Merci aussi à l'inventeur de l'andouillette à la sauce moutarde..!

Un merci tout personnel à ma compagne Geneviève qui m'a soutenu tout au long de cette rédaction.

Ce projet a été rendu possible grâce à la participation de l'Office franco-québécois pour la jeunesse, de l'Organisme France-Québec et du CRSNG (Canada).

Table des matières

Résumé	i
Remerciements.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux	ix
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations	xiii
Chapitre I: Introduction	1
1.1. L'actine.....	1
1.1.1. Généralités	1
1.1.2. Structure du monomère.....	1
1.1.3. Structure du filament d'actine.....	2
1.1.4. Polymérisation de l'actine.....	4
1.1.4.1. <i>La nucléation</i>	5
1.1.4.2. <i>L'élongation</i>	5
1.1.4.3. <i>L'état stationnaire</i>	7
1.1.5. Protéines liant l'actine.....	7
1.1.6. Formes paracrystallines d'actine	11
1.1.7. Les fonctions de l'actine.....	13

1.1.7.1. <i>L'actine est impliquée dans la motilité cellulaire</i>	13
1.1.7.2. <i>L'actine est un constituant du cytosquelette</i>	14
1.2. Interactions entre l'actine et la membrane cellulaire.....	15
1.2.1. Les ABP membranaires.....	15
1.2.2. Interaction directe de l'actine avec les lipides membranaires.....	18
1.2.3. Effet de la tête polaire des lipides sur l'interaction actine-lipides : les travaux de J.F. Comtois.....	21
1.2.3.1. <i>Interaction de l'actine avec les liposomes neutres</i>	23
1.2.3.2. <i>Interaction de l'actine avec les liposomes anioniques</i>	23
1.2.3.3. <i>Conclusions sur les travaux de J.F. Comtois</i>	25
1.3. Les films monomoléculaires de Langmuir.....	26
1.3.1. Généralités.....	26
1.3.2. Principe de fonctionnement d'un bain de monocouches.....	28
1.3.3. Paramètres mesurés en monocouche.....	28
1.3.3.1. <i>Pression de surface</i>	28
1.3.3.2. <i>Aire moléculaire</i>	30
1.3.3.3. <i>Travail de compression (Wc)</i>	33
1.3.3.4. <i>Module d'élasticité (Ks)</i>	35
1.4. But du travail de recherche.....	36
Chapitre II: Matériel et méthodes	38
2.1. Produits utilisés.....	38
2.1.1. Les tampons.....	38
2.1.2. Lipides.....	38

2.2.	Protocole expérimental.....	40
2.2.1.	Préparation de l'actine	40
2.2.2.	Contrôle de pureté des préparations d'actine.....	40
2.2.3.	Préparation des lipides	41
2.2.4.	Description de la cuve de Langmuir utilisée à Lyon.....	42
2.2.5.	Mesure de l'adsorption de l'actine aux lipides.....	43
2.2.5.1.	<i>Préparation de la cuve</i>	43
2.2.5.2.	<i>Enregistrement des isothermes</i>	44
2.2.6.	Traitement des données.....	45
Chapitre III:	Résultats	46
3.1.	Isothermes des lipides seuls	46
3.1.1.	Isothermes des lipides, sur une sous-phase de tampon G, sans Mg^{2+}	46
3.1.2.	Isothermes de mélanges de lipides, sur une sous-phase de tampon G, sans Mg^{2+}	49
3.1.3.	Effet du magnésium sur les isothermes des lipides.....	50
3.2.	Isothermes de l'actine seule.....	51
3.2.1.	Définition de l'«aire moléculaire apparente» de l'actine	51
3.2.2.	Isothermes de l'actine G et F, en absence de lipides.....	52
3.3.	Effet de l'actine sur les isothermes des lipides	54
3.4.	Effet de l'actine sur le module d'élasticité des lipides.....	59
3.4.1.	Effet de l'actine G sur le module d'élasticité.....	59
3.4.2.	Effet de l'actine F sur le module d'élasticité.....	66
3.5.	Contribution de l'actine à la surface à une pression de surface de	

10 mN/m	73
3.5.1. Effet de la nature de la tête polaire du lipide sur l'aire occupée par l'actine G	76
3.5.2. Effet de la nature de la tête polaire du lipide sur l'aire occupée par l'actine F	76
3.5.3. Conclusions sur la contribution de l'actine à l'aire du bain.....	78
3.6. Effet de l'actine sur le travail de compression d'un film selon la tête polaire des lipides	79
3.6.1. Travail requis pour comprimer les films d'actine seule.....	79
3.6.2. Travail requis pour comprimer les films formés de lipides seuls	79
3.6.3. Travail requis pour comprimer les films mixtes de lipides et d'actine	80
3.6.4. Conclusions sur l'effet de l'actine sur le travail de compression	82
Chapitre IV: Discussion	84
4.1. Reproductibilité des expériences	84
4.2. Interaction de l'actine avec les lipides.....	84
4.3. Effet de la tête polaire sur l'interaction des lipides avec l'actine	87
4.4. Comparaison de nos résultats avec ceux de J.F. Comtois	89
4.4.1. Rappel des résultats de J.F. Comtois.....	89
4.4.2. Comparaison de nos résultats avec J.F. Comtois	90
4.4.3. Résultats obtenus avec les films composés d'un seul lipide.....	93
4.4.4. Conclusions sur la comparaison de nos travaux avec ceux de J.F. Comtois.....	94

4.5. Proposition d'un modèle, <i>in vivo</i> , d'interaction directe de l'actine avec les lipides membranaires.....	94
4.6. Critique de la technique des monocouches et suggestions de travaux complémentaires.....	96
Chapitre V: Conclusions	98
Références	99
ANNEXE A : Isothermes des films de lipides seuls en présence et en absence d'actine G et les courbes de Ks correspondantes.....	108
ANNEXE B : Isothermes des films de lipides mélangés au DMPC en présence et en absence d'actine G et les courbes de Ks correspondantes.....	113
ANNEXE C : Isothermes des films de lipides seuls en présence et en absence d'actine F et les courbes de Ks correspondantes.....	117
ANNEXE D : Isothermes des films de lipides mélangés au DMPC en présence et en absence d'actine F et les courbes de Ks correspondantes	122

Liste des tableaux

Tableau 1. Caractéristiques de quelques ABP cytoplasmiques.	9
Tableau 2. Caractéristiques de quelques ABP membranaires.....	16
Tableau 3. Composition en lipides des liposomes utilisés lors des expériences de J.F. Comtois.....	21
Tableau 4. Composition du tampon G.	38
Tableau 5. Lipides utilisés pour la formation des films monomoléculaires.	39
Tableau 6. Travail requis pour comprimer les films de lipides sans actine, avec et sans magnésium en sous-phase.	82

Liste des figures

Figure 1. Structure tridimensionnelle de l'actine monomérique établie par diffraction des rayons X.....	2
Figure 2. Schéma d'un filament d'actine montrant le pas d'hélice de 36 nm.	3
Figure 3. Schéma simplifié montrant l'orientation des unités S1 de myosine fixées à un filament d'actine.....	4
Figure 4. Cinétique de polymérisation de l'actine G en actine F.....	5
Figure 5. Étapes de la polymérisation de l'actine.	6
Figure 6. Schéma montrant les étapes conduisant à la formation de paracristaux de Hanson.....	12
Figure 7. Schéma d'une bande A d'un sarcomère de muscle strié.....	13
Figure 8. Liaison de l'actine à la membrane via la ponticuline.....	17
Figure 9. Interaction électrostatique entre l'actine F, de charge globale négative, et une membrane de charge globale positive composée de PC:SA.	18
Figure 10. Interaction entre l'actine F et une membrane chargée	

négativement composée de PC:PG et une membrane neutre de PC seul.....	20
Figure 11. Molécule de dimiristoylphosphatidylcholine (DMPC).....	26
Figure 12. Différentes organisations thermodynamiquement stables formées par des molécules de lipides en solution aqueuse.....	27
Figure 13. Schéma simplifié d'une cuve de Langmuir.....	28
Figure 14. Schéma d'une plaque de Wilhelmy à l'interface air-eau vue de face et de profil.	29
Figure 15. Isotherme π/A de l'acide stéarique et les différentes phases correspondantes.....	31
Figure 16. Séquence des différentes étapes menant au collapse d'un film monomoléculaire.....	32
Figure 17. Schéma montrant l'expulsion d'une protéine insérée dans un film de lipides.....	33
Figure 18. Structure des lipides utilisés.	39
Figure 19. Électrophorégramme sur SDS-Page montrant la pureté de préparations d'actine utilisées au cours des expériences.	41
Figure 20. Représentation schématique de la cuve de Langmuir utilisée à Lyon....	42
Figure 21. Étalement des lipides à l'interface.....	44
Figure 22. Injection d'actine en sous-phase. La barrière mobile est amenée au centre de la cuve.....	45
Figure 23. Isotherme de DMPC sur du tampon G.....	47
Figure 24. Isotherme de DMPC sur du tampon F	48
Figure 25. Isothermes de compression du DMPC seul, du DMPC seul et d'un mélange équimolaire de DMPC et de DMPC.....	49
Figure 26. Effet du magnésium sur l'isotherme du DMPC pur.....	51
Figure 27. Isothermes de l'actine G et de l'actine F en absence de lipides.....	53
Figure 28. Isothermes de DMPC en présence et en absence d'actine G.	55

Figure 29. Isothermes du DMPC en présence et en absence d'actine F.....	55
Figure 30. Schéma montrant l'effet de la concentration d'actine G sur les isothermes du DMPC pur.....	57
Figure 31. Schéma montrant l'effet de la concentration d'actine F sur les isothermes du DMPC pur.....	57
Figure 32. Effet de la concentration d'actine G sur les isothermes et sur le module d'élasticité, ou K_s du DMPC.....	61
Figure 33. Effet de la concentration d'actine G sur les isothermes et sur le module d'élasticité, ou K_s du DMPE.....	63
Figure 34. Aire moléculaire des maxima de K_s , correspondant au collapse et à la transition L1/L2, des films composés que d'un seul lipide en fonction de la concentration d'actine G.....	65
Figure 35. Aire moléculaire des maxima de K_s , correspondant au collapse et à la transition L1/L2, des films de lipides mélangés au DMPC en fonction de la concentration d'actine G.....	66
Figure 36. Effet de la concentration d'actine F sur les transitions de phase du DMPC. (A) Isothermes de compression. (B) Courbes du module d'élasticité du DMPC (K_s).....	68
Figure 37. Effet de la concentration d'actine F sur les transitions de phase du DMPE. (A) Isothermes de compression. (B) Courbes du module d'élasticité du DMPE (K_s).....	69
Figure 38. Aire moléculaire des maxima de K_s , correspondant au collapse et à la transition L1/L2, des films composés que d'un seul lipide en présence de concentrations croissantes d'actine F.	71
Figure 39. Aire moléculaire des maxima de K_s , correspondant au collapse et à la transition L1/L2, des films de lipides mélangés au DMPC en présence de concentrations croissantes d'actine F.	72
Figure 40. Schéma montrant comment est calculée l'aire occupée par l'actine seule à une pression de 10mN/m.....	74
Figure 41. Graphiques montrant la contribution de l'actine G et de l'actine F à la surface du bain à une pression superficielle de 10 mN/m en fonction de la concentration d'actine, pour différents lipides ou mélanges de lipides.....	77

Figure 42. Graphiques du travail de compression d'un film de lipides en présence d'actine G et d'actine F, en fonction de la concentration d'actine pour différents lipides.	81
Figure 43. Mécanisme proposé pour l'interaction actine-lipides en présence de cations divalents dans le milieu.	95

Liste des abréviations

ABP	Protéine liant l'actine (<i>Actin-binding protein</i>)
ADP	Adénosine diphosphate
ATP	Adénosine triphosphate
BSA	Albumine de sérum bovin (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
DMPA	Acide dimiristoylphosphatidique
DMPC	Dimiristoylphosphatidylcholine
DMPE	Dimiristoylphosphatidyléthanolamine
DMPG	Dimiristoylphosphatidylglycérol
DMPS	Dimiristoylphosphatidylsérine
DSC	Calorimétrie différentielle à balayage (<i>Differential scanning calorimetry</i>)
EGTA	Acide éthylènebis(oxyéthylènenitrilo)tétraacétique
E.N.S.	École Normale Supérieure
Ks	Module d'élasticité
M.É.	Microscopie électronique
PC	Phosphatidylcholine
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
Réf.	Référence
SA	Stéarylamine
Wc	Travail de compression

Chapitre I: Introduction

1.1. L'ACTINE

1.1.1. Généralités

L'actine est une protéine que l'on retrouve en abondance dans toutes les cellules eucaryotes, où elle représente jusqu'à 20% des protéines totales [43, 52, 58]. C'est une protéine qui joue un rôle important dans le maintien de la structure de la cellule ainsi que dans les phénomènes de motilité. Dans la cellule eucaryote, les filaments d'actine occupent différentes régions du cytoplasme et peuvent adopter plusieurs organisations. Dans les régions corticales, l'actine forme des réseaux bidimensionnels sous-jacents à la membrane. Dans les parties plus centrales du cytoplasme, certains filaments d'actine forment parfois des faisceaux qui traversent le cytoplasme de part en part. Ces faisceaux d'actine jouent le rôle de fibres de support qui maintiennent la forme de la cellule et qui peuvent jouer un rôle lors des mouvements cellulaires [58].

L'actine existe sous deux formes : la forme monomérique ou actine G, et la forme polymérisée que l'on appelle actine F.

1.1.2. Structure du monomère

Le monomère d'actine est formé d'une seule chaîne peptidique de 375 acides aminés [13]. Cette chaîne est repliée en deux domaines de même taille, subdivisés en deux sous-domaines et séparés par une cavité (**figure 1**). La cavité est le site de fixation d'un cation divalent, habituellement le magnésium, ainsi que

d'un nucléotide, qui est soit l'ATP, soit l'ADP [10, 47, 49, 58, 92]. Le cation, est enfoui au fond de la cavité et est lié aux phosphates β et γ du nucléotide [15]. Si on retire le cation, en ajoutant de l'EGTA au milieu, l'actine se dénature [58]. Le maintien de la structure native du monomère d'actine dépend de la présence du couple cation-nucléotide. De plus, l'actine a d'autres sites de fixation, de plus ou moins grande affinité pour les cations, qui sont situés à la périphérie de la protéine [21, 47, 52].

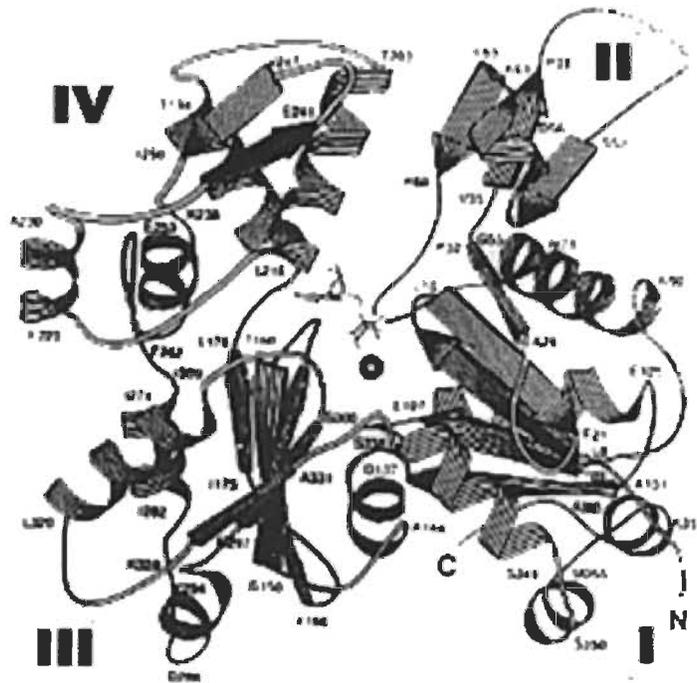


Figure 1. Structure tridimensionnelle de l'actine monomérique établie par diffraction des rayons X. D'après Mannherz [63], modifié. La sphère, au centre, représente le cation divalent avec, juste au-dessus, le nucléotide. Les sous-domaines sont identifiés par les chiffres romains.

1.1.3. Structure du filament d'actine

Le polymère d'actine, l'actine F, est formé par la juxtaposition de monomères en un long filament. Le facteur qui déclenche la polymérisation est la

présence dans le milieu de cations divalents à une concentration de quelques millimolaires.

Les filaments d'actine sont formés de monomères disposés en hélice qui fait un tour complet tous les 72 nm et comprend environ 13,5 monomères par tour (**figure 2**) [49, 92]. La structure en double-hélice explique pourquoi le diamètre du filament d'actine observé en microscopie électronique varie de 7 nm à 9 nm [29].

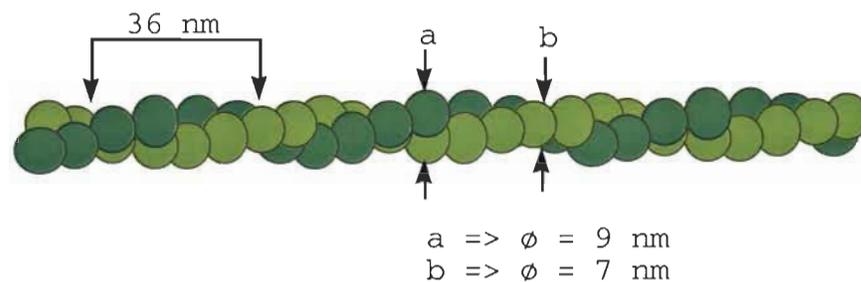


Figure 2. Schéma d'un filament d'actine montrant le pas d'hélice de 36 nm.

Des recherches récentes indiquent que les monomères qui constituent le filament sont organisés les uns par rapport aux autres de telle façon que la cavité qui contient l'ATP est orientée dans le même sens pour tous les monomères, suivant l'axe longitudinal du filament [58, 78]. En plus de posséder cette polarité structurale, au niveau des monomères, le filament est également caractérisé par une polarité fonctionnelle. En effet, en ajoutant à l'actine F des fragments S1 de myosine (têtes de la myosine qui se lient à l'actine dans le muscle), ces derniers se fixent au filament, orientés dans le même sens (**figure 3**). Nous obtenons alors des filaments d'actine "décorés" dits en « en arête de poisson ». On distingue alors une

extrémité effilée (*pointed end*) et une extrémité barbue (*barbed end*) [49, 58, 92]. En ajoutant des monomères d'actine au milieu, il a été montré que ceux-ci s'ajoutent surtout du côté barbu du filament [49, 58]. Le côté barbu est donc l'extrémité à croissance rapide et le côté effilé est l'extrémité à croissance lente.

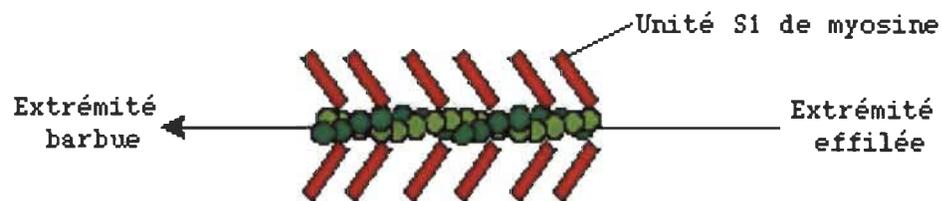


Figure 3. Schéma simplifié montrant l'orientation des unités S1 de myosine fixées à un filament d'actine [58]. La flèche indique le sens de croissance rapide du filament.

Maintenant que nous avons décrit la structure d'un filament d'actine, voyons plus en détails le mécanisme de la polymérisation.

1.1.4. Polymérisation de l'actine

On peut induire la polymérisation de l'actine *in vitro* en ajoutant au milieu des cations divalents, en particulier du magnésium ou du calcium à des concentrations de l'ordre du millimolaire. Les cations monovalents peuvent aussi provoquer la polymérisation de l'actine, mais pour des concentrations supérieures, de l'ordre de 100 mM. Les conditions ioniques retrouvées à l'intérieur d'une cellule favorisent donc la polymérisation de l'actine. Nous verrons cependant plus loin que la polymérisation de l'actine *in vivo* est aussi sous le contrôle de protéines qui lient l'actine.

La polymérisation de l'actine comprend trois phases: la **nucléation**,

l'élongation et **l'état stationnaire** qui sont caractérisées par des vitesses différentes d'élongation des filaments (**figure 4**). L'effet de la polymérisation est d'augmenter la viscosité de la solution. *In vivo*, les régions du cytoplasme où l'actine est polymérisée ont une viscosité élevée, tandis que les régions où l'actine n'est pas polymérisée sont peu visqueuses [58].

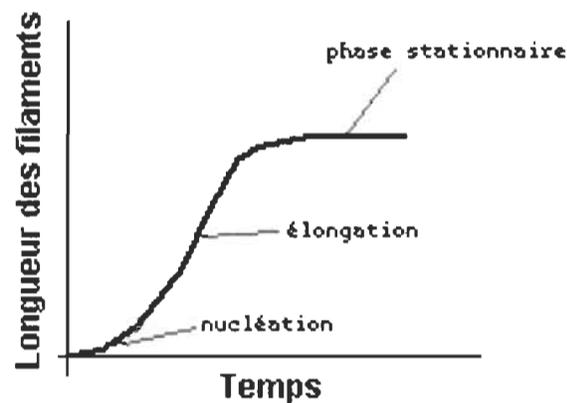


Figure 4. Cinétique de polymérisation de l'actine G en actine F. D'après Miller *et al.* [65].

1.1.4.1. La nucléation

La nucléation, consiste en l'assemblage de trois monomères pour former un **nucleus** qui va servir de point de départ à l'élongation du filament (**figure 5**) [52]. Cette étape est relativement lente et détermine la vitesse de polymérisation. On peut accélérer cette étape en ajoutant des fragments de filaments d'actine déjà formés qui servent de nucléi [58].

1.1.4.2. L'élongation

Au cours de la phase d'élongation, des monomères vont s'ajouter au nucleus tel qu'illustré à la **figure 5**. Il se forme alors un filament aux extrémités

duquel s'ajouteront d'autres monomères. Cette étape est rapide. Les filaments formés peuvent se couper spontanément et exposer ainsi de nouvelles extrémités qui deviennent autant de nouveaux sites de fixation pour les monomères [58].

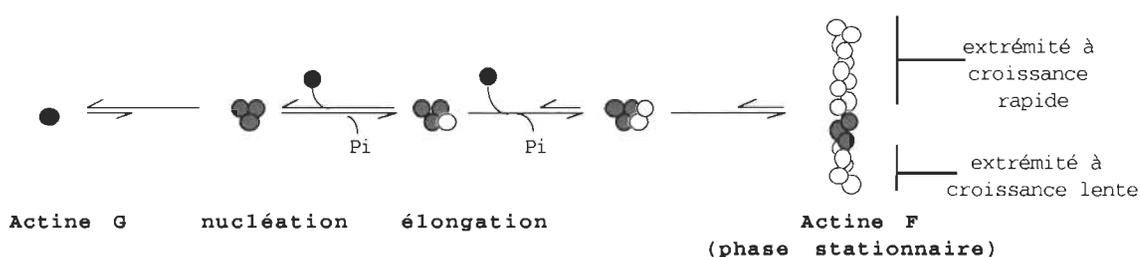


Figure 5. Étapes de la polymérisation de l'actine d'après Korn *et al.* [52] modifié.

Nous avons vu précédemment que les deux extrémités d'un filament ne sont pas identiques. L'extrémité barbue, dont l'affinité pour les monomères est plus grande que l'extrémité pointue, va s'allonger plus rapidement. Pour cette raison, on appelle couramment l'extrémité barbue "extrémité +" et l'extrémité pointue "extrémité -" [58, 92].

Avant leur addition à un filament d'actine, les monomères contiennent, en général, un ATP dans la cavité centrale. Au cours de la polymérisation, ce sont donc des monomères-ATP qui s'ajoutent aux extrémités du filament en croissance. Peu après leur incorporation au filament, l'ATP contenu dans chaque monomère est hydrolysé en ADP [58, 92]. Au cours de la croissance, les extrémités du filament sont donc composées par des monomères-ATP et le centre du filament est constitué de monomères-ADP. On dit de ce filament qu'il est coiffé par l'ATP ou *ATP-capped* en anglais.

1.1.4.3. L'état stationnaire

À la fin du processus d'élongation, la quantité de monomères libres dans le milieu diminue et la concentration critique d'actine est atteinte. La concentration critique est la concentration de monomères en-dessous de laquelle il n'y a plus allongement des filaments [52]. *In vitro*, et dans les conditions standards, c'est-à-dire 2 mM de $MgCl_2$ et 100 mM de KCl, cette concentration critique est de l'ordre de 0,1 μM , ce qui veut dire qu'au-dessous de cette concentration, les filaments ne s'allongent plus [58]. Lorsque la concentration critique est atteinte, des monomères vont continuer à s'ajouter à l'extrémité + mais une quantité égale va se détacher de l'extrémité -. La longueur du filament demeure donc constante. On appelle ce phénomène l'état stationnaire dynamique ou *threadmilling* [51, 58, 92]. Au cours du *threadmilling*, les monomères qui s'ajoutent à l'extrémité + sont des monomères*ATP, tandis que les monomères qui se détachent de l'extrémité - sont des monomères*ADP. L'actine se comporte donc comme une ATPase [15, 48]. Une revue exhaustive du mécanisme de polymérisation de l'actine a été publiée par Marie-France Carlier et ses collaborateurs [15].

1.1.5. Protéines liant l'actine

In vivo, la polymérisation de l'actine est également sous le contrôle de protéines qui lient l'actine. On les appelle *Actin-binding proteins* ou **ABP**. On en a identifié une centaine et elles sont de mieux en mieux connues et caractérisées [23, 57, 89, 91, 16]. Leur importance est fondamentale dans le maintien de l'équilibre entre l'actine F et l'actine G. En effet, il a été établi que seulement la moitié de

l'actine contenue dans les cellules non musculaires est sous forme polymérisée, alors que les conditions ioniques intracellulaires favorisent la polymérisation. L'autre moitié de l'actine est associée à des ABP qui empêchent sa polymérisation [74]. On classe ces ABP en deux groupes : les ABP cytoplasmiques et les ABP membranaires. Nous traiterons tout d'abord des ABP cytoplasmiques puis des ABP membranaires.

Comme leur nom l'indique, les ABP cytoplasmiques sont présentes dans le cytoplasme de la cellule. Elles ont pour rôle principal de moduler la polymérisation et la dépolymérisation de l'actine et de former des structures plus complexes avec les filaments d'actine. On connaît quatre grandes familles d'ABP, caractérisées selon leur action sur l'actine : les protéines de séquestration, les protéines de désagrégation, les protéines coiffantes et les protéines de pontage (tableau 1).

Les protéines de séquestration se lient aux monomères et empêchent l'actine de polymériser. On dit de ces protéines qu'elles maintiennent un « pool » de monomères disponibles pour la polymérisation locale. Parmi les plus connues, citons la thymosine β_4 et la profiline. Bien que le mécanisme d'action de la thymosine β_4 sur l'actine soit plus ou moins bien connu, on sait que cette protéine retient environ 70% des monomères libres dans la cellule [4, 58]. La profiline a une affinité pour les monomères supérieure à celle de la thymosine, et inférieure à celle des extrémités des filaments d'actine.

Tableau 1. Caractéristiques de quelques ABP cytoplasmiques.

Nom de la protéine	Masse molaire (kDa)	Type de cellules/Caractéristiques	Réf.
Profiline	15	<ul style="list-style-type: none"> Protéine de séquestration. Retrouvée dans les plaquettes et <i>Acanthamoeba</i> sp. Inhibe la polymérisation en se liant aux monomères et aux extrémités des filaments. 	4, 44, 72
Thymosine β_4	5	<ul style="list-style-type: none"> Protéine de séquestration. Retrouvée chez les plaquettes. Empêche la polymérisation en se liant aux monomères libres. 	4, 58
Gelsoline	90	<ul style="list-style-type: none"> Protéine de désagrégation/coiffage. Retrouvée dans les cellules des vertébrés. Coupe les filaments d'actine en fragments plus petits. Agit aussi comme une protéine de coiffage en inhibant l'ajout de monomères aux filaments. 	4, 58, 87
Sévérine	40	<ul style="list-style-type: none"> Protéine de désagrégation/coiffage. 	44, 58
Fragmine	42	<ul style="list-style-type: none"> Ces deux protéines possèdent des homologies de séquences avec la gelsoline. 	
Tropomoduline	nd	<ul style="list-style-type: none"> Protéine de coiffage. Retrouvée dans le sarcomère du muscle et le réseau de la membrane érythrocytaire. Coiffe l'extrémité - des filaments en association avec la tropomyosine. 	58, 88
CapZ (β -actinine)	nd	<ul style="list-style-type: none"> Protéine de coiffage. Retrouvée dans le disque Z du sarcomère du muscle. Coiffe l'extrémité + des filaments. 	58, 83
Villine	92	<ul style="list-style-type: none"> Protéine de désagrégation/coiffage/pontage. Cette protéine possède des homologies de séquences avec la gelsoline. 	44, 58
Filamine	280	<ul style="list-style-type: none"> Protéine de pontage. Intervient dans la formation de filopodes, de pseudopodes, de fibres de traction. 	58
Fascine	55	<ul style="list-style-type: none"> Protéine de pontage. Lie l'actine à chaque tour d'hélice (36 nm). 	58, 76, 94

La profiline agit donc comme intermédiaire entre les monomères-thymosine et les filaments d'actine. De plus, on sait qu'elle est inactive lorsqu'elle est fixée par le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP₂) [58]. Le PIP₂ est un second messenger qui est produit dans le cytoplasme suite à un signal impliquant des protéines G. La polymérisation locale d'actine peut donc être parfois sous contrôle hormonal.

Les **protéines de désagrégation** coupent les filaments en fragments plus petits. L'effet de telles protéines est donc une diminution locale de la viscosité du cytoplasme. Ces protéines sont sensibles aux concentrations du PIP₂ et du calcium cytoplasmique. En général, une augmentation de la concentration de calcium cytosolique active les protéines de désagrégation alors qu'une augmentation du PIP₂ se traduit par une baisse d'affinité de ces protéines pour l'actine. Il est à noter que les concentrations respectives de ces deux seconds messagers produisent des mécanismes antagonistes dans la cellule. Les concentrations de Ca²⁺ et de PIP₂ seraient à l'origine de la régulation de la longueur des filaments, donc de la viscosité locale du cytoplasme, en réponse à une cascade de signaux cellulaires [58].

Les **protéines de coiffage** se fixent aux extrémités des filaments et empêchent l'ajout ou la perte de monomères. Elles ont donc un rôle de stabilisation des filaments. La CapZ est une protéine de coiffage présente dans le muscle qui a une très haute affinité pour les bouts + des filaments [83]. Elle est insensible aux variations de calcium cytosolique et demeure fixée à l'actine. La tropomoduline, elle, ne se fixe aux extrémités – des filaments qu'en présence de tropomyosine [58].

Ces deux protéines de coiffage agissent de concert de telle sorte que l'organisation des filaments dans le sarcomère est stable. Il est à noter que certaines protéines de désagrégation, comme la gelsoline, agissent aussi comme des protéines de coiffage en demeurant liées à l'extrémité qu'elles viennent de cliver [58].

Les **protéines de pontage**, ou de réticulation, comportent généralement deux sites de fixation pour l'actine. Dépendamment de la longueur et de la flexibilité de la protéine de pontage, l'actine prendra des arrangements différents. Dans le cas de protéines courtes et rigides, comme la fascine, les filaments adopteront une formation parallèle en faisceaux, un peu à la manière des filins dans un câble électrique. Pour ce qui est des protéines plus longues et plus flexibles, comme la filamine, les filaments auront une disposition en réseaux tridimensionnels [58]. De nombreuses protéines de pontage possèdent un site de captation du calcium, analogue à celui de la calmoduline. Le calcium joue ici un rôle régulateur en empêchant les protéines de pontage de se lier aux filaments [58, 76, 94].

1.1.6. Formes paracrystallines d'actine

In vitro, les filaments d'actine peuvent s'associer latéralement pour former des structures régulières appelées paracristsaux d'actine (**figure 6**). Selon les conditions expérimentales, différentes structures paracrystallines peuvent être formées : ① **les paracristsaux de Hanson**, ② **les paracristsaux de Kawamura** et ③ **les microcristaux de Dos Remedios**.

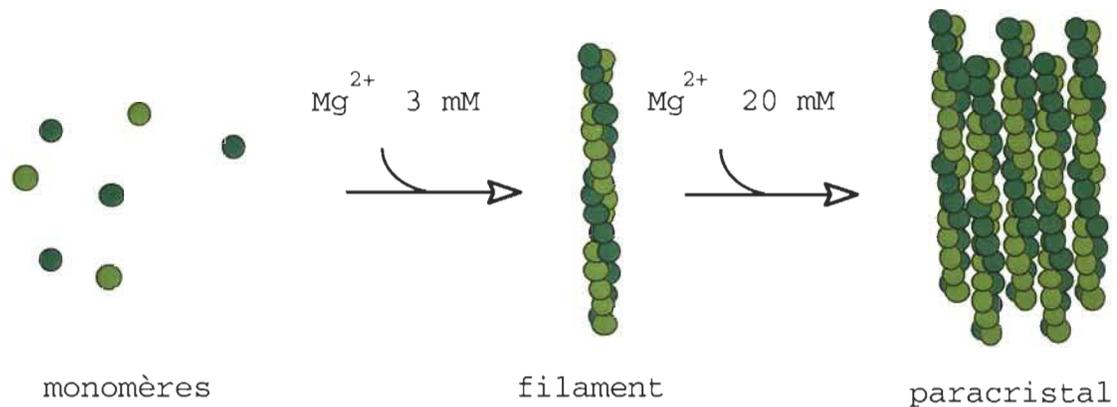


Figure 6. Schéma montrant les étapes conduisant à la formation de paracristaux de Hanson. Les monomères sont colorés différemment pour plus de clarté.

Les paracristaux de Hanson sont obtenus en présence d'un excès de cations divalents. Ils sont composés de filaments d'actine ordonnés et en phase, c'est-à-dire que, pour un filament donné, chaque monomère interagit avec le monomère correspondant sur le filament adjacent et ainsi de suite (figure 6). Les paracristaux de Kawamura, eux, peuvent être obtenus en incubant l'actine à son point isoélectrique qui est d'environ 4,5 [13, 50]. Ils sont formés par l'entrecroisement de filaments d'actine, à la façon des mailles d'un filet. Enfin les microcristaux de Dos Remedios sont obtenus en présence d'ions lanthanides comme le gadolinium [5, 28]. Ces microcristaux résultent de l'alignement régulier de monomères d'actine qui forment un feuillet.

Les conditions dans lesquelles les paracristaux sont obtenus n'existent pas dans la cellule. Toutefois, on y retrouve des réseaux et des faisceaux d'actine qui ressemblent aux paracristaux de Hanson ou de Kawamura. Ces arrangements de filaments sont induits par des ABP cytoplasmiques de pontage telles la filamine et la fascine.

1.1.7. Les fonctions de l'actine

L'actine est impliquée dans deux fonctions : elle participe à la motilité cellulaire et elle est un des constituants du cytosquelette.

1.1.7.1. L'actine est impliquée dans la motilité cellulaire

Un des phénomènes de motilité qui dépend de l'actine est tout d'abord la contraction musculaire [57, 58]. Dans le muscle squelettique, l'actine interagit avec les têtes globulaires des filaments épais de myosine (**figure 7**).

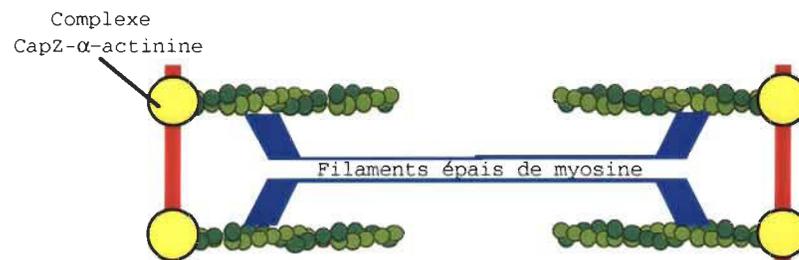


Figure 7. Schéma d'une bande A d'un sarcomère de muscle strié. L'interaction de la myosine avec l'actine se fait au niveau des têtes globulaires de la myosine. Les filaments d'actine sont fixés au niveau des stries Z formées par des complexes CapZ- α -actinine [58].

Sous l'effet d'une libération de calcium dans le cytosol, par le réticulum sarcoplasmique, les têtes de myosine s'attachent aux filaments d'actine. L'ATP, présent au niveau des sarcomères, est ensuite hydrolysé par les têtes de myosine, ce qui provoque un changement de conformation de ces têtes globulaires de myosine. C'est ce changement de conformation qui produit le mouvement des filaments dans le sarcomère en faisant glisser parallèlement les filaments d'actine, le long des filaments de myosine. Le sarcomère raccourcit alors et, de ce fait, provoque la contraction de la fibre musculaire.

L'actine participe à la contraction musculaire, mais on la retrouve également dans les cellules non musculaires, où elle intervient dans d'autres types de motilité, en particulier la mitose [58, 82], le mouvement amiboïde [27, 58], la cyclose, l'endocytose et le transport d'organites [1, 6, 12, 30, 46, 54, 81]. Ces phénomènes de motilité impliquent que l'actine doit avoir des propriétés dynamiques importantes. Par exemple, dans le mouvement amiboïde, où différentes parties du cytoplasme subissent des changements rapides de viscosité, l'actine se présente tantôt sous la forme de longs filaments, tantôt sous la forme de filaments plus courts ou sous forme de monomères [27]. C'est la longueur des filaments qui détermine la viscosité locale du cytoplasme de la cellule, étape essentielle au mouvement amiboïde.

1.1.7.2. L'actine est un constituant du cytosquelette

L'actine est aussi un des constituants du cytosquelette [16]. Les filaments d'actine s'associent entre eux, ainsi qu'avec d'autres protéines pour former un réseau filamenteux rigide. L'actine participe ainsi au maintien de la forme de la cellule, et ceci en association avec les filaments intermédiaires et les microtubules.

Pour accomplir ces deux fonctions, la motilité et la formation du cytosquelette, les filaments d'actine doivent être fixés, d'une façon ou d'une autre, à la membrane cellulaire. Par exemple, la forme biconcave de l'érythrocyte est due à la présence d'un réseau sous-membranaire de filaments, dont ceux d'actine, qui rapproche les deux faces opposées du globule rouge. Bien entendu, le réseau de

filaments d'actine doit être attaché à la membrane par l'intermédiaire de points d'ancrage. Sans ces points d'ancrage, le cytosquelette ne serait qu'un réseau de filaments lâches et libres dans le cytoplasme.

Maintenant que nous avons établi que le cytosquelette doit être lié à la membrane pour être fonctionnel, nous allons traiter de l'interaction entre l'actine et la membrane cellulaire.

1.2. INTERACTIONS ENTRE L'ACTINE ET LA MEMBRANE CELLULAIRE

1.2.1. Les ABP membranaires

L'interaction entre l'actine et la membrane cellulaire est un domaine très étudié. Plusieurs auteurs admettent que l'actine se fixe à la membrane par l'intermédiaire de protéines, qui sont des ABP membranaires [32, 44, 49, 58, 64, 92].

Outre les myosines de types I et V qui, en se liant à la fois à la membrane et à l'actine, provoquent le mouvement de certains organites [6, 58, 81], il existe de nombreuses autres ABP membranaires qui lient l'actine à la membrane (**tableau 2**). Un exemple de l'interaction de l'actine à la membrane plasmique est celui du cytosquelette de l'érythrocyte. Le modèle érythrocytaire a été largement étudié puisque, le globule rouge n'ayant pas d'organite, il est relativement facile d'étudier les protéines de la membrane cytoplasmique sans interférence des protéines de la membrane des organites. Les recherches portant sur l'interaction entre l'actine et la membrane de l'érythrocyte ont établi que l'actine se lie à la membrane de deux

façons [22, 33]. Tout d'abord, l'actine est reliée à la bande 3, une protéine membranaire intrinsèque, via la spectrine et l'ankyrine.

Tableau 2. Caractéristiques de quelques ABP membranaires

Nom de la protéine	Masse molaire (kDa)	Type de cellules/Caractéristiques	Réf.
Dystrophine	427	<ul style="list-style-type: none"> Protéine de pontage. Retrouvée dans le réseau cortical du muscle. Lie l'actine à un complexe glycoprotéique intrinsèque. 	32, 58, 80
Spectrine	240 (α) 220 (β) nd	<ul style="list-style-type: none"> Retrouvée chez l'érythrocyte. Lie l'actine F à la bande 3 via l'ankyrine. 	22, 33, 44
Ankyrine			
Protéine 4.1 Adducine	78 nd	<ul style="list-style-type: none"> Retrouvée chez l'érythrocyte. De concert avec l'adducine, lie l'actine F à la glycophorine et à la protéine de la bande 3, deux protéines transmembranaires. 	44
α -actinine	200	<ul style="list-style-type: none"> Retrouvée chez les organismes supérieurs et inférieurs. 	44, 89
Vinculine	130	<ul style="list-style-type: none"> Cellules des vertébrés Constituant principal des régions membranaires impliquées dans les contacts cellule-cellule et cellule-substrat. 	44, 64

L'actine est aussi liée à la glycophorine, une protéine de la membrane, par l'intermédiaire de l'adducine et de la bande 4.1.

Un autre exemple de protéine membranaire très étudiée est celui de la ponticuline. La ponticuline est une glycoprotéine de 17 kD que l'on retrouve dans la membrane de *Dictyostelium discoideum* [59, 60, 93]. Le rôle de cette protéine est de catalyser la phase de nucléation en permettant la formation rapide de nuclei à la

surface de la membrane. Les monomères qui s'ajoutent au nucleus forment des filaments qui restent donc liés à la membrane.

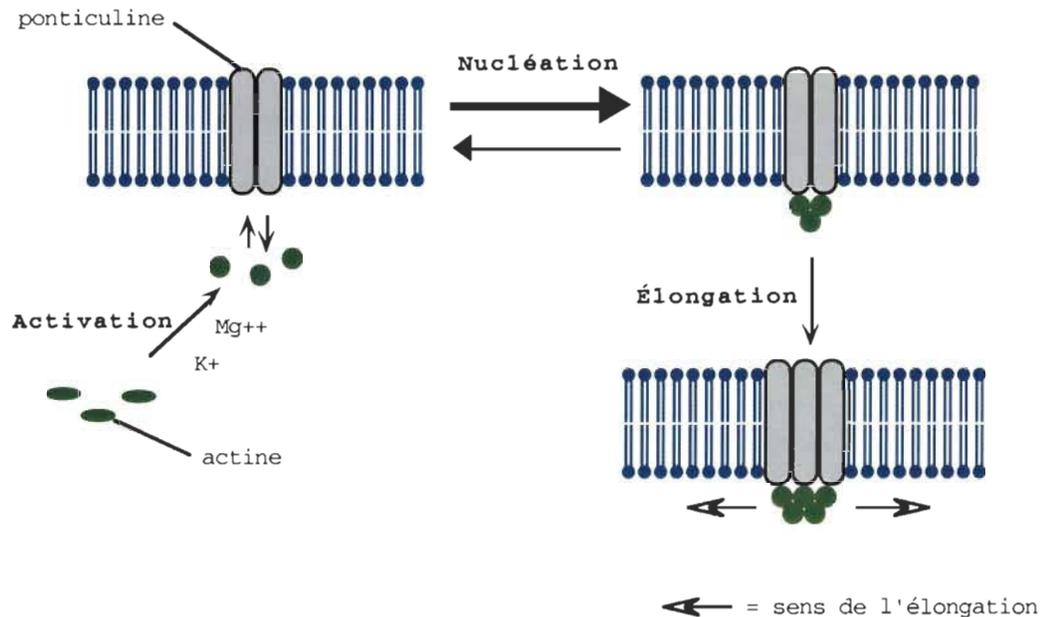


Figure 8. Mécanisme de liaison de l'actine à la membrane via la ponticuline. Le mécanisme de cette interaction est le suivant : l'actine monomérique s'assemble en trimères qui sont stabilisés par deux unités de ponticuline. L'ajout d'une unité supplémentaire de ponticuline permet l'addition d'autres monomères pour former un filament d'actine. D'après Luna *et al.* [79], modifié.

Des revues plus exhaustives des ABP membranaires ont été publiées par Isenberg [44] et Isenberg et Niggli [45]. Ces publications, qui résument les travaux sur les interactions cytosquelette-membrane, soulignent que l'actine interagit avec la membrane par l'entremise d'ABP membranaires. Il existe cependant une autre possibilité qui a été peu envisagée : celle d'une interaction directe de l'actine avec les lipides membranaires.

1.2.2. Interaction directe de l'actine avec les lipides membranaires

Parmi les recherches qui concernent la fixation de l'actine aux membranes, rares sont celles qui ont envisagé une interaction directe entre l'actine et les lipides membranaires. Cependant, une telle interaction a été mise en évidence *in vitro* et il a été établi que l'actine F se fixe sur des membranes artificielles composées uniquement de lipides: les liposomes [21, 36, 55, 75].

L'interaction directe de l'actine avec des lipides a été tout d'abord mise en évidence avec des liposomes chargés positivement [75] (**figure 9**). L'actine F, en présence de liposomes cationiques constitués de PC:SA (9:1), se fixe à la surface de ces liposomes et s'organise en paracristaux bidimensionnels, formés par des filaments d'actine parallèles (**voir figure 2**). Ces filaments sont disposés en phase, c'est-à-dire qu'un monomère donné dans un filament s'associe latéralement seulement au monomère correspondant du filament adjacent. La périodicité de 36,5 nm observée en microscopie électronique correspond au pas d'hélice des filaments.

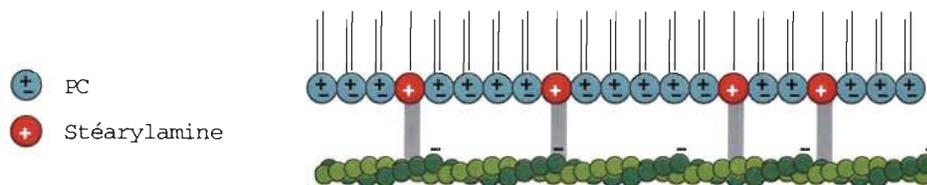


Figure 9. Interaction électrostatique entre l'actine F, de charge globale négative, et une membrane positive composée de PC:SA. Le dessin n'est pas à l'échelle : les molécules d'actine sont réduites par rapport aux molécules de lipides.

La formation de paracristaux à la surface des liposomes montre que, lorsque l'actine se fixe au liposome, elle change de conformation, ce qui expose des sites

qui permettent l'interaction latérale des filaments. De ces travaux, il a été déduit que l'actine F, qui est chargée négativement, se lie aux lipides chargés positivement par des liens électrostatiques.

L'actine G, qui est chargée négativement, se fixe elle aussi à la surface de liposomes chargés positivement. Cependant, comme il n'y a pas de magnésium dans le milieu, ce sont des monomères et non des filaments qui se fixent à la surface des liposomes. Ceux-ci polymérisent et s'organisent quand même en cristaux bidimensionnels à la surface des liposomes [55]. Les lipides chargés positivement induisent donc la polymérisation de l'actine, mais seulement à la surface de liposomes.

Comme les membranes chargées positivement n'existent pas dans la nature, des études ont été entreprises avec des liposomes neutres ou anioniques dont la composition en lipides est proche de celle de la membrane cellulaire. Les résultats de ces travaux montrent que l'actine se lie aussi de façon électrostatique avec de tels liposomes, mais seulement en présence de cations divalents (Mg^{2+}) à des concentrations de l'ordre du millimolaire. Le mécanisme qui a été suggéré est que les cations divalents neutralisent les charges négatives des groupes phosphates des têtes polaires [42]. Il reste alors une membrane dont la charge nette est positive, qui attire les charges négatives de l'actine (**figure 10**). Le mécanisme d'interaction actine-lipides neutres et actine-lipides négatifs est donc aussi de nature électrostatique, tout comme l'interaction actine-lipides cationiques.

D'autre part, des expériences faites en F.T.I.R. montrent que, lorsque l'actine est en contact avec des lipides, il se produit des modifications au niveau de la bande amide I de l'actine. En présence de liposomes neutres (DSPC) le rapport plis β :hélices α augmente [36].

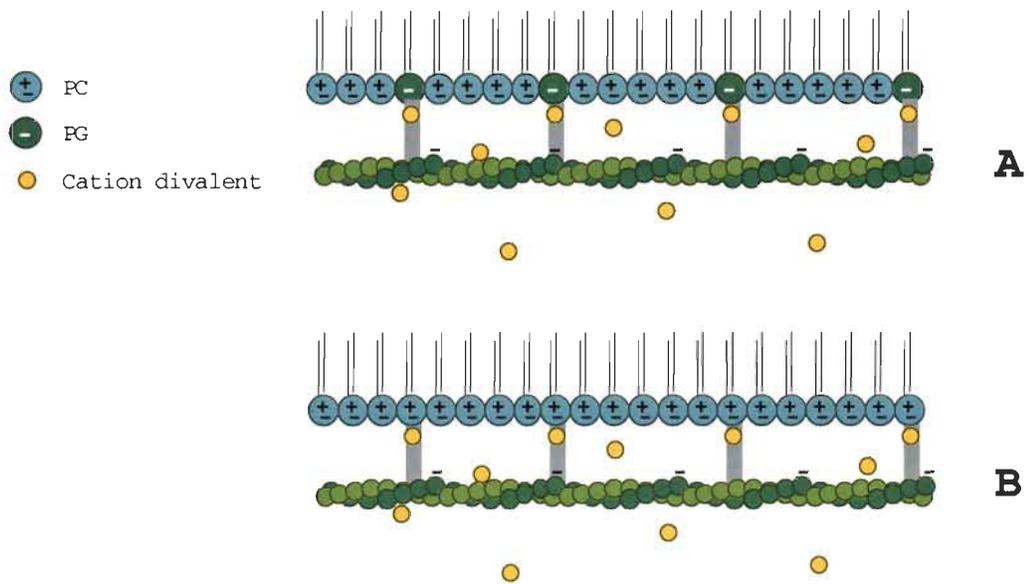


Figure 10. Interaction entre l'actine F et (A) une membrane chargée négativement composée de PC:PG et (B) une membrane neutre de PC seul. Les cations divalents présents dans le milieu neutralisent les charges négatives des lipides, ce qui permet une interaction électrostatique entre les lipides et l'actine. Le dessin n'est pas à l'échelle : les molécules d'actine étant réduites par rapport aux molécules de lipides.

La protéine subit donc un changement de conformation lorsqu'elle interagit avec une membrane. Par contre, le spectre infra-rouge des lipides n'est pas ou peu modifié par la présence d'actine, ce qui suggère que très peu de molécules de lipides sont impliquées dans l'interaction avec l'actine.

Puisque l'interaction actine-lipides est de nature électrostatique, la charge des lipides, donc la nature de la tête polaire, doit influencer cette interaction. Jean-

François Comtois [21] a donc entrepris une série d'expériences pour voir quelle était la spécificité des lipides dans cette interaction, en particulier comment la nature de la tête polaire modifie cette interaction.

1.2.3. Effet de la tête polaire des lipides sur l'interaction actine-lipides: les travaux de J.F. Comtois

Afin de voir quel est l'effet de la tête polaire des phospholipides sur l'interaction actine-lipides, J.F. Comtois [21] a préparé une série de liposomes composés de lipides dont les têtes polaires sont différentes. La liste des liposomes qu'il a utilisés est donnée au tableau suivant.

Tableau 3. Composition en lipides des liposomes utilisés lors des expériences de J.F. Comtois [21].

Composition des liposomes	Charge nette
DMPC seul	neutre
DMPC+DMPE (1:1)	neutre
DMPC+DMPS (1:1)	négatif
DMPC+DMPG (1:1)	négatif
DMPC+DMPA (1:1)	négatif

J.F. Comtois a voulu utiliser des liposomes composés que d'un seul lipide (DMPC, DMPE, DMPS, DMPG et DMPA). Cependant, certains de ces lipides ne forment pas des liposomes dans des conditions ioniques compatibles avec celles utilisées pour l'actine, car les têtes polaires qui ont une charge globale négative ont tendance à se repousser [21]. Il a donc été nécessaire, pour préparer des liposomes avec des lipides chargés, d'utiliser des mélanges d'un lipide avec du DMPC. L'ajout de molécules neutres de DMPC diminue la répulsion de têtes polaires

chargées et permet la formation de liposomes. J.F. Comtois n'a donc pu utiliser des liposomes composés de lipides purs pour faire ses expériences, mais des mélanges de lipides, ce qui a compliqué l'interprétation de ses résultats.

Les techniques utilisées par J.F. Comtois pour caractériser l'interaction actine-lipides sont la calorimétrie différentielle à balayage (DSC) et la microscopie électronique.

Avant de poursuivre plus loin, voici rapidement le principe de la DSC. Lorsque l'on chauffe une substance à vitesse constante, celle-ci peut changer d'état et absorber ou libérer de la chaleur [21, 34, 71, 73]. Le calorimètre permet de quantifier ces changements d'états (par exemple la dénaturation d'une protéine, ou la fusion d'un lipide). Le thermogramme de dénaturation de l'actine F comprend deux phases. Tout d'abord, il y a absorption d'énergie par la protéine. Sur un thermogramme, ceci se traduit par un pic endothermique qui se situe à environ 70°C pour l'actine F. Dans un second temps, il y a libération d'énergie par les molécules d'actine dénaturées, vraisemblablement due à l'agrégation des protéines, ce qui donne un pic exothermique. Ainsi, lors de la dénaturation thermique de l'actine F, nous avons deux pics : un pic de dénaturation et un pic d'agrégation. La dénaturation de l'actine G, elle, se fait en une seule étape endothermique et à plus basse température que l'actine F (~60°C). Les expériences antérieures à J.F. Comtois [71] ont montré des modifications dans le thermogramme de dénaturation de l'actine lorsque celle-ci est en présence de liposomes, ce qui peut être interprété comme le résultat d'une interaction de

l'actine avec les lipides. La DSC a donc été un outil intéressant dans l'étude des interactions actine-lipides.

1.2.3.1. Interaction de l'actine avec les liposomes neutres

Les résultats obtenus par J.F. Comtois ont établi que, en présence de liposomes composés de lipides neutres, DMPE ou DMPC, il y a disparition du pic d'agrégation de l'actine F. Ce résultat montre qu'il y a une interaction entre l'actine et ces lipides. D'autre part, en présence d'actine F, la transition de phase des lipides est aussi modifiée. On note en particulier une légère baisse de l'enthalpie de la transition de phase des lipides qui correspondrait, selon Papahadjopoulos [69], à une interaction électrostatique, accompagnée d'une légère pénétration de la bicouche par la protéine. La nature électrostatique du phénomène est confirmée par le fait que l'ajout de KCl inhibe l'interaction actine-lipides.

Les observations en microscopie électronique de ces préparations d'actine F et de lipides montrent que les filaments d'actine recouvrent la surface des liposomes où ils s'organisent en structures paracrystallines. Ceci confirme l'interaction actine-lipides, mais ne précise pas la nature du phénomène.

1.2.3.2. Interaction de l'actine avec les liposomes anioniques

Les résultats obtenus par J.F. Comtois avec les liposomes anioniques qui contiennent du DMPA sont différents de ceux qui contiennent du DMPS ou du DMPC. Ils seront donc traités séparément.

A- Cas du DMPS et du DMPG

Les liposomes composés par du DMPS ou du DMPG, mélangés avec du DMPC, induisent des modifications du thermogramme de l'actine. On observe une disparition complète du pic exothermique caractéristique de l'agrégation de la protéine. L'aspect du thermogramme de l'actine F ressemble alors beaucoup à celui de l'actine G, ce qui suggère une dépolymérisation des filaments.

D'autre part, la microscopie électronique montre que les préparations contiennent peu de longs filaments d'actine, mais surtout de courts filaments et de très petites unités d'actine. Il semblerait que les liposomes qui contiennent du DMPS ou du DMPG induisent la dépolymérisation de l'actine.

B- Cas du DMPA

En ce qui concerne le DMPA, J.F. Comtois a tout d'abord remarqué que la transition de phase des liposomes composés d'un mélange DMPA+DMPC est caractéristique des mélanges de lipides non miscibles. En présence de ces liposomes, le pic de dénaturation de l'actine disparaît, ce qui montre bien qu'il y a une interaction entre l'actine et ces liposomes.

De plus, la microscopie électronique montre de nombreux filaments d'actine à la surface des liposomes mais qui ne les recouvrent pas totalement. Les résultats de Comtois peuvent s'expliquer par une interaction entre l'actine et les microdomaines de DMPC. L'interaction de l'actine avec le DMPA n'est toutefois pas évidente.

1.2.3.3. Conclusions sur les travaux de J.F. Comtois

Les résultats obtenus par J.F. Comtois ont bien montré que la nature de la tête polaire des lipides modifie l'interaction avec l'actine et que le phénomène est de nature électrostatique. Cependant, les résultats de cet auteur ne sont pas toujours conformes à ce que l'on attendait. En effet, pourquoi le DMPS et le DMPG dépolymérisent-ils l'actine? Pourquoi le DMPA donne-t-il des résultats différents du DMPS et du DMPG? L'interprétation des phénomènes observés est complexe et ceci pour deux raisons :

- ① Tout d'abord, J.F. Comtois a dû utiliser des lipides mélangés au DMPC afin d'obtenir des liposomes dans des conditions ioniques qui soient compatibles avec l'actine. Il est bien évident que, dans ce cas, il devient très difficile de distinguer l'effet dû au lipide DMPS, DMPG ou DMPA de celui du DMPC.
- ② D'autre part, lorsque J.F. Comtois a fait son travail, il ignorait que les phospholipides ont en général une haute affinité pour les cations divalents [42]. En effet, Herbette et ses collaborateurs ont montré que les phospholipides captent les cations divalents (surtout le Ca^{2+} et le Mg^{2+}) qui se fixent au niveau de la charge négative portée par le phosphate de la tête polaire du lipide [42]. La technique de la DSC nécessite l'utilisation d'une forte concentration de lipides (10 mg/ml, soit environ 15 mM dans le cas de Comtois). Or le tampon utilisé par J.F. Comtois contenait 2 mM de Mg^{2+} , nécessaire pour polymériser l'actine, concentration bien inférieure à celle des lipides. Même si une molécule

de lipide sur 10 capte un ion magnésium, il ne reste plus assez de magnésium libre dans le milieu pour maintenir l'actine à l'état polymérisé.

Plusieurs résultats de J.F. Comtois, et notamment ceux obtenus avec le DMPS et le DMPG, peuvent s'expliquer par la captation du magnésium par les lipides, captation suffisante pour dépolymériser l'actine. L'effet de la tête polaire ne serait donc qu'un effet indirect.

1.3. LES FILMS MONOMOLÉCULAIRES DE LANGMUIR

1.3.1. Généralités

La technique des films monomoléculaires est très utilisée dans l'étude des interactions protéines-lipides. Une excellente revue sur l'utilisation des monocouches dans l'étude des biomembranes a été publiée par Demel [25].

Certaines molécules, comme les lipides et les alcools à longue chaîne, ont des régions ayant des polarités différentes. Par exemple, un phospholipide possède une tête polaire (hydrophile) et deux chaînes acyles (hydrophobes) (**figure 11**). On dit de cette molécule qu'elle est amphiphile.

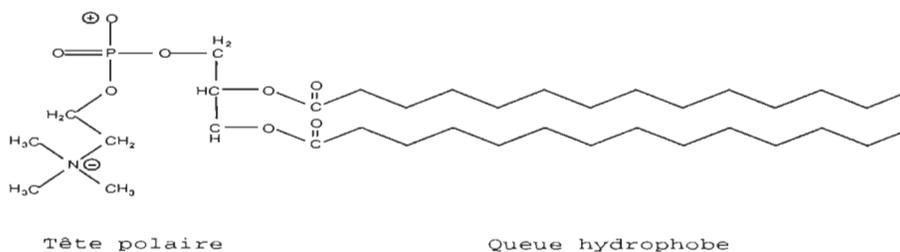


Figure 11. Molécule de dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC).

Lorsqu'elles sont mises en milieu aqueux, les molécules de lipides présentent leurs têtes polaires vers l'eau et leurs chaînes acyles hors de l'eau (**figure 12**). Il se forme alors des micelles ou des vésicules artificielles : les liposomes. Cette organisation est thermodynamiquement stable, c'est-à-dire que les molécules sont à un niveau énergétique minimal [8, 35].

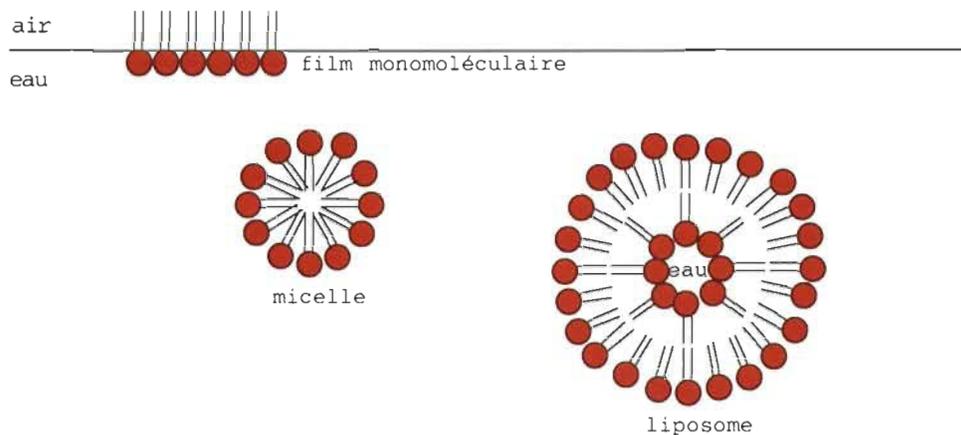


Figure 12. Différentes organisations thermodynamiquement stables formées par des molécules de lipides en solution aqueuse.

Si l'on dépose des lipides à l'interface air/eau, ces lipides vont s'orienter de telle manière qu'ils aient la tête polaire dans l'eau et les chaînes acyles dans l'air. En comprimant les molécules, nous obtenons des films monomoléculaires, aussi appelés films de Langmuir car mis au point par Irwing Langmuir au début du siècle. Cependant, les premières études systématiques des monocouches de lipides ont été faites par Agnes Pockels, qui a jeté les bases de la chimie des interfaces en réalisant des films d'acides gras dans sa cuisine à la fin du siècle dernier (pour un historique, voir la référence [2]). Les résultats de ses recherches ont été publiés en collaboration avec Lord Rayleigh en 1891.

1.3.2. Principe de fonctionnement d'un bain de monocouches

La figure suivante illustre une cuve de Langmuir typique. La cuve est remplie jusqu'aux bords d'une solution aqueuse, sur laquelle seront déposées les molécules de lipides. Connaissant le nombre de molécules qui ont été ajoutées à la surface, il est possible de déterminer l'aire moyenne disponible pour chaque molécule de lipide. Une barrière mobile permet de faire varier la surface de la cuve et, par conséquent, de comprimer ou décompresser les molécules en surface. Un capteur de tension de surface ou plaque de Wilhelmy est relié à une balance microanalytique et permet de suivre la pression de surface.

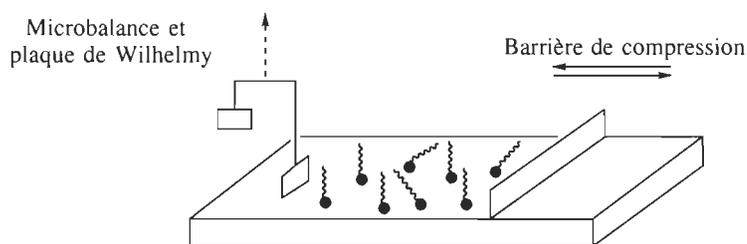


Figure 13. Schéma simplifié d'une cuve de Langmuir (schéma aimablement fourni par Marine Le Letty, E.N.S. de Lyon, France).

Une description plus exhaustive de la cuve utilisée à Lyon sera faite dans la partie Matériel et méthodes.

1.3.3. Paramètres mesurés en monocouche

1.3.3.1. Pression de surface

Une substance amphiphile, située à l'interface d'un milieu aqueux, exerce une force [18, 56]. En monocouche, cette tension de surface est mesurée à l'aide d'une plaque de Wilhelmy (**figure 14**).

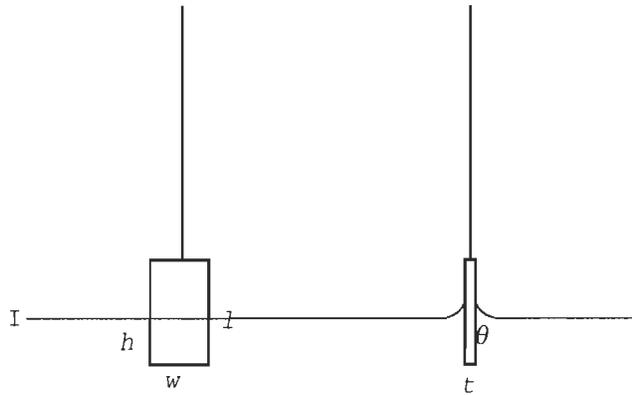


Figure 14. Schéma d'une plaque de Wilhelmy à l'interface air-eau (I) vue de face et de profil.

La tension exercée par le liquide à l'interface dépend de la largeur de la plaque (w), de sa hauteur (l), de son épaisseur (t), de la profondeur d'immersion de la plaque (h) de même que de l'angle de contact avec l'interface (θ). La tension superficielle d'un liquide, soit la force F exercée sur la balance par la plaque de Wilhelmy, est donnée par la relation suivante:

$$[1.1] \quad F = (D)g(l w t) + 2\gamma(T + W)(\cos\theta) - D_l g T W h_l$$

où:

D	=	densité de la plaque
g	=	accélération gravitationnelle
l	=	longueur de la plaque
w	=	largeur de la plaque
t	=	épaisseur de la plaque
γ	=	tension de surface du liquide
h_l	=	profondeur d'immersion
θ	=	angle de contact avec l'interface

À partir de la tension superficielle, on trouve la pression de surface (π) qui est la différence entre la tension de surface du film de molécules (γ) et la tension de

surface de la sous-phase seule (γ_0):

$$[1.2] \quad \pi = \gamma - \gamma_0$$

La pression de surface se mesure en millinewtons par mètre (mN/m).

1.3.3.2. Aire moléculaire

Comme la surface du bain à monocouche est connue, il est possible, connaissant le nombre de molécules étalées à l'interface air/eau, de calculer l'aire disponible pour une seule molécule de lipide. Cette aire est appelée **aire moléculaire** et elle se calcule d'après la formule suivante:

$$[1.3] \quad A = \frac{a}{n}$$

où a est l'aire du bain et n le nombre de molécules étalées. Ainsi, en diminuant la surface du bain, l'aire moléculaire diminue.

Si l'on mesure la pression de surface d'un film en fonction de l'aire moléculaire, on obtient une courbe appelée **isotherme** (graphique π/A). L'isotherme permet de mettre en évidence les différentes phases lors de la compression. La **figure 15** est un exemple typique d'un isotherme d'acide stéarique. À de grandes aires moléculaires, lorsque la pression de surface est inférieure à 0,1 mN/m, la monocouche est dans ce que l'on appelle la **phase gazeuse (G)** [7]. Les molécules sont allongées à l'interface et elles se répartissent aléatoirement à la surface.

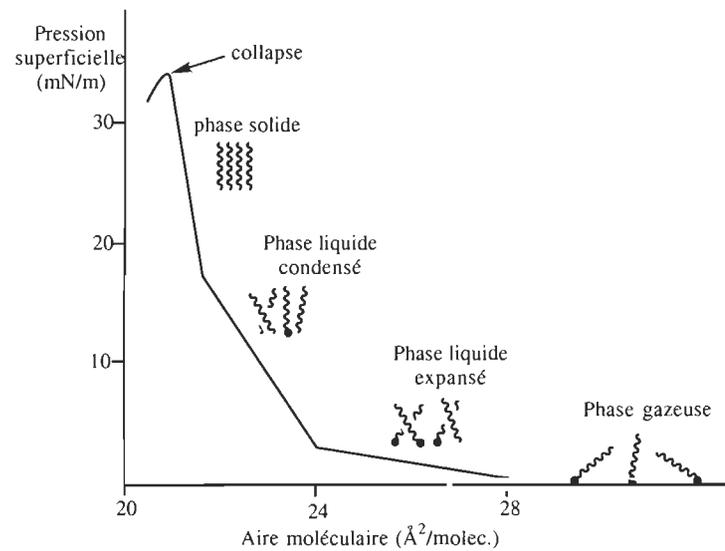


Figure 15. Isotherme π/A de l'acide stéarique et les différentes phases correspondantes (schéma gracieusement fourni par Marine Le Letty, E.N.S. de Lyon, France).

On dit que la monocouche se comporte de la même façon qu'un gaz en deux dimensions, c'est-à-dire qu'il peut se produire des collisions entre les molécules [2]. Ces collisions mises à part, il n'y a pas d'interaction importante entre les molécules.

Si l'on réduit l'aire du film, les molécules vont se rapprocher et les collisions entre les molécules se font de plus en plus fréquentes. On obtient alors le **stade liquide expansé (L_1)**. Les molécules sont soit allongées à la surface ou encore dressées perpendiculairement. Il existe une distribution statistique des différentes positions, c'est-à-dire que certaines molécules sont étalées à la surface et d'autres sont verticales [2]. Les chaînes acyles des molécules de lipides interagissent ensemble par des liens hydrophobes (forces de Van der Waals) [7]. Si on poursuit la compression, on atteint la **phase liquide condensé (ou semi-solide) (L_2)**, où les

molécules sont toutes orientées perpendiculairement à l'interface et où il y a plus ou moins de molécules d'eau entre les têtes polaires [2]. Enfin, si l'on comprime encore, le film passe à l'**état solide (S)** où les chaînes acyles sont rapprochées les unes des autres, interagissent fortement par des liens de Van der Waals et sont parallèles [2].

Si l'on poursuit la compression, la surface n'est plus assez grande pour contenir toutes les molécules et certaines vont être expulsées soit en sous-phase, soit au-dessus de la monocouche. On assiste alors à une désorganisation de la monocouche, appelée **collapse**, qui survient selon les étapes décrites à la figure suivante.

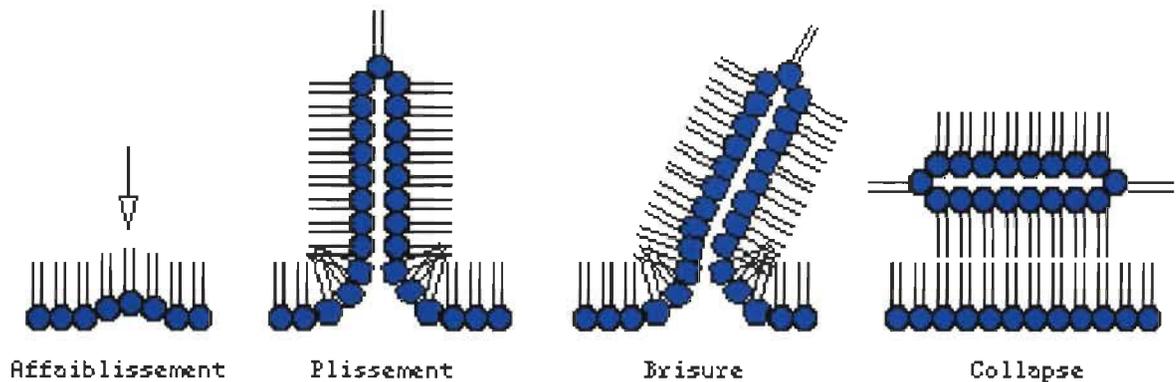


Figure 16. Séquence des différentes étapes menant au collapse d'un film monomoléculaire. D'après Adamson [2], modifié.

Si une protéine est présente à l'interface, entre les molécules de lipides, elle peut être expulsée au cours de la compression (**figure 17**). En effet, la force exercée de chaque côté de la monocouche comprime la molécule de protéine et cette molécule sera expulsée vers la sous-phase. Cette expulsion se traduit par l'apparition d'un point d'inflexion dans l'isotherme. Ce point d'inflexion survient généralement

avant le collapse, puisque les forces d'interaction entre les molécules de lipides sont en général plus grandes que celles qui existent entre les molécules de protéines et de lipides.



Figure 17. Schéma montrant l'expulsion d'une protéine insérée dans un film de lipides.

1.3.3.3. Travail de compression (W_c)

Le travail se définit comme étant la force requise pour tirer un corps de son inertie, multipliée par le déplacement. Le travail requis pour la compression d'un film monomoléculaire (W_c) est donné par l'équation suivante:

$$[1.4] \quad W_c = \int_{initial}^{final} \Pi dA$$

Le travail de compression est égal à la sommation de tous les travaux calculés pour chaque tranche d'aire moléculaire dA pour le parcours total [2, 8]. Le travail de compression dépend de la rigidité du film, qui elle dépend des forces d'interaction entre les molécules à l'interface. Ces forces d'interaction sont les forces de Van der Waals et les forces de type électrostatique. Les forces de Van der Waals s'exercent entre les chaînes hydrophobes des lipides. Ce sont ces forces d'attraction qui maintiennent les chaînes hydrophobes bien alignées les unes par rapport aux

autres et qui augmentent ainsi la rigidité du film. Les forces de Van der Waals dépendent de l'état d'agrégation des chaînes acyles des lipides. Par conséquent, le travail nécessaire pour comprimer un film à l'état gazeux est faible, puisqu'il n'y a pratiquement pas d'interaction entre les molécules. Par contre, pour la phase de liquide condensé, où les chaînes acyles sont plus tassées, il faudra un travail plus grand pour comprimer le film. Les forces électrostatiques s'exercent entre les têtes polaires des lipides et dépendent donc des conditions de forces ioniques de la sous-phase. Si les têtes polaires des lipides portent des charges de même signe, elles vont se repousser. Ceci est un facteur qui augmente le travail de compression. Toutefois, si on ajoute des sels à la sous-phase, par exemple des cations divalents, ces cations peuvent neutraliser les charges des têtes polaires, ce qui va modifier les forces de répulsion entre les molécules. Si, dans le cas qui nous intéresse, l'actine interagit avec les molécules de lipides, on pourra observer une modification du travail de compression du film de lipides.

Le travail de décompression est le travail restitué lorsque la barrière retourne à sa position initiale. La différence entre le travail de compression et de le travail de décompression donne l'énergie dissipée en chaleur, ou **hystérèse**, au cours du cycle de compression-décompression du lipide. Ainsi, un système sera plus ou moins réversible selon l'importance de l'hystérèse. Un système cohésif, c'est-à-dire un système qui retourne rapidement à son état initial au cours de la décompression, aura une petite hystérèse : la valeur du travail récupéré au cours de la décompression est proche de celle du travail de compression. Dans le cas de films composés de lipides et de protéines, l'hystérèse peut indiquer une interaction

entre les molécules. Il suffit de comparer les hystérèses respectives de films composés uniquement de lipides avec celles des mêmes films auxquels ont été ajoutées des protéines. Si la protéine interagit avec les molécules de lipides, on devrait s'attendre à une modification de l'hystérèse. S'il n'y a pas d'interaction, l'hystérèse du film avec protéine devrait être la même que celle du film sans protéine.

1.3.3.4. Module d'élasticité (K_s)

L'élasticité d'un film est sa propriété à résister à un stress. Lorsqu'il n'y a pas de molécule à l'interface, cette résistance est nulle mais augmente lorsque l'on ajoute des molécules à l'interface. C'est Gibbs qui, le premier, a défini l'élasticité d'un film [30]. Cette élasticité, dite **élasticité de Gibbs**, est exprimée par l'équation suivante:

$$[1.5] \quad E = 2s \frac{d\gamma}{ds}$$

où γ est la tension de surface et s l'aire occupée par le film. Le facteur 2 est dû au fait que la tension de surface est exercée des deux côtés du film.

Pour un film insoluble on parle aussi de constante d'élasticité (K_s) qui se définit comme suit:

$$[1.6] \quad K_s = A \left(\frac{\partial \Pi}{\partial A} \right)$$

où A est l'aire moléculaire et Π la pression superficielle [3, 35]. On comprend que, plus le K_s est élevé, plus le film est élastique. Le K_s reflète donc les interactions entre les molécules. Par exemple, si un lipide donné a une transition de phase, on observera un maximum de K_s à l'aire moléculaire correspondant à cette transition.

1.4. BUT DU TRAVAIL DE RECHERCHE

Nous avons vu que l'actine interagit avec des liposomes chargés positivement et que cette interaction est de nature électrostatique. De plus, J.F. Comtois a établi que l'actine interagit aussi avec des liposomes neutres ou chargés négativement et que la nature de la tête polaire des lipides modifie cette interaction.

Cependant, les techniques utilisées par Comtois se heurtent à deux problèmes: la captation de tous les cations divalents du milieu par certains lipides, ce qui entraîne une dépolymérisation de l'actine d'une part, et la nécessité d'utiliser des mélanges de lipides, ce qui rend les résultats difficilement interprétables. Or, il est possible de contourner ces deux problèmes en utilisant la technique des monocouches. En effet, on peut faire des films composés d'un seul lipide, DMPE, DMPS, DMPG ou DMPA, sans avoir à le mélanger avec du DMPC. De plus, dans un bain de monocouche, la quantité de lipides est tellement faible par rapport à celle des cations divalents dans la sous-phase que la captation de ces derniers par les lipides n'aura pratiquement aucun effet sur leur concentration dans la sous-phase.

L'objectif de notre travail est donc d'étudier l'influence de la tête polaire des lipides sur l'interaction actine-lipides par la méthode des films de Langmuir. Nous avons travaillé avec des lipides purs, mais également avec des monocouches composées de lipides mélangés au DMPC afin de pouvoir comparer nos résultats à ceux de J.F. Comtois.

Chapitre II: Matériel et méthodes

2.1. PRODUITS UTILISÉS

2.1.1. Les tampons

Le tampon G, dans lequel est conservée l'actine monomérique, a la composition suivante:

Tableau 4. Composition du tampon G.

Nom du produit	Concentration
Tampon tris-HCl	2 mM
CaCl ₂	0,2 mM
Azoture de sodium	0,01%
Adénosine triphosphate (ATP)	0,2 mM
β-mercaptoéthanol	0,5 mM
pH = 7,5	

Le tampon F, dans lequel est conservée l'actine polymérisée, est de même composition que le tampon G avec, en plus, 3 mM de MgCl₂.

2.1.2. Lipides

Les lipides (**tableau 5**) proviennent de chez Avanti Polar Lipids Co. (Alabaster, AL) à l'exception du DMPA qui vient de Sigma Chemical Co. (St-Louis, MO). Ceux-ci se présentent sous la forme d'une poudre et sont utilisés sans contrôle de pureté.

Tableau 5. Lipides utilisés pour la formation des films monomoléculaires.

Nom du lipide	No. de catalogue
Dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC)	850345
Dimyristoylphosphatidyléthanolamine (DMPE)	850745
Dimyristoylphosphatidylsérine (DMPS)	830033
Dimyristoylphosphatidylglycérol (DMPG)	840445
Acide Dimyristoylphosphatidique (DMPA)	P 3650

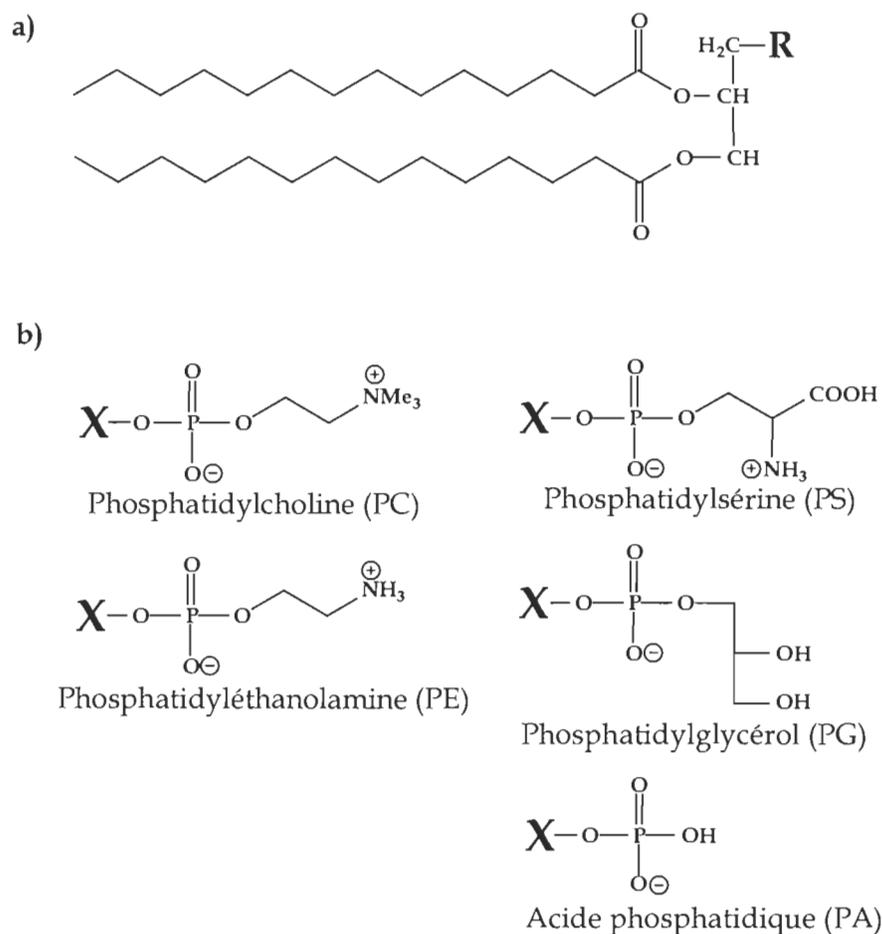


Figure 18. Structure des lipides utilisés [66]. (a) La double chaîne acyle de 14 carbones de dimyristoyl. La lettre R désigne la tête polaire. (b) Les têtes polaires neutres (PC, PE) et anioniques (PS, PG, PA). La lettre X désigne le diacylglycérol.

2.2. PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

2.2.1. Préparation de l'actine

L'actine est extraite et purifiée selon la méthode de Spudich et Watt [84], modifiée par Nonomura *et al.* [68]. Brièvement, on prépare un extrait acétonique de muscles squelettiques de lapin. Cet extrait, nommé poudre acétonique, est stocké au congélateur jusqu'à son utilisation. L'actine monomérique est ensuite extraite de la poudre acétonique par le tampon G. Une première centrifugation à haute vitesse ($100\ 000 \times g$ pendant 60 minutes) permet l'élimination des grosses protéines et des débris. Par l'ajout de 2 mM de $MgCl_2$ et de 100 mM de KCl, on induit la polymérisation de l'actine et une seconde centrifugation est réalisée afin d'obtenir un culot d'actine F. On élimine le surnageant qui contient d'autres protéines solubles et l'actine qui n'a pas polymérisé. L'actine F est ensuite placée en dialyse contre du tampon G pendant trois jours, de façon à éliminer les sels, ce qui dépolymérise l'actine. Une dernière centrifugation ($100\ 000 \times g$ pendant 1 heure) élimine les protéines dénaturées.

L'actine est dosée par mesure de l'absorbance à 290 nm ($A^{0,1\%}_{290\text{ nm}} = 0,63$) [17]. L'actine est conservée sur glace jusqu'à son utilisation. L'actine est utilisée dans les sept jours suivant sa préparation.

2.2.2. Contrôle de pureté des préparations d'actine

Le contrôle de pureté des préparations d'actine a été fait sur un gel de 12% de polyacrylamide-dodecylsulfate de sodium (SDS-Page) à l'aide d'un appareil

Protean II, de Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA), et de standards de faibles poids moléculaires, de Pharmacia Fine Chemicals (Suède). Les protéines sont révélées au bleu de Coomassie.

La figure suivante représente l'électrophorégramme de trois préparations d'actine caractérisées par la présence d'une bande principale à environ 45 kDa, qui correspond au poids moléculaire de l'actine (42 051 Da) [31]. L'actine constitue plus de 95% des protéines [17, 71].

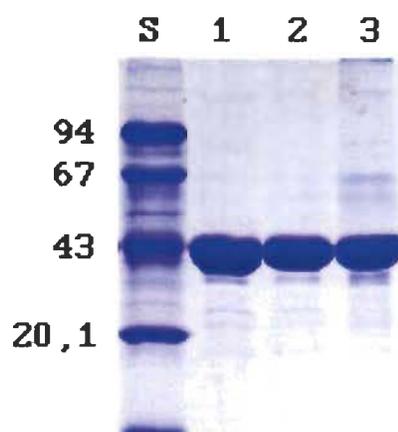


Figure 19. Électrophorégramme sur SDS-Page montrant la pureté de préparations d'actine utilisées au cours des expériences. Les protéines pour étalonnage sont dans le puits de gauche (S), alors que les puits 1, 2 et 3 contiennent des préparations différentes d'actine.

2.2.3. Préparation des lipides

Les lipides utilisés sont le DMPC, le DMPE, le DMPG, le DMPS et le DMPA. Des solutions de lipides 0,3 mM sont préparées dans un solvant organique. Pour le DMPE, le DMPG et le DMPS, le solvant utilisé est un mélange chloroforme:éthanol 9:1 (v/v). La solution de DMPC est préparée dans le chloroforme et la solution de

DMPA, dans un mélange de chloroforme:éthanol 1:1 (v/v) [77]. Nous avons aussi fait des mélanges équimolaires de DMPC + autre lipide. Pour ce faire, nous avons mélangé des volumes égaux de 150 μ l de chaque solution de lipides, environ 30 minutes avant le début de l'expérience.

2.2.4. Description de la cuve de Langmuir utilisée à Lyon

La cuve utilisée à l'É.N.S de Lyon est constituée de téflon et a des dimensions de 132 mm \times 457 mm \times 10 mm, soit un volume total de 1140 ml et une aire maximale de 603 cm² (figure 20).

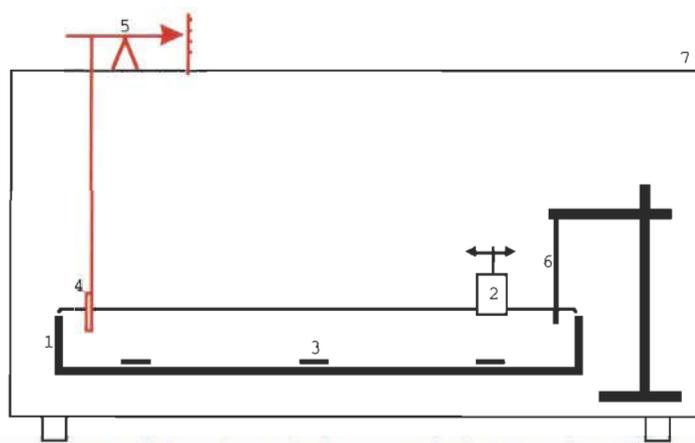


Figure 20. Représentation schématique de la cuve de Langmuir utilisée à Lyon. La cuve (1) en téflon est surmontée d'une barrière mobile (2) également en téflon servant à faire varier l'aire de la surface. La sous-phase est agitée par des barreaux magnétiques (3). La plaque de Wilhelmy en papier filtre (4) est reliée par un fil de platine à une balance microanalytique (5). Un thermocouple (6) donne la température de la sous-phase en temps réel. Le tout est abrité dans une enceinte de plexiglass (7).

L'aire minimale possible est de 80 cm². Une barrière mobile en téflon balaie la surface de façon à comprimer ou décompresser les molécules en surface. Le dispositif de mesure de la pression de surface est composé d'un rectangle de papier filtre (plaque de Wilhelmy) étalonné et relié par un fil de platine à une

balance microanalytique Setaram γ 21A. La cuve est thermostatée par un serpentín de verre disposé au fond de la cuve et relié à un bain réfrigérant Tauchkúler (Colora, Allemagne) compensé par un élément chauffant Lauda (Königshofen, Allemagne), le tout agité par un moteur BioBlock Scientific. Toutes les manipulations sont réalisées à $22,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

2.2.5. Mesure de l'adsorption de l'actine aux lipides

2.2.5.1. Préparation de la cuve

Dans un premier temps, la cuve est remplie de tampon (G ou F) jusqu'à formation d'un ménisque dépassant légèrement les bords. Afin de débarrasser la cuve des poussières et de toute substance tensioactive, la barrière est amenée à l'aire minimale. Les poussières, qui se retrouvent sur une surface réduite, sont aspirées à l'aide d'une pipette Pasteur reliée à une pompe à vide. Ces étapes sont répétées 3 à 4 fois avant le début de chaque expérience.

Afin de contrôler la propreté de la surface, un isotherme du tampon seul est tracé. Une variation de plus de $0,1 \text{ mN/m}$ de la pression de surface, pour une compression complète de l'interface de la cuve, est jugée inacceptable.

Avant et après chaque expérience, la cuve, la barrière mobile, la plaque de Wilhelmy et les seringues d'étalement sont lavées à l'eau, à l'éthanol et au chloroforme, afin d'éliminer toute trace de lipides et de protéines. La verrerie utilisée au cours des expériences a été nettoyée à l'acide sulfochromique, rincée plusieurs fois à l'eau déminéralisée, puis séchée.

2.2.5.2. Enregistrement des isothermes

Tout d'abord, 200 μl d'une solution de lipides (300 μM) sont étalés à la surface du tampon avec une seringue de verre, ce qui représente une aire moléculaire initiale d'environ 160 \AA^2 /molécule de lipide (**figure 21**).

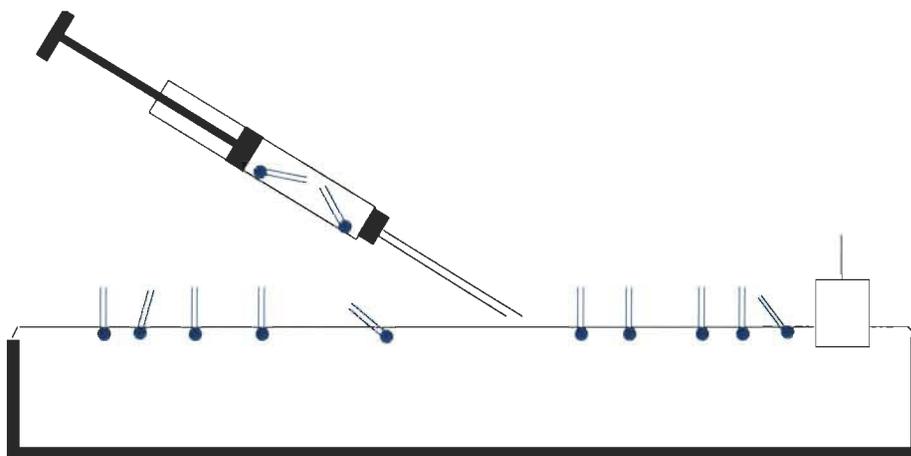


Figure 21. Étalement des lipides à l'interface.

On attend 30 minutes afin de permettre au solvant de s'évaporer. Un premier isotherme, qui est celui du lipide seul, est alors enregistré. La vitesse de compression ou de décompression du film est de 7,5 \AA^2 /molécule par minute pour tous les isothermes. Puis, après avoir ramené la barrière à mi-chemin de la longueur de la cuve, on ajoute en sous-phase une quantité d'actine, comme indiqué à la **figure 22**, pour obtenir une première concentration d'actine en sous-phase de 2,1 nM. La barrière est ensuite ramenée à l'aire maximale et la sous-phase est agitée 10 minutes, à l'aide de trois petits barreaux magnétiques qui permettent la répartition uniforme de l'actine. Un temps supplémentaire d'incubation de 50 minutes, sans agitation, permet d'atteindre l'équilibre entre les composants.

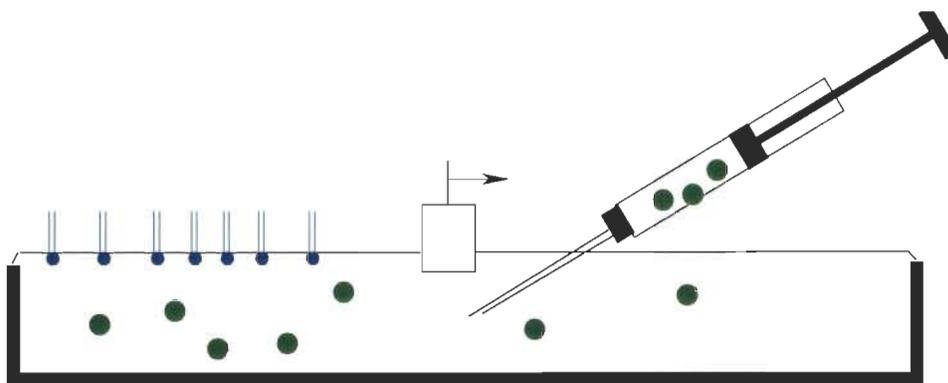


Figure 22. Injection d'actine en sous-phase. La barrière mobile est amenée au centre de la cuve.

On enregistre alors un second isotherme qui est celui du même film de lipides sur une sous-phase d'actine à 2,1 nM. Afin de voir l'effet de la concentration d'actine, on répète cette expérience avec des concentrations finales d'actine en sous-phase de 4,4, 6,4 et 13,3 nM.

2.2.6. Traitement des données

Les données transmises par les senseurs de la cuve (balance microanalytique et position de la barrière mobile) sont recueillies par un micro-ordinateur muni d'un processeur Pentium 133 MHz. Le traitement ultérieur des données (travail de compression, de décompression, de dissipation, et constante d'élasticité) a ensuite été réalisé à l'aide du logiciel Igor Pro v. 3.01 (WaveMetrics, Inc.) sous interface Macintosh (PowerPC 7600/132).

Chapitre III: Résultats

Afin d'étudier les interactions entre l'actine et des films de différents lipides par la technique de Langmuir, nous avons tout d'abord tracé l'isotherme, c'est-à-dire la courbe de pression de surface en fonction de l'aire moléculaire, du lipide seul. Nous avons ensuite injecté des quantités croissantes d'actine sous la monocouche et tracé un nouvel isotherme après chaque ajout d'actine.

Dans ce chapitre, nous traiterons d'abord des isothermes des lipides seuls puis des isothermes de l'actine seule. Par la suite, nous présenterons les isothermes des lipides sur une sous-phase d'actine. Compte tenu du grand nombre d'isothermes obtenus, et pour éviter la répétition dans la présentation des résultats, tous les isothermes sont mis en annexe. Seules certaines courbes sont présentées afin d'illustrer les résultats.

3.1. ISOTHERMES DES LIPIDES SEULS

3.1.1. Isothermes des lipides, sur une sous-phase de tampon G, sans Mg^{2+}

La **figure 23** montre un isotherme de compression-décompression de DMPC, en absence d'actine. Cet isotherme comprend deux parties : l'isotherme de compression, obtenu lorsque l'on diminue l'aire du bain, et l'isotherme de décompression, obtenu lorsque l'on augmente l'aire du bain. L'isotherme de décompression est situé en dessous de l'isotherme de compression et a en général la même forme que l'isotherme de compression.

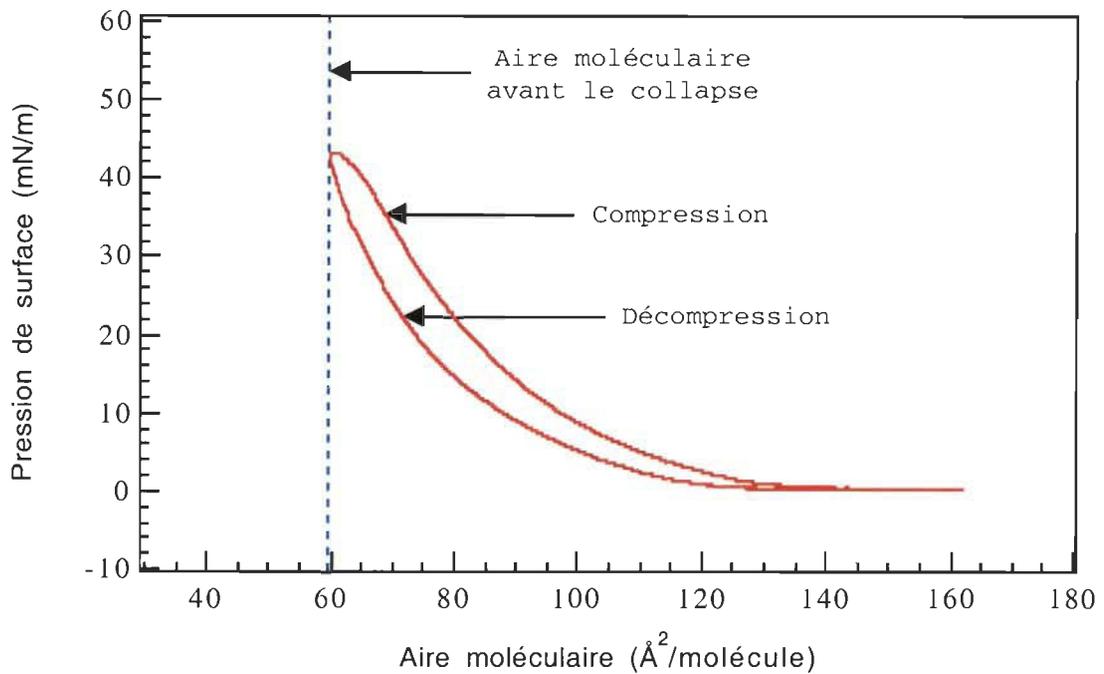


Figure 23. Isotherme de DMPC sur du tampon G.

Dans le cas de l'isotherme de compression du DMPC, illustré à la **figure 23**, la pression de surface augmente de façon régulière jusqu'à l'amorce d'un plateau, qui correspond au début du collapse. Pour le DMPC sur du tampon G sans magnésium, le collapse survient à une pression de surface égale à 43 mN/m et à une aire moléculaire de 60 Å². Il est à souligner que, lors de nos expériences, nous avons veillé à ne pas dépasser le collapse, afin de ne pas briser le film. Il est alors possible, après décompression, de retracer l'isotherme du même film sur une sous-phase d'actine. La comparaison de l'isotherme du lipide seul et du même lipide sur une sous-phase d'actine est alors possible.

Certains lipides (DMPE, DMPS et DMPG) présentent un point de brisure dans l'isotherme qui survient à une aire moléculaire qui est propre à chaque lipide.

Ce point de brisure correspond à la transition entre les phases L_1 et L_2 que nous avons décrites en introduction [2]. La **figure 24** illustre l'isotherme du DMPG qui montre cette transition de phase qui se produit à une aire moléculaire de 70 \AA^2 pour une pression de surface de 24 mN/m .

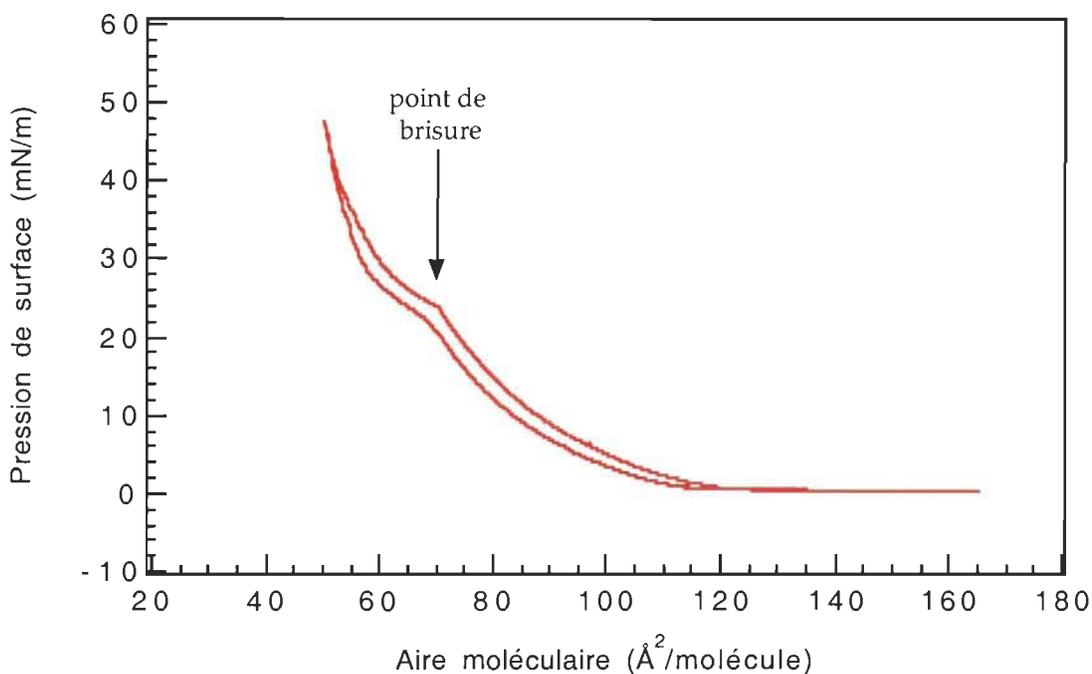


Figure 24. Isotherme de DMPG.

L'isotherme du DMPA est semblable à celui du DMPC, c'est-à-dire qu'il n'a pas de point de brisure. Par contre les isothermes du DMPE et du DMPS sont semblables à celui du DMPG et présentent un point de brisure à $70 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ à une pression de surface de 8 mN/m pour le DMPE, et à $53 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ pour une pression de surface de 4 mN/m pour le DMPS. Ces isothermes ont été mis à l'annexe A.

3.1.2. Isothermes de mélanges de lipides, sur une sous-phase de tampon G, sans Mg^{2+}

Certaines expériences ont été faites avec un lipide (DMPE, DMPS, DMPG, DMPA) mélangé à du DMPC en proportion équimoléculaire. Nous avons tracé les isothermes de ces mélanges et les avons comparés à ceux des lipides sans DMPC. La **figure 25** montre trois isothermes de compression : l'isotherme du DMPC seul, du DMPG seul et l'isotherme d'un film composé d'un mélange équimolaire de DMPC et de DMPG. Pour ne pas surcharger la figure, la décompression n'est pas représentée. Les isothermes du DMPC et du DMPG seuls sont les mêmes que ceux qui sont présentés aux **figures 23** et **24**.

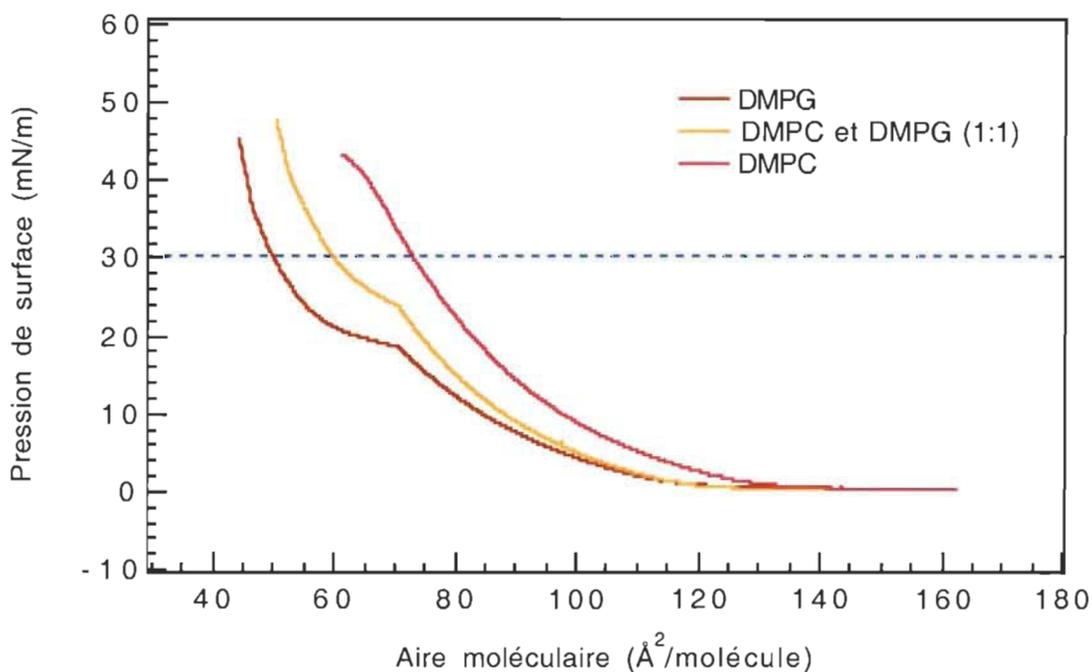


Figure 25. Isothermes de compression du DMPC seul, du DMPG seul et d'un mélange équimolaire de DMPC et de DMPG.

L'isotherme du mélange équimolaire de DMPG+DMPC est situé entre les

isothermes du DMPG et du DMPC, c'est-à-dire que, pour une pression de surface donnée, l'aire moléculaire du mélange est supérieure à celle du DMPG pur, mais inférieure à celle du DMPC pur. Par exemple, pour une pression de surface de 30 mN/m (ligne pointillée sur la **figure 25**), nous avons une aire moléculaire de 50 Å² pour le DMPG, de 60 Å² pour le mélange DMPG+DMPC et de 72 Å² pour le DMPC. De plus, il faut souligner que l'aire moléculaire à laquelle se produit la transition de phase du mélange DMPG+DMPC est la même que celle à laquelle se produit la transition de phase du DMPG seul, c'est-à-dire à 70 Å².

Des résultats semblables ont été obtenus avec tous les mélanges de lipides et les isothermes correspondants ont été mis dans les annexes A et B.

3.1.3. Effet du magnésium sur les isothermes des lipides

Les expériences effectuées avec l'actine F ont été faites dans le tampon G auquel a été ajouté 3 mM de magnésium, magnésium nécessaire pour maintenir l'actine sous forme polymérisée. Afin de vérifier que les modifications des isothermes des lipides en présence d'actine F sont bien dues à l'effet de l'actine F sur les lipides et non à l'effet magnésium sur les lipides, nous avons vérifié si le magnésium modifie l'isotherme des lipides. La **figure 26** montre les isothermes du DMPE en présence et en absence de magnésium. On peut constater que la présence de magnésium ne modifie pas la forme ni l'aspect de l'isotherme mais déplace légèrement cet isotherme vers des aires moléculaires plus grandes (4 Å²). La transition de phase L₁/L₂ se produit donc à une pression de surface légèrement plus élevée (5 mN/m). Nous avons fait les mêmes constatations avec les autres

lipides et mélanges de lipides étudiés. Le magnésium 3 mM a donc peu d'effet sur les isothermes.

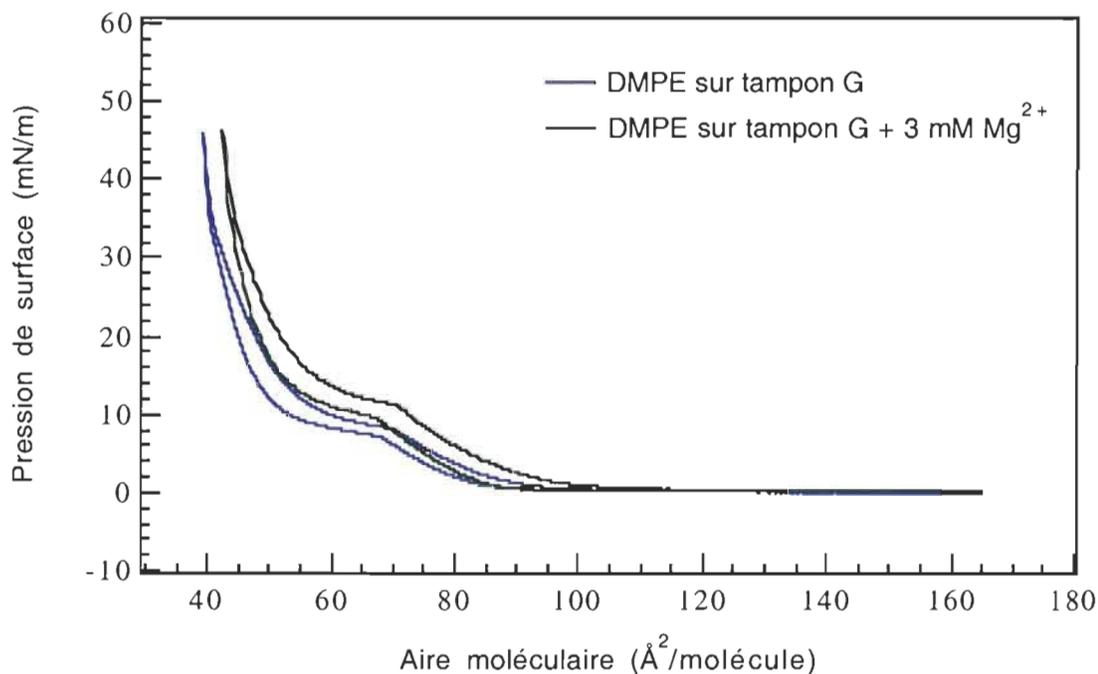


Figure 26. Effet du magnésium sur l'isotherme du DMPE pur.

3.2. ISOTHERMES DE L'ACTINE SEULE

3.2.1. Définition de l'«aire moléculaire apparente» de l'actine

L'actine étant une protéine très soluble dans l'eau, seul un petit nombre de molécules va remonter à l'interface et modifier la pression superficielle. On ne peut donc calculer l'aire moléculaire de l'actine en divisant l'aire du bain par le nombre de molécules d'actine puisque l'on ignore le nombre de molécules qui remontent à l'interface.

Afin de pouvoir comparer les isothermes de l'actine seule avec les

isothermes d'actine en présence de lipides, nous avons représenté les isothermes de l'actine seule en portant, sur l'axe des abscisses, l'aire du bain divisée par le nombre de molécules de lipides dans une expérience équivalente faite en présence de lipides. Bien entendu, cette « aire moléculaire » n'a pas de signification physique, mais elle permet la comparaison des isothermes entre eux. Nous appelons cette aire moléculaire l'« aire moléculaire apparente » de l'actine.

3.2.2. Isothermes de l'actine G et F, en absence de lipides

Lorsque l'on injecte de l'actine en sous-phase, en absence de lipides, on constate une augmentation de la pression de surface. L'actine remonte donc à l'interface. Lorsque l'on diminue l'aire du bain, la tension de surface augmente. Il est donc possible de tracer un isotherme pour l'actine seule. Les isothermes de l'actine G et de l'actine F sont représentés à la **figure 27**, pour une concentration d'actine de 6,4 nM. Nous avons également tracé les isothermes pour des concentrations croissantes d'actine (2,1 4,4, 6,4 et 13,3 nM), mais qui ne sont pas représentés pour ne pas surcharger la figure.

Pour l'actine G, nous n'avons pas observé de collapse. On peut en déduire que, lors de la compression, les molécules d'actine G sont expulsées progressivement en sous-phase sans qu'il y ait désorganisation brusque du film. Par contre, avec l'actine F 6,4 nM, il se produit un collapse lorsque l'«aire moléculaire apparente» atteint 21 \AA^2 . L'actine F forme donc un film plus structuré qui se désorganise brusquement lorsque les molécules sont suffisamment comprimées.

La **figure 27** montre que, pour des concentrations d'actine identiques, les isothermes de l'actine F sont toujours au-dessus de ceux de l'actine G. Par conséquent, pour une pression de surface donnée, l'aire moléculaire apparente de l'actine F est supérieure à celle de l'actine G.

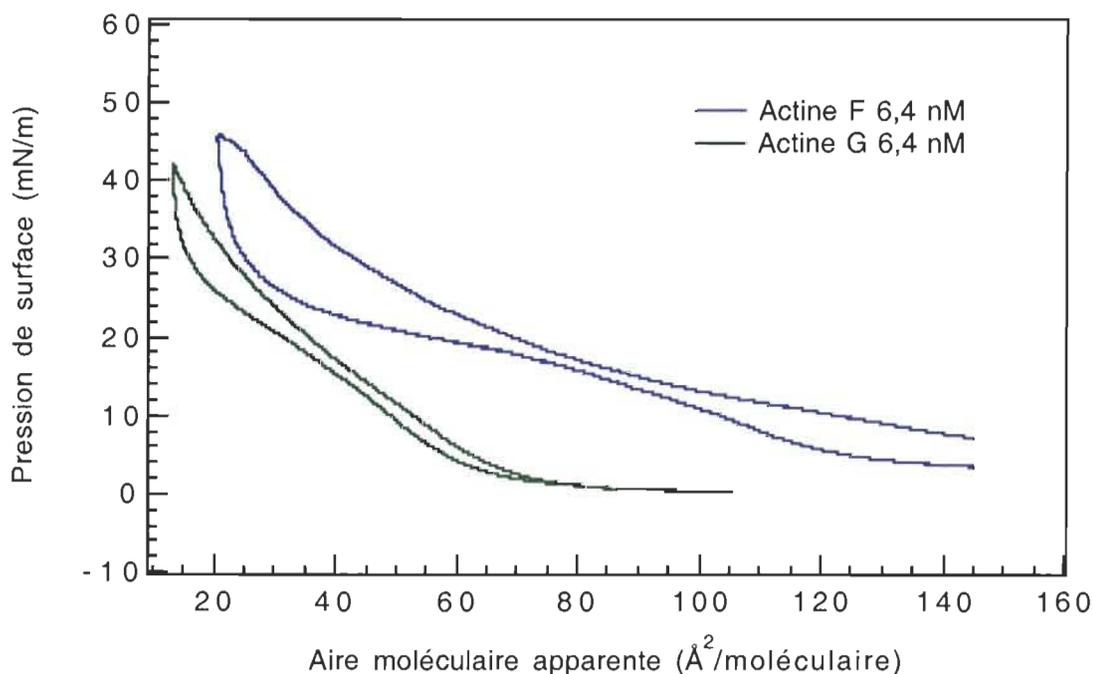


Figure 27. Isothermes de l'actine G et de l'actine F en absence de lipides.

L'actine F a donc plus d'affinité pour l'interface que l'actine G. Ceci peut s'expliquer de deux façons. Tout d'abord, il se peut que l'actine F soit plus hydrophobe que l'actine G, c'est-à-dire que, lors du changement de conformation de l'actine G en actine F, il y aurait exposition de résidus hydrophobes, ce qui donne à l'actine plus d'affinité pour l'interface. Il se peut aussi que l'actine F à l'interface soit formée par un réseau de filaments plus ou moins rigide, avec des espaces entre les filaments, à la manière des mailles d'un filet. Compte tenu de

l'existence de ces espaces entre les filaments, l'actine F occuperait donc une «aire moléculaire apparente» plus grande.

La courbe de décompression montre que, lorsque l'on augmente l'aire du bain, il y a d'abord une chute très rapide de la pression de surface, puis une baisse plus progressive. Ceci suggère que, lors de la décompression, la remontée des molécules à l'interface s'effectue en deux étapes. Une étape rapide qui se produit dès que l'on commence la décompression, suivie d'une étape plus lente. Nous suggérons que l'étape rapide est due à la dispersion des molécules à l'interface, sans que les molécules en sous-phase n'aient eu le temps de remonter. Au cours de l'étape lente, la dispersion des molécules d'actine est en partie compensée par la remontée de molécules de la sous-phase. Ce phénomène est plus marqué avec l'actine F qu'avec l'actine G car les monomères d'actine sont plus mobiles et ont plus de facilité à remonter à l'interface, dans les espaces formés lors de la décompression.

3.3. EFFET DE L'ACTINE SUR LES ISOTHERMES DES LIPIDES

Nous avons tracé et décrit les isothermes des lipides et de l'actine pris séparément. Nous allons maintenant examiner les isothermes de films mixtes de lipides et d'actine. La **figure 28** présente deux isothermes : l'un est l'isotherme du DMPC en absence d'actine (rouge), l'autre celui du même lipide sur une sous-phase qui contient 6,4 nM d'actine G (bleu).

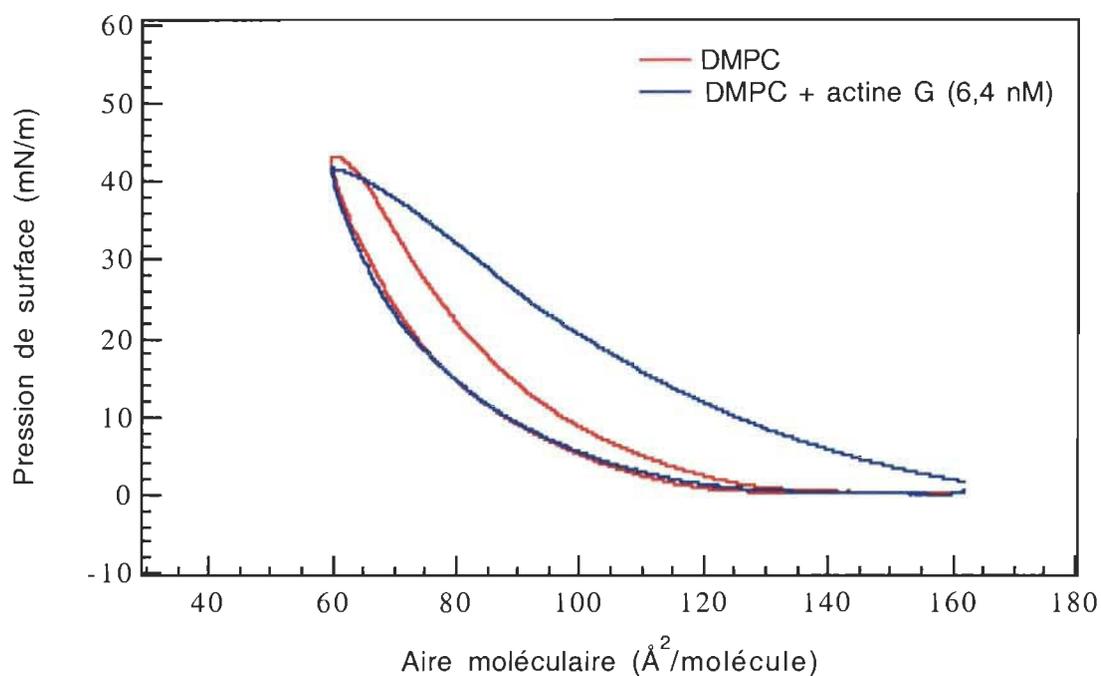


Figure 28. Isothermes du DMPC en présence et en absence d'actine G.

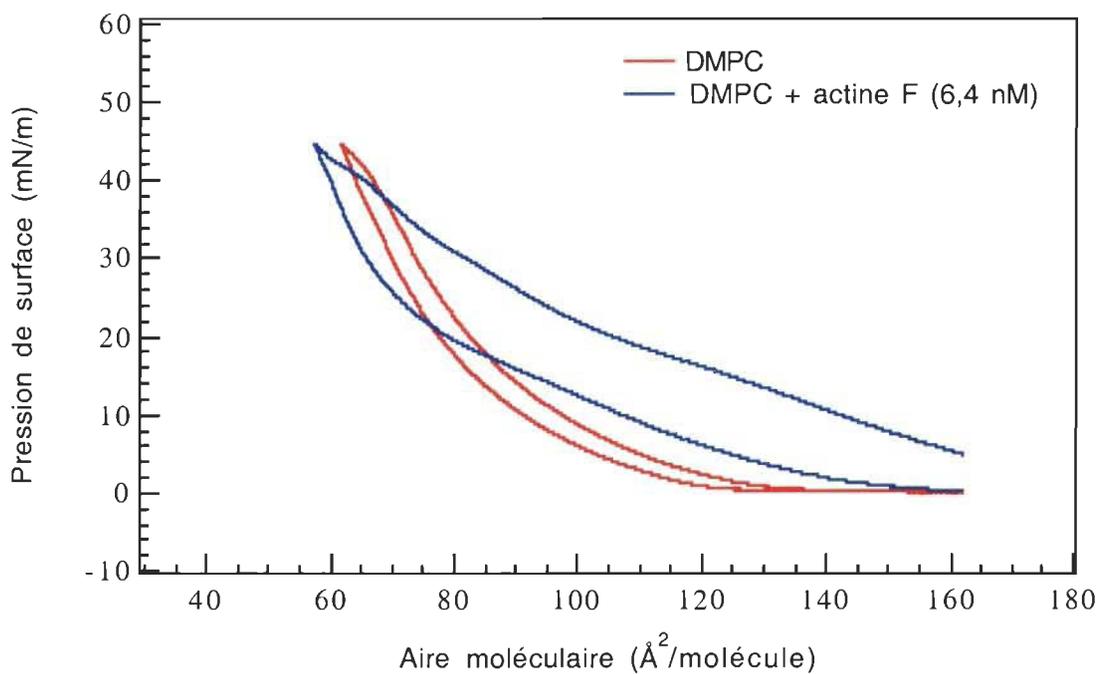


Figure 29. Isothermes du DMPC en présence et en absence d'actine F. À noter le décalage vers la gauche de l'isotherme du lipide + actine, au-dessus de 40 mN/m.

De façon générale, on remarque un déplacement vers la droite de l'isotherme lorsqu'on est en présence d'actine en sous-phase. On peut en déduire que les molécules d'actine G remontent à la surface et s'insèrent entre les molécules de lipides. Le même phénomène se produit avec l'actine F, mais le déplacement de l'isotherme est plus grand (**figure 29**). Le décalage plus important des isothermes en présence d'actine F est dû à la plus grande affinité de l'actine F pour l'interface et à son aire moléculaire apparente plus importante.

La **figure 30** montre quel est l'effet de la concentration de l'actine G et la **figure 31**, l'effet de la concentration de l'actine F sur les isothermes du DMPC. Seules les courbes de compression sont représentées pour ne pas surcharger les figures. Les courbes de compression-décompression sont présentées aux annexes A, B, C et D. On peut voir que le décalage des isothermes augmente avec la concentration d'actine G et d'actine F.

Pour des pressions de surface inférieures à 35 mN/m, l'actine G et l'actine F déplacent les isothermes du DMPC vers la droite. Par contre, phénomène particulièrement remarquable pour des pressions de surface supérieures à 35 mN/m, l'actine G, et de façon plus marquée l'actine F, déplacent les isothermes vers la gauche, c'est-à-dire que l'actine diminue l'aire moléculaire apparente du lipide. Nous pouvons interpréter le phénomène comme suit: à basse pression de surface, des molécules d'actine sont à l'interface et occupent une certaine surface qui augmente l'aire moléculaire apparente des lipides.

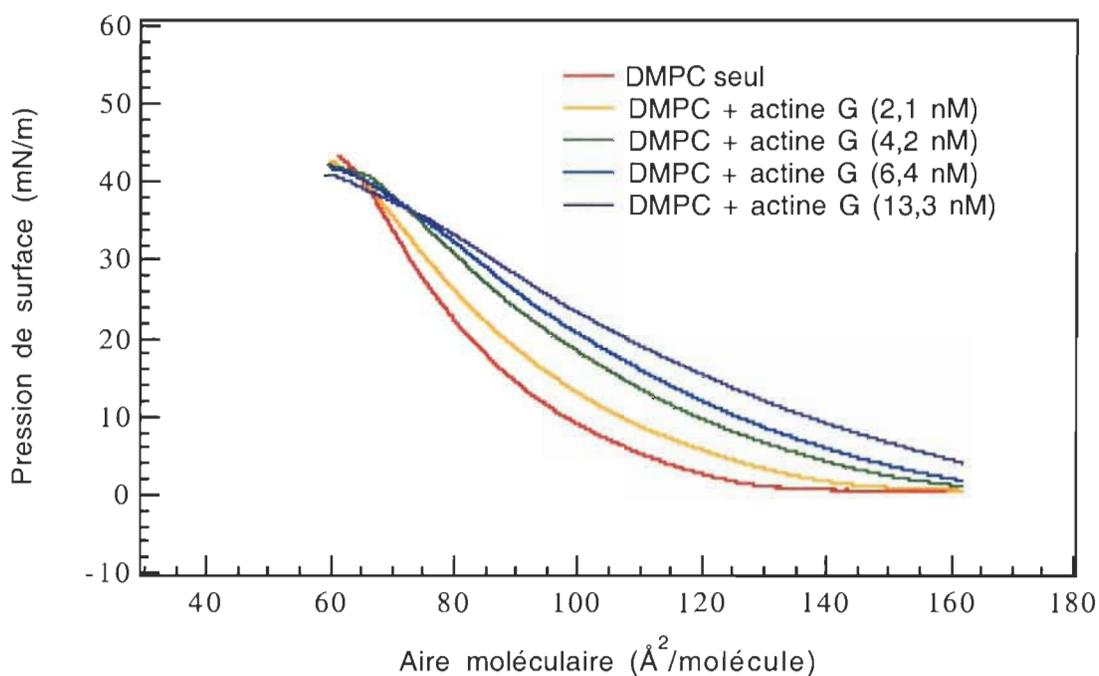


Figure 30. Schéma montrant l'effet de la concentration d'actine G sur les isothermes du DMPC pur.

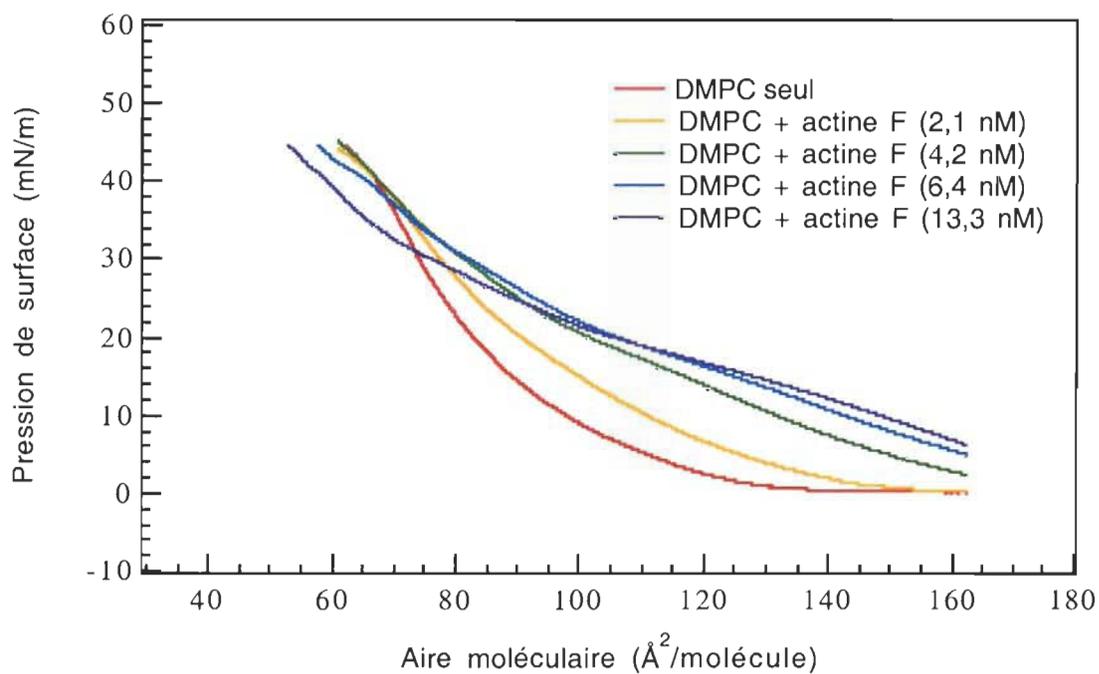


Figure 31. Schéma montrant l'effet de la concentration d'actine F sur les isothermes du DMPC pur.

À haute pression de surface, lorsque l'on comprime le film, les molécules d'actine plongent en sous-phase et entraînent avec elles des molécules de lipides. Ceci montre qu'il existe une forte affinité entre l'actine et ces lipides. D'après ces isothermes, l'actine F a plus d'affinité que l'actine G pour le DMPC car, à des pressions superficielles supérieures à 35 mN/m, les isothermes des films en présence d'actine F sont plus déplacés vers la gauche. Des résultats semblables ont été obtenus avec l'actine G et le DMPS, le DMPG et le DMPA purs, de même que les mélanges DMPS+DMPC et DMPG+DMPC. L'actine F déplace vers la gauche les isothermes de films composés DMPE+DMPC, DMPG+DMPC et DMPA+DMPC. Cependant, nous n'avons pas noté de déplacement des isothermes vers la gauche avec les lipides suivants: le DMPS et le DMPG, et le mélange DMPS+DMPC. Il se peut que ces lipides ne soient pas entraînés par l'actine lorsqu'elle plonge en sous-phase, mais il nous paraît plus probable que nous n'avons pas comprimé suffisamment le bain. En effet, lors de la compression, nous avons toujours arrêté le bain juste avant le collapse pour ne pas détruire le film et pouvoir recommencer l'expérience en présence d'une plus forte concentration d'actine.

De cette partie, nous pouvons conclure que l'actine remonte à l'interface et s'insère entre les molécules de lipides et, ceci, quelle que soit la nature de la tête polaire du lipide. De plus, l'actine F occupe plus de place que l'actine G. Lorsque l'on réduit l'aire du bain, les molécules d'actine plongent en sous-phase, entraînant des molécules de lipides. Il existe donc une interaction entre l'actine et les lipides et cette interaction est plus marquée avec l'actine F. Par contre cette série

d'expériences ne nous permet pas de préciser si certains lipides ont plus d'affinité que d'autres pour l'actine.

3.4. EFFET DE L'ACTINE SUR LE MODULE D'ÉLASTICITÉ DES LIPIDES

L'actine s'insère dans les films de lipides. Il se peut donc qu'elle modifie les transitions de phase des lipides qui surviennent lors de la compression. La courbe qui représente le module d'élasticité, où $K_s = A \left(\frac{\partial \Pi}{\partial A} \right)$ en fonction de l'aire moléculaire, permet de mettre en évidence les changements dans la pente d'un isotherme. On peut ainsi mieux visualiser les transitions de phases d'un film lors de la compression et, par conséquent, déterminer si l'actine modifie ces transitions de phase. Nous allons tout d'abord traiter de l'effet de l'actine G sur le module d'élasticité du DMPC, un lipide dont l'isotherme ne présente pas de transition de phase évidente, et du DMPE, un lipide dont l'isotherme montre nettement une transition de phase L_1/L_2 . Par la suite, nous verrons l'effet de l'actine F sur ces mêmes lipides.

3.4.1. Effet de l'actine G sur le module d'élasticité

La **figure 32a** représente les isothermes du DMPC sur une sous-phase de tampon G, en présence de concentrations croissantes d'actine G. Ce sont les mêmes courbes que celles présentées à la **figure 30** qui ont été reproduites ici afin de bien montrer la relation entre ces isothermes et les courbes de K_s correspondantes. La **figure 32b** représente le K_s en fonction de l'aire moléculaire d'un film de DMPC en

présence des mêmes concentrations d'actine G. En absence d'actine G (courbe rouge), le K_s du DMPC augmente lorsque l'aire du bain diminue pour atteindre un maximum de 94 mN/m à une aire moléculaire de $70 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$. Le maximum du pic est atteint juste avant le collapse, moment où le film a le maximum de compressibilité. En présence d'actine G, le K_s du film augmente aussi lorsque l'on comprime le film. Cependant, le pic s'élargit et la valeur maximum du K_s diminue d'autant plus que la concentration d'actine augmente. Concrètement, cela signifie que, en présence d'actine, la pente de l'isotherme est moins prononcée, c'est-à-dire que la pression de surface augmente de façon plus douce lorsque l'on comprime le film, ce qui est évident sur la **figure 32a**. Nous expliquons cette modification de l'aspect des isothermes par le fait que, lors de la compression, les monomères d'actine sont progressivement éjectés en sous-phase et, par conséquent, comme il y a perte de matériel à l'interface, la pression de surface augmente moins vite. D'autre part, on remarque que l'aire moléculaire à laquelle se produit le maximum de K_s augmente en fonction de la concentration d'actine, ce qui signifie que le maximum d'élasticité du film est atteint plus rapidement en présence d'actine, ce qui est illustré à la **figure 34**. Ceci est un résultat attendu, car il y a plus d'actine à l'interface et les molécules de lipides sont plus rapidement compressées.

Des résultats semblables ont été obtenus avec le DMPA, lipide qui, comme le DMPC, ne présente pas de transition de phase évidente. Ces résultats sont présentés à l'**annexe A**.

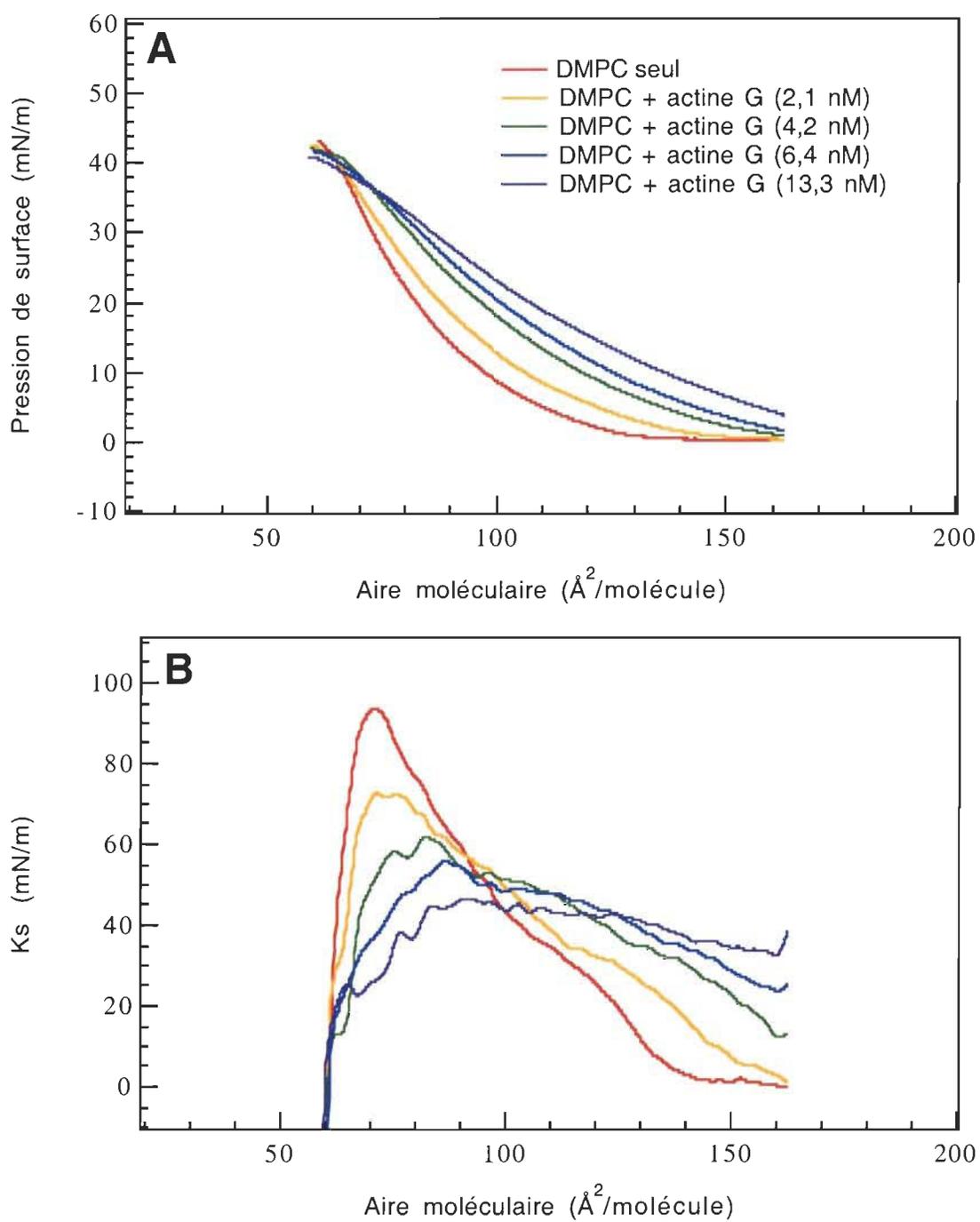


Figure 32. Effet de la concentration d'actine G sur les isothermes (A) et sur le module d'élasticité ou K_s (B) du DMPC.

La **figure 33a** représente les isothermes du DMPE sur du tampon G en absence puis en présence de concentrations croissantes d'actine G, et la **figure 33b** montre les courbes de Ks correspondantes. Les isothermes ont un point de brisure qui indique une transition de phase L_1/L_2 .

Sur la **figure 33b**, on remarque que, pour un film de DMPE sans actine (en rouge), la courbe de Ks en fonction de l'aire moléculaire présente deux pics. Un premier pic à $40 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ qui se produit juste avant le collapse et dont la valeur est de 181 mN/m . Le second pic, qui correspond à la transition de phase L_1/L_2 du lipide, survient à $72 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ et a une valeur de 36 mN/m . L'ajout en sous-phase de concentrations croissantes d'actine G produit sur la courbe de Ks du film les changements suivants:

- ① Une diminution importante du pic à $40 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$, qui correspond au collapse, dont la valeur passe de 181 mN/m à 70 mN/m en présence de $13,3 \text{ nM}$ d'actine G. Cela signifie que la présence d'actine diminue l'élasticité du film. Par contre, l'aire moléculaire à laquelle se produit le collapse est peu modifiée par la présence d'actine. Elle passe de $40 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ à $47 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$. Nous interprétons le phénomène comme suit: au cours de la compression, les molécules d'actine à l'interface, entre les molécules de lipides, sont progressivement éjectées dans la sous-phase. À la fin de la compression, juste avant le collapse, il ne reste que très peu de molécules d'actine dans le film et nous avons alors une monocouche presque entièrement composée de molécules de lipides.

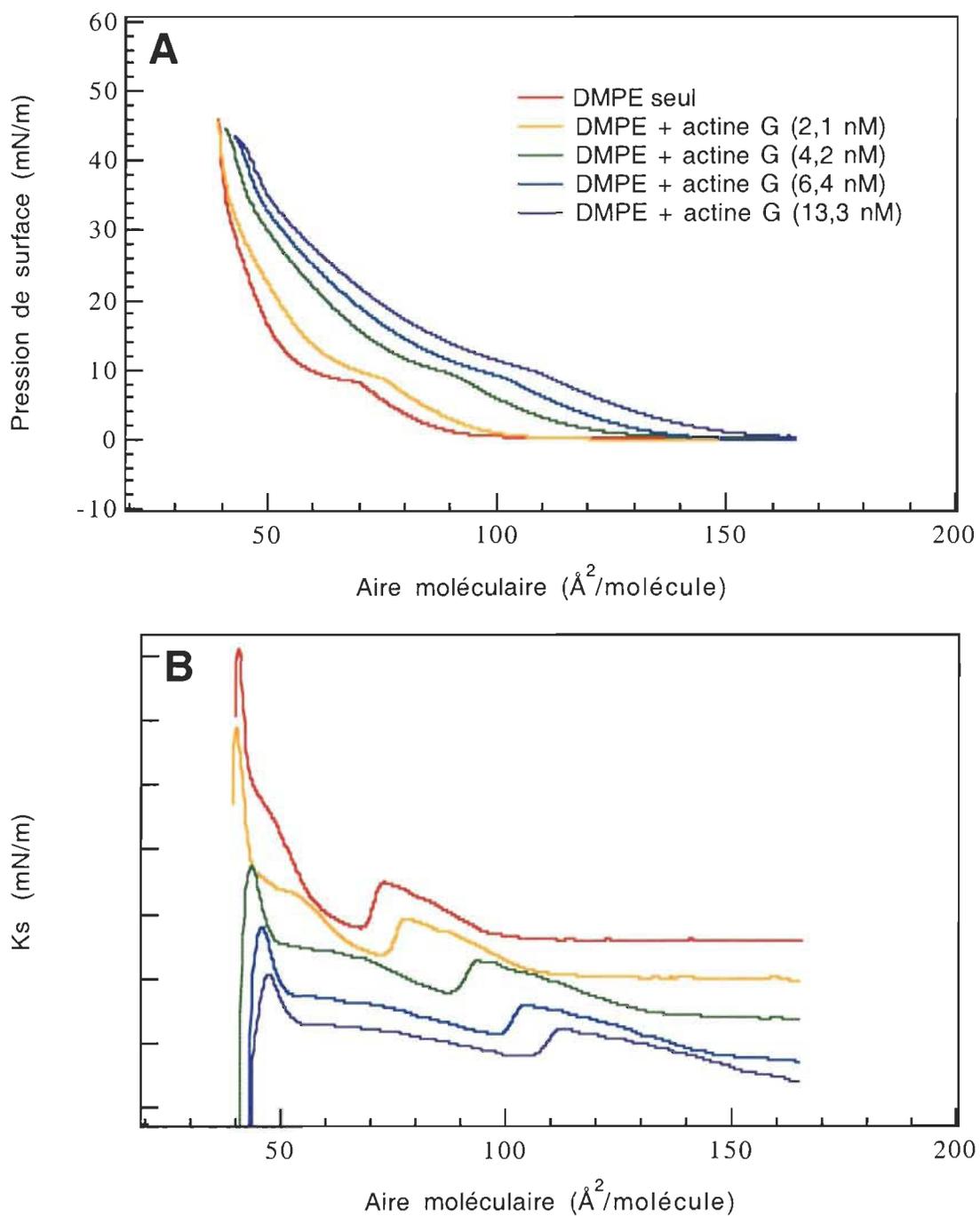


Figure 33. Effet de la concentration d'actine G sur les isothermes (A) et sur le module d'élasticité ou Ks (B) du DMPE. Les courbes de Ks ont été traduites pour plus de clarté. Chaque graduation sur l'axe des ordonnées est égale à 40 mN/m.

- ② Un élargissement du pic à 72 \AA^2 qui correspond à la transition de phase L_1/L_2 , ce qui signifie que, lorsque le film contient de l'actine, la transition de phase devient plus progressive. Ceci se traduit par une modification de l'aspect des isothermes dont le point de rupture s'estompe et devient peu visible en présence de fortes concentrations d'actine. Par contre, la valeur du maximum de K_s demeure stable à 36 mN/m . De plus, on peut remarquer que la transition de phase L_1/L_2 se produit à une aire moléculaire plus grande en présence d'actine. Elle passe de $72 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ en absence d'actine à $112 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ en présence de $13,3 \text{ nM}$ d'actine. Ce déplacement vers les hautes aires moléculaires est normal puisque l'actine occupe une certaine surface et que, par conséquent, les molécules de lipides sont plus rapidement comprimées lors de la compression. L'effet de la concentration d'actine sur l'aire moléculaire à laquelle se produisent ces deux transitions de phase est représenté à la **figure 34**.

L'actine G a le même effet sur les transitions de phases pour tous les autres lipides et mélanges de lipides qui ont une transition de phase L_1/L_2 , c'est-à-dire le DMPS et le DMPG purs ainsi que les mélanges de DMPE+DMPC, DMPS+DMPC et DMPG+DMPC. Ces résultats sont montrés aux annexes A et B. Pour tous les lipides étudiés, les isothermes et les courbes de K_s sont présentés aux annexes A et B. Par contre, la synthèse des résultats représentée par les courbes de l'aire moléculaire à laquelle se produit le maximum de K_s en fonction de la concentration d'actine G sont montrées aux **figures 34 et 35**.

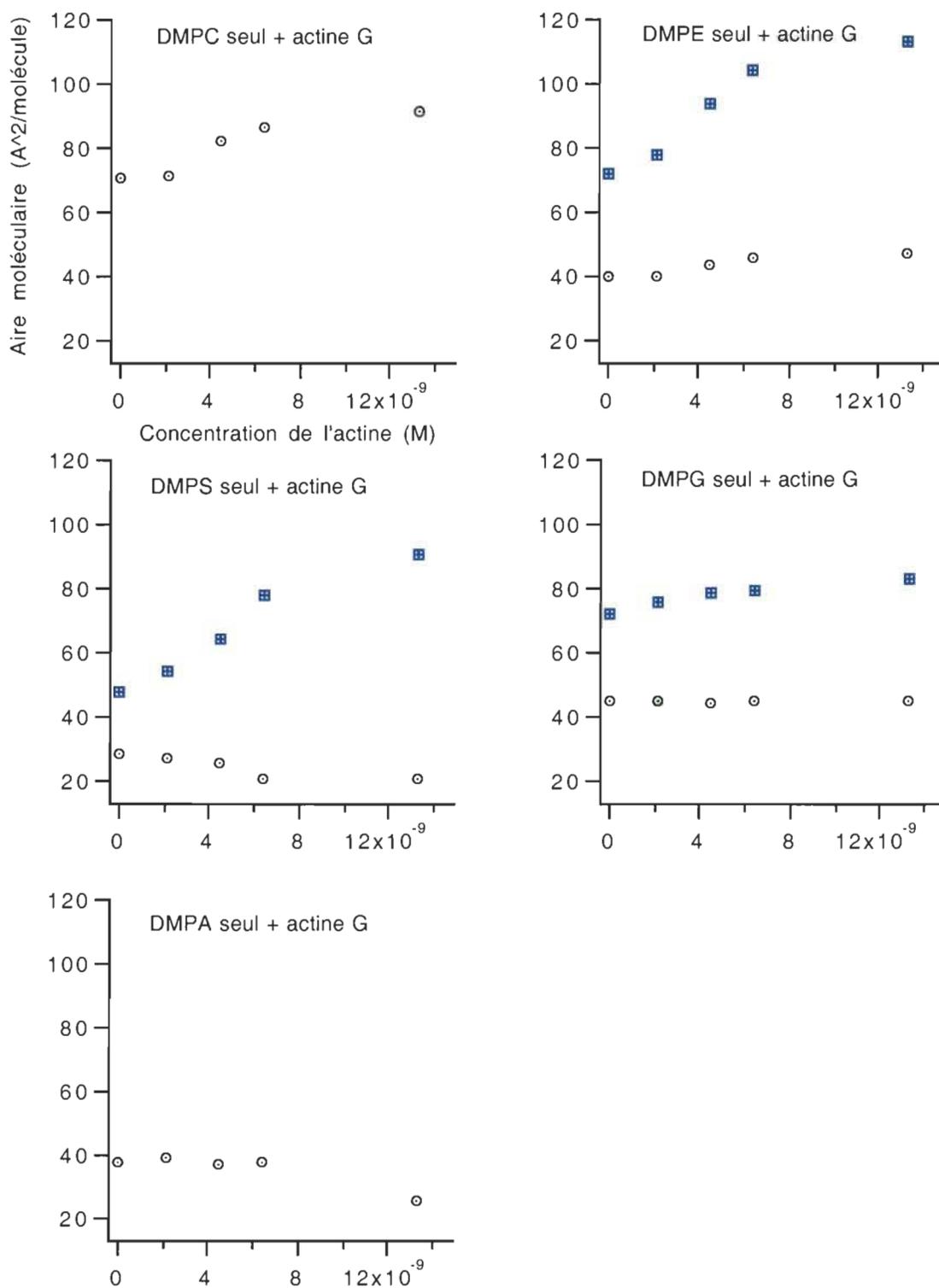


Figure 34. Aire moléculaire des maxima de Ks, correspondant au collapse ○ et à la transition L₁/L₂ ◻, des films composés que d'un seul lipide en fonction de la concentration d'actine G. A² signifie Å².

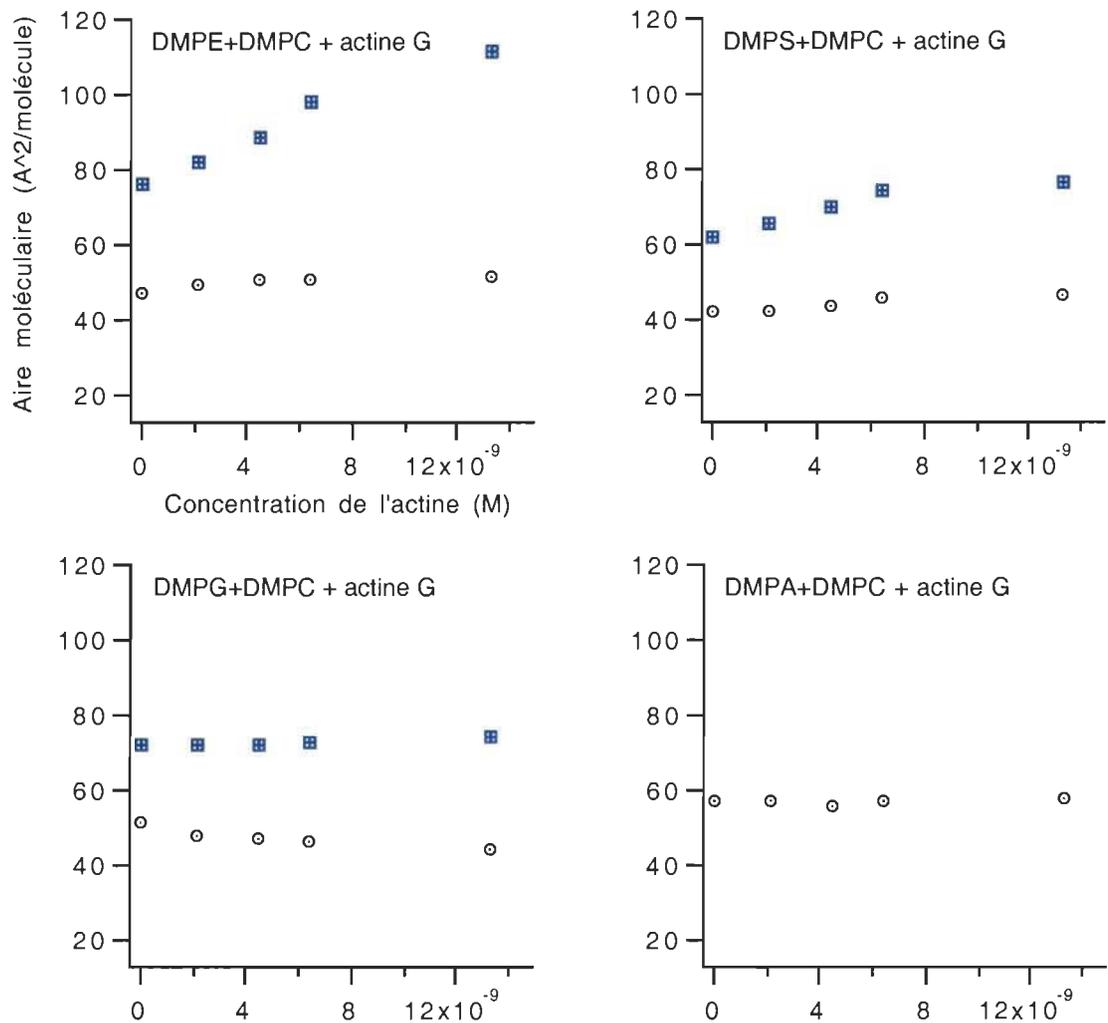


Figure 35. Aire moléculaire des maxima de K_s , correspondant au collapse ○ et à la transition L_1/L_2 , ■, des films de lipides mélangés au DMPC en fonction de la concentration d'actine G. \AA^2 signifie \AA^2 .

3.4.2. Effet de l'actine F sur le module d'élasticité

La **figure 36a** présente les isothermes du DMPC, lipide qui ne présente pas de transition de phase évidente, sur une sous-phase de tampon F, en présence de concentrations croissantes d'actine F et la **figure 36b**, les courbes de K_s

correspondantes. La courbe de K_s du DMPC en fonction de l'aire moléculaire, sans actine, sur du tampon F est semblable à celle qui a été obtenue avec le même lipide sur du tampon G. L'aire moléculaire à laquelle se produit le maximum de K_s est la même, mais la valeur du maximum de K_s est légèrement moins élevée. L'ajout de magnésium en sous-phase a donc peu d'effet sur l'élasticité du film. En présence de concentrations croissantes d'actine F, on remarque que le pic de K_s en fonction de l'aire moléculaire diminue et s'élargit pour devenir finalement un plateau en présence de fortes concentrations d'actine F. L'effet de l'actine F sur le K_s du film est donc semblable à celui de l'actine G, mais beaucoup plus marqué.

L'aire moléculaire à laquelle se produit le maximum de K_s ne change pas lorsque l'on augmente la concentration d'actine F. Ceci est illustré à la **figure 38**. On peut attribuer ce phénomène au fait que, comme avec l'actine G, l'actine F plonge en sous-phase au cours de la compression et entraîne des lipides.

La **figure 37a** présente les isothermes du DMPE, lipide qui montre une transition de phase L_1/L_2 , et la **figure 37b**, les courbes de K_s correspondantes. La courbe du K_s en fonction de l'aire moléculaire du DMPE sans actine, sur du tampon F, a le même aspect que la courbe du DMPE sur du tampon G. Elle présente deux pics. Un premier pic à $44 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ qui se situe juste avant le collapse et un deuxième pic à $70 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$, qui correspond à la transition de phase L_1/L_2 . Seule la valeur du maximum de K_s est légèrement inférieure à celle obtenue sur du tampon G, soit 143 mN/m au lieu de 181 mN/m .

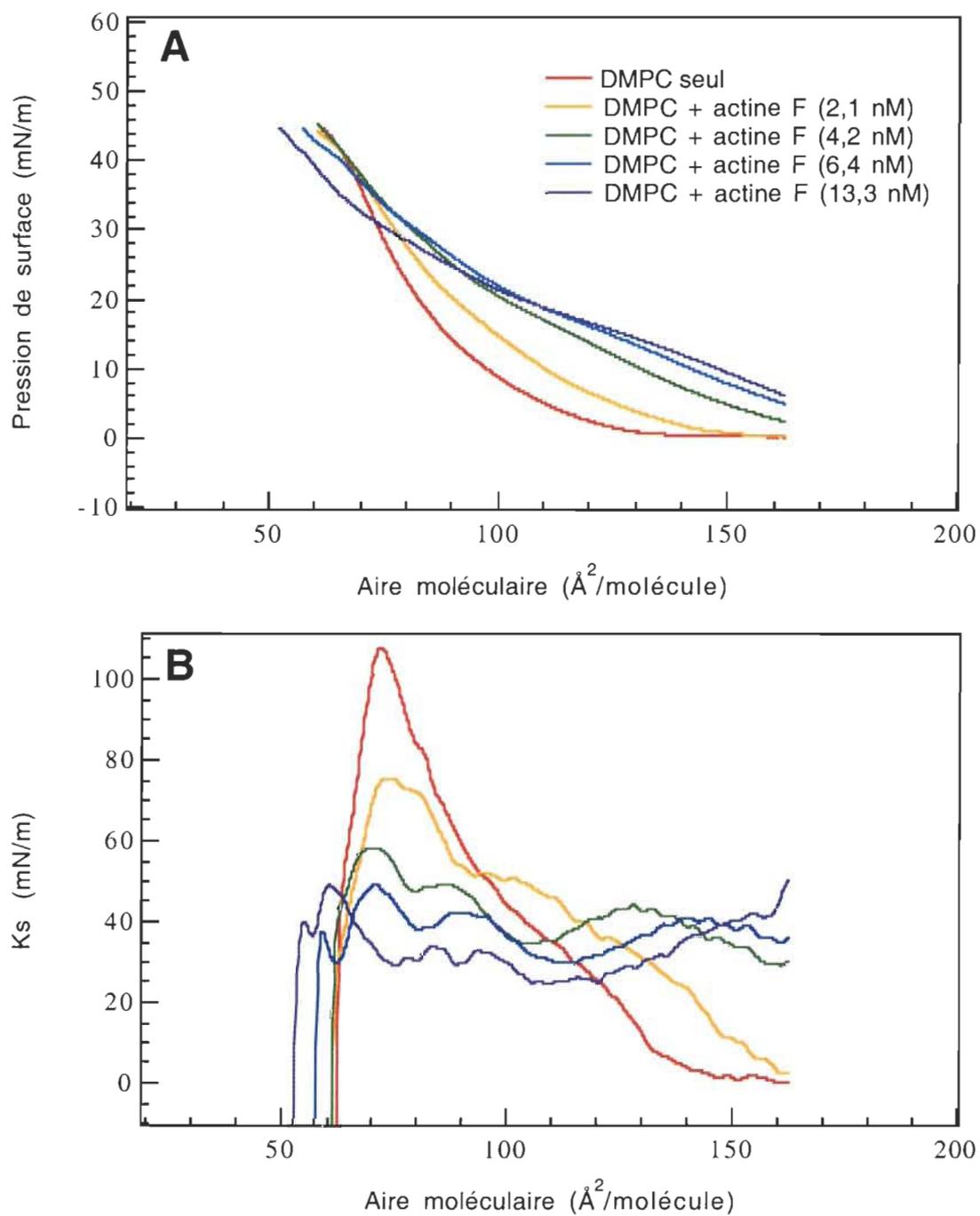


Figure 36. Effet de la concentration d'actine F sur les transitions de phase du DMPC. (A) Isothermes de compression. (B) Courbes du module d'élasticité du DMPC (K_s).

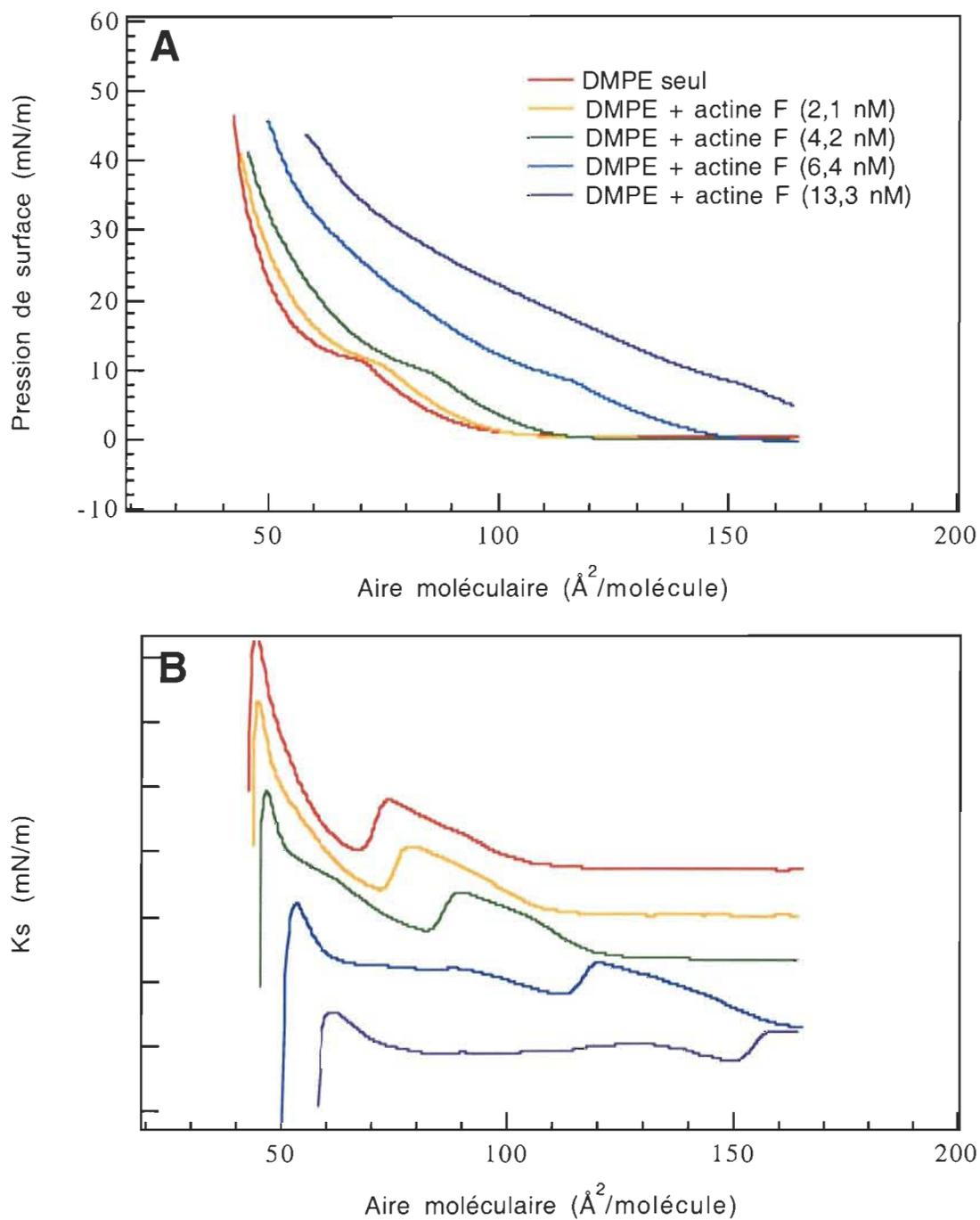


Figure 37. Effet de la concentration d'actine F sur les transitions de phase du DMPE. **(A)** Isothermes de compression. **(B)** Courbes du module d'élasticité du DMPE (K_s). Les courbes de K_s ont été traduites selon l'axe des ordonnées pour plus de clarté. Chaque intervalle sur l'axe des ordonnées vaut 40 mN/m.

Le magnésium diminue donc légèrement l'élasticité du film mais ne semble pas modifier les autres caractéristiques de la courbe de K_s . Le film de lipide est donc moins élastique sur tampon F que sur tampon G, ce qui peut être attribuable à la présence de magnésium dans la sous-phase. Les têtes polaires captent le magnésium au niveau du phosphate ce qui modifie les interactions électrostatiques entre les têtes polaires.

Si l'on ajoute des concentrations croissantes d'actine F en sous-phase, le pic à 44 \AA^2 diminue d'intensité et passe de 143 mN/m à 61 mN/m en présence de $13,3 \text{ nM}$ d'actine. L'actine F diminue donc l'élasticité du film de DMPE. De plus, le pic se déplace vers de plus hautes aires moléculaires pour atteindre $61 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ avec $13,3 \text{ nM}$ d'actine F en sous-phase (**figure 38**). Cette augmentation d'aire est de près de 17 \AA^2 et peut être expliquée comme suit. Les filaments d'actine qui interagissent avec les molécules de lipides, ne semblent pas plonger graduellement en sous-phase en entraînant des lipides avec eux, comme le fait l'actine G. Au contraire, les filaments formeraient, avec les lipides, des complexes dont le collapse survient à de plus hautes aires moléculaires. Ceci est une hypothèse en faveur d'une plus grande interaction de l'actine F que l'actine G avec les lipides. On observe la même chose avec les autres lipides, sauf pour le DMPE, le DMPS et le DMPA mélangés au DMPC (**figures 38 et 39**).

Le second pic correspond à la transition L_1/L_2 . Sur une sous-phase sans actine F, sa valeur maximale est de 43 mN/m , ce qui est légèrement supérieur à ce qui a été observé sur du tampon G.

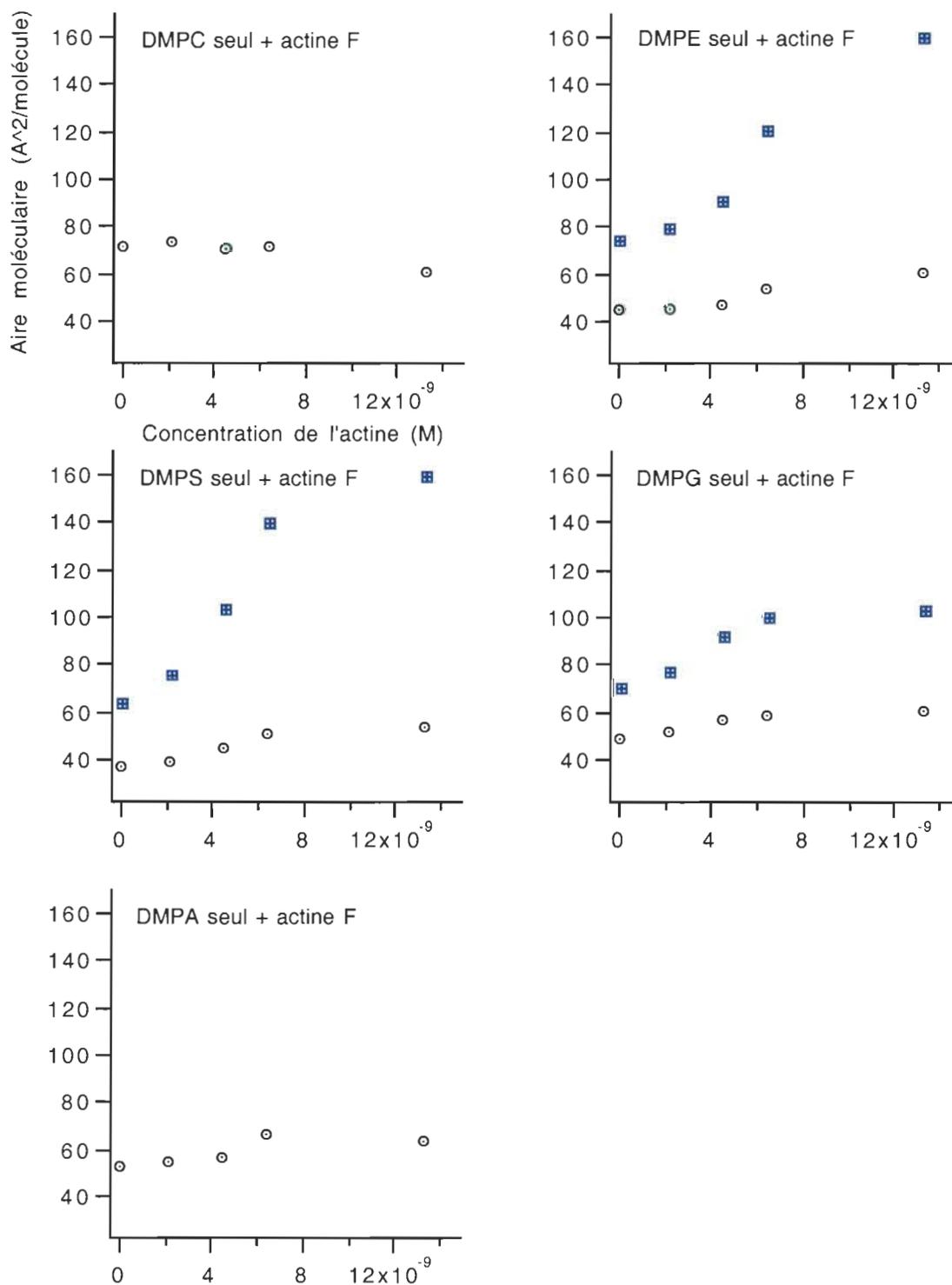


Figure 38. Aire moléculaire des maxima de Ks, correspondant au collapse ○ et à la transition L₁/L₂ ■, des films composés que d'un seul lipide en présence de concentrations croissantes d'actine F. A² signifie Å².

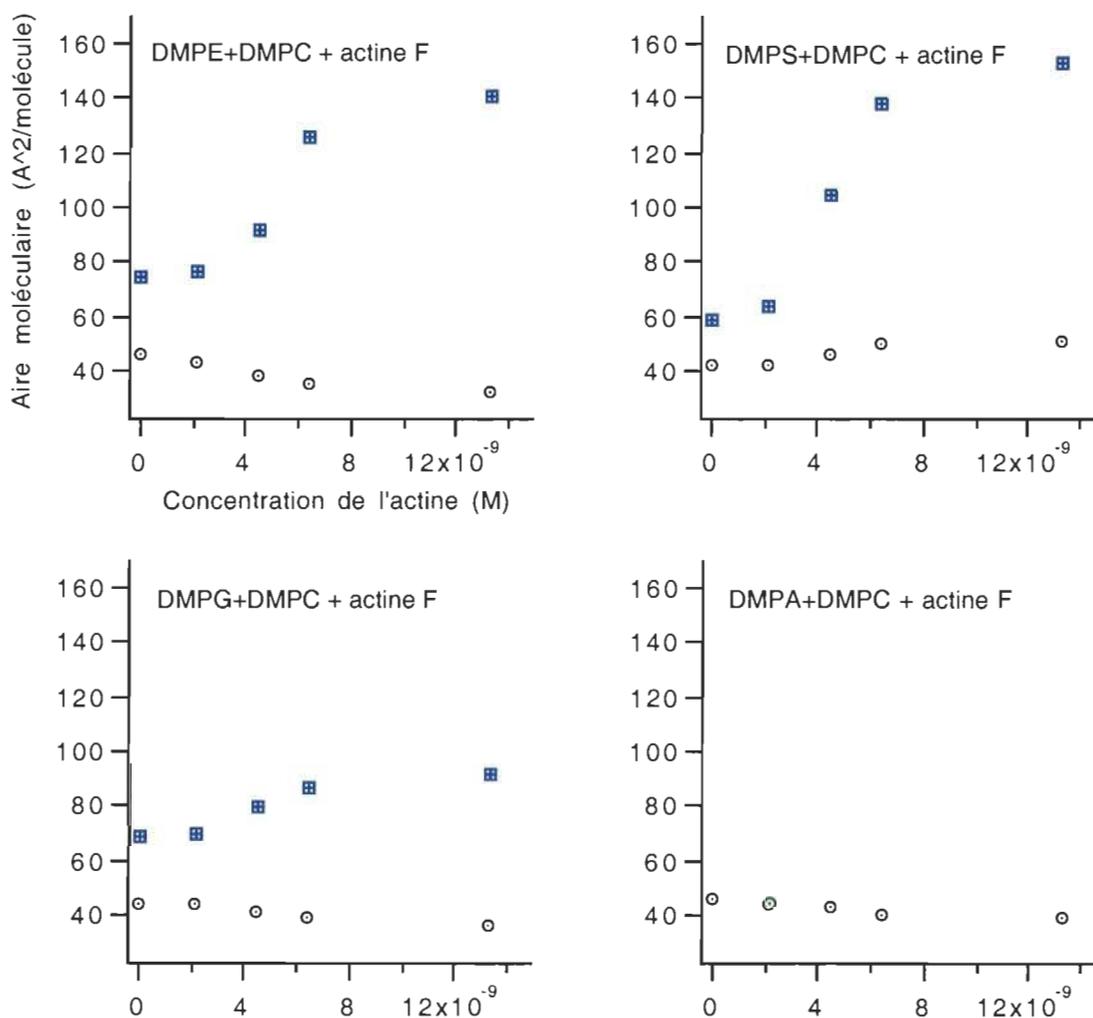


Figure 39. Aire moléculaire des maxima de Ks, correspondant au collapse \ominus et à la transition L_1/L_2 \boxplus , des films de lipides mélangés au DMPC en présence de concentrations croissantes d'actine F. A² signifie Å².

L'ajout d'actine F en sous-phase ne change que très peu sa valeur qui est de 46 mN/m en présence de 13,3 nM d'actine en sous-phase.

Tout comme sur tampon G, l'aire moléculaire à laquelle survient la transition L_1/L_2 augmente lorsque l'on ajoute de l'actine à la sous-phase. Ce changement d'aire est toutefois plus grand avec l'actine F qu'avec l'actine G. En

effet, l'aire moléculaire à laquelle survient la transition passe de 74 \AA^2 sans actine, à 159 \AA^2 en présence de $13,3 \text{ nM}$ d'actine F. Ceci est un résultat prévisible, puisque l'actine F occupe plus d'espace que l'actine G à l'interface. Le film est donc plus compact, à une aire moléculaire donnée, avec l'actine F qu'avec l'actine G.

L'actine F, donne les mêmes résultats avec le DMPS et le DMPG seuls ainsi qu'avec les mélanges de ces lipides avec le DMPC. La synthèse de ces résultats est présentée aux **figures 38** et **39**. Par contre, les courbes du K_s en fonction de l'aire moléculaires sont présentées aux annexes C et D pour ne pas surcharger les résultats.

En conclusion, nous avons observé que la présence d'actine en sous-phase change les propriétés élastiques des films. L'actine F induit un changement plus prononcé que ne le fait l'actine G. L'actine F provoque une augmentation de l'aire moléculaire où se situe le pic de K_s correspondant au collapse, ce qui n'a pas été observé avec l'actine G, ce qui suggère une plus forte interaction de l'actine F avec les lipides. D'autre part, bien que la nature de la tête polaire change les valeurs de K_s et d'aire moléculaire à laquelle se produisent les transitions de phase, nous n'avons pas pu établir de lien entre la nature de la tête polaire du lipide et l'effet de l'actine sur le K_s du film.

3.5. CONTRIBUTION DE L'ACTINE À LA SURFACE À UNE PRESSION DE SURFACE DE 10 mN/M

Afin de quantifier plus précisément les interactions de l'actine avec les lipides, nous allons étudier plus en détails l'aire occupée par l'actine dans un film

de lipides, selon la nature de la tête polaire des lipides. La comparaison de l'isotherme d'un lipide seul et d'un isotherme du même lipide sur une sous-phase qui contient de l'actine permet d'évaluer la contribution de l'actine à l'interface (**figure 40**). Afin de calculer la contribution de l'actine à la surface, nous avons, à une pression de surface de 10 mN/m, soustrait l'aire moléculaire du lipide en absence d'actine de « l'aire moléculaire apparente » du lipide en présence d'actine. Il y a lieu de rappeler ici que l'aire moléculaire, en présence comme en absence d'actine, est obtenue en divisant l'aire du bain par le nombre de molécules de lipides seulement.

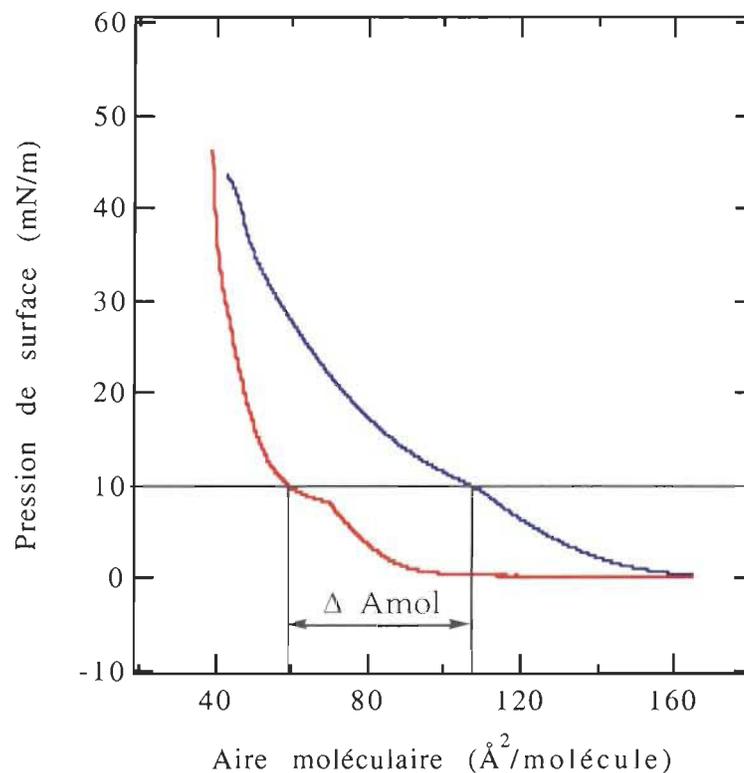


Figure 40. Schéma montrant comment est calculée l'aire occupée par l'actine seule à une pression de 10mN/m. On soustrait l'aire moléculaire de l'isotherme du lipide seul (gauche) de l'aire moléculaire du mélange actine-lipide (droite), puis on multiplie cette valeur par le nombre de molécules de lipides. Exemple donné pour un film de DMPE et une concentration de 13,3 nM d'actine G.

L'aire est exprimée en fonction des molécules de lipides. La différence d'aire moléculaire calculée (ΔA_{mol} sur la figure 40), multipliée par le nombre de molécules de lipides représente donc la surface du bain qui est occupée par les molécules d'actine, ou contribution de l'actine à la surface.

La **figure 41** représente l'aire occupée par l'actine à l'interface en fonction de sa concentration en sous-phase, pour tous les lipides étudiés. Nous observons tout d'abord que l'aire occupée par l'actine augmente en fonction de sa concentration (**figures 41a et 41b**). L'actine remonte donc à l'interface et occupe de plus en plus d'espace au fur et à mesure que sa concentration en sous-phase augmente. De plus, à une concentration en actine supérieure à 6,4 nM, nous observons un plateau, ce qui signifie qu'il y a saturation de la surface disponible pour l'actine. Les molécules supplémentaires d'actine demeurent en sous-phase.

On peut remarquer sur cette figure que, en général, l'actine F aussi bien que l'actine G ont une plus grande contribution aux films composés d'un seul lipide plutôt qu'aux films composés du mélange d'un lipide avec le DMPC. Le DMPC ajouté à un autre lipide semble donc inhiber l'attraction de cet autre lipide sur l'actine. Pourtant, l'actine a un effet très marqué sur un film composé uniquement de DMPC. En conséquence, il est probable que les molécules de lipides s'organisent entre elles dans un film composé d'un mélange d'un lipide avec du DMPC de telle façon qu'une interaction avec l'actine s'en trouve moins favorisée.

3.5.1. Effet de la nature de la tête polaire du lipide sur l'aire occupée par l'actine G

La **figure 41a** montre que la nature de la tête polaire modifie la contribution de l'actine G à la surface. Pour les films de lipides purs, on peut classer la contribution de l'actine G à la surface dans l'ordre suivant : DMPE > DMPC = DMPS > DMPA > DMPG. On constate que, pour les films composés d'un seul lipide non mélangé au DMPC, les lipides neutres permettent davantage l'accès de l'actine G à la surface que les lipides chargés négativement. Cet effet est prévisible puisque l'actine, étant elle-même chargée négativement, sera repoussée par ces lipides. Par contre, pour les films composés d'un lipide mélangé au DMPC, la contribution de l'actine G à la surface est : DMPA+DMPC > DMPE+DMPC > DMPS+DMPC > DMPG+DMPC. Les films composés d'un lipide mélangé au DMPC ne montrent pas de relation évidente entre la charge du lipide et la contribution de l'actine G à la surface.

3.5.2. Effet de la nature de la tête polaire du lipide sur l'aire occupée par l'actine F

La **figure 41b** montre que l'actine F s'incorpore aussi dans un film de lipides, et de façon plus marquée que l'actine G, ce qui est un résultat attendu, puisque l'actine F seule remonte davantage à l'interface (voir section 3.2.2). De plus, le plateau, qui apparaît à partir d'une concentration en actine de 6,4 nM, est plus prononcé que dans le cas de l'actine G. La saturation de l'interface est donc plus rapidement atteinte et l'ajout supplémentaire d'actine n'augmente plus le nombre de molécules qui s'incorporent au film. Les molécules en excès restent en sous-phase.

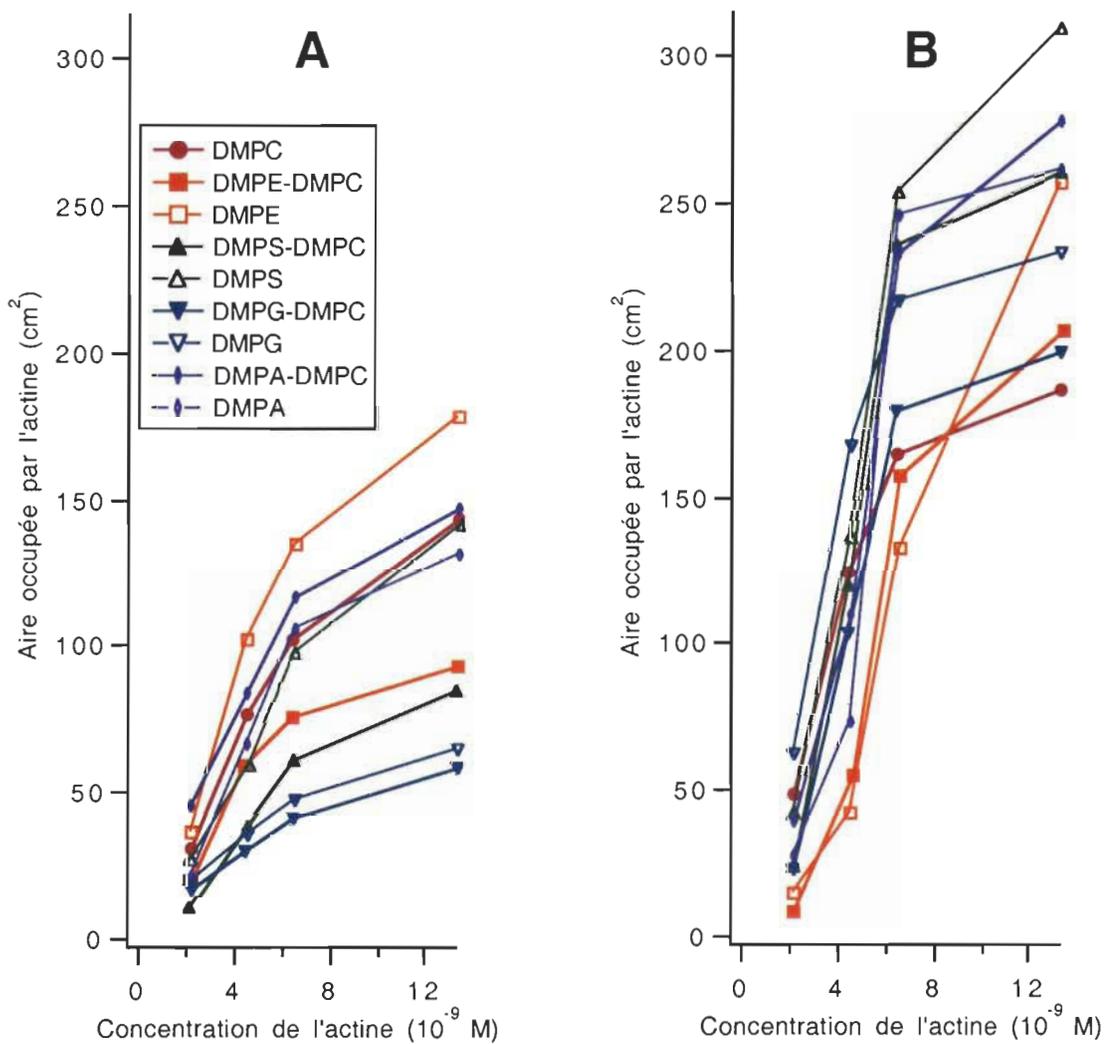


Figure 41. Graphiques montrant la contribution de l'actine G (A) et de l'actine F (B) à la surface du bain à une pression superficielle de 10 mN/m en fonction de la concentration d'actine, pour différents lipides ou mélanges de lipides.

L'effet attracteur de la tête polaire d'un lipide non mélangé au DMPC sur l'actine F, peut être classé de la façon suivante : DMPS > DMPA > DMPG > DMPC > DMPE. Pour les mélanges de lipides, l'effet attracteur peut être classé ainsi : DMPA+DMPC = DMPS+DMPC > DMPG+DMPC > DMPE+DMPC. On peut constater que, tout comme avec l'actine G, les lipides purs sont plus efficaces que les lipides mélangés au DMPC et il ne semble pas que le nombre de charges négatives de la tête polaire des lipides négatifs ait une influence sur l'attraction exercée sur l'actine F. Par ailleurs, nous remarquons que les films de charge globale négative attirent plus d'actine F que les films neutres. Ceci est un résultat surprenant puisque nous obtenions l'inverse avec l'actine G. Cette affinité de l'actine F pour les lipides anioniques est probablement due à la présence de magnésium qui s'insère au niveau des têtes polaires et neutralise les charges négatives. Nous parlerons dans la discussion du rôle important joué par le magnésium dans l'interaction électrostatique entre les lipides et l'actine F.

3.5.3. Conclusions sur la contribution de l'actine à l'aire du bain

Nous pouvons conclure que la tête polaire des lipides a un effet sur l'attraction de l'actine à l'interface. En effet, les films de lipides purs attirent plus d'actine que les films composés de lipides mélangés au DMPC. Le DMPC atténue donc l'effet des lipides chargés négativement. De plus, il faut souligner le fait que l'actine polymérisée s'incorpore davantage entre les molécules de lipides que l'actine G. Ceci est la conséquence d'une part de la plus haute affinité de l'actine F

pour l'interface, et d'autre part de la présence de magnésium qui neutralise les charges négatives des têtes polaires des lipides.

3.6. EFFET DE L'ACTINE SUR LE TRAVAIL DE COMPRESSION D'UN FILM SELON LA TETE POLAIRE DES LIPIDES

3.6.1. Travail requis pour comprimer les films d'actine seule

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, plus les interactions entre les molécules formant un film sont nombreuses et fortes, plus ce film est rigide et, par conséquent, plus le travail requis pour le comprimer sera grand.

La **figure 42** montre que le travail nécessaire pour comprimer un film d'actine G ou d'actine F seule (trait noir) augmente avec la concentration d'actine et atteint un plateau pour des concentrations d'actine supérieures à 6,4 nM. Ceci vient confirmer que, plus il y a d'actine en sous-phase, plus il y a de molécules qui remontent à l'interface mais, au-delà de 6,4 nM, l'interface est saturée de molécules d'actine et les molécules en excès restent en sous-phase. De plus, nous observons que le travail requis pour comprimer un film d'actine F est supérieur au travail de compression d'un film d'actine G. Cela est probablement dû aux interactions qui existent entre les monomères qui forment un filament d'actine, interactions qui n'existent pas dans le cas de l'actine G.

3.6.2. Travail requis pour comprimer les films formés de lipides seuls

Sur la **figure 42**, on remarque que, en absence d'actine, il faut plus de travail pour comprimer les films de lipides mélangés au DMPC (symboles pleins sur la

figure) que pour comprimer les films composés d'un seul lipide (symboles vides sur la figure). Ceci suggère qu'il se forme des interactions entre les molécules de DMPC et les autres lipides, ce qui rigidifie le film. Le travail nécessaire pour comprimer ces films est donc plus grand.

D'autre part, l'addition de 3 mM de $MgCl_2$ à la sous-phase provoque, pour la plupart des lipides, une augmentation du travail de compression, sauf pour le DMPC et le DMPA seuls (**tableau 6**).

3.6.3. Travail requis pour comprimer les films mixtes de lipides et d'actine

Nous observons des effets différents sur le travail de compression nécessaire pour comprimer les films de lipides, selon que l'on soit en présence d'actine G ou de l'actine F en sous-phase (**figure 42**). En présence d'actine G, le travail requis pour comprimer un film mixte d'actine et de lipides est, en général, égal à la somme du travail pour comprimer le lipide seul et le film d'actine seule. Ceci est un argument en faveur d'une absence d'interaction entre l'actine G et les molécules de lipides. Les monomères et les molécules de lipides se comportent indépendamment les uns des autres à l'interface. Pour ce qui est de l'actine F, le travail de compression d'un film mixte d'actine et de lipides est inférieur à la somme du travail de l'actine seule et du lipide seul, et ceci pour les lipides purs, c'est-à-dire non mélangés au DMPC. L'actine exerce donc sur ces films de lipides un effet « fluidifiant », ce qui suggère une interaction de l'actine avec les lipides.

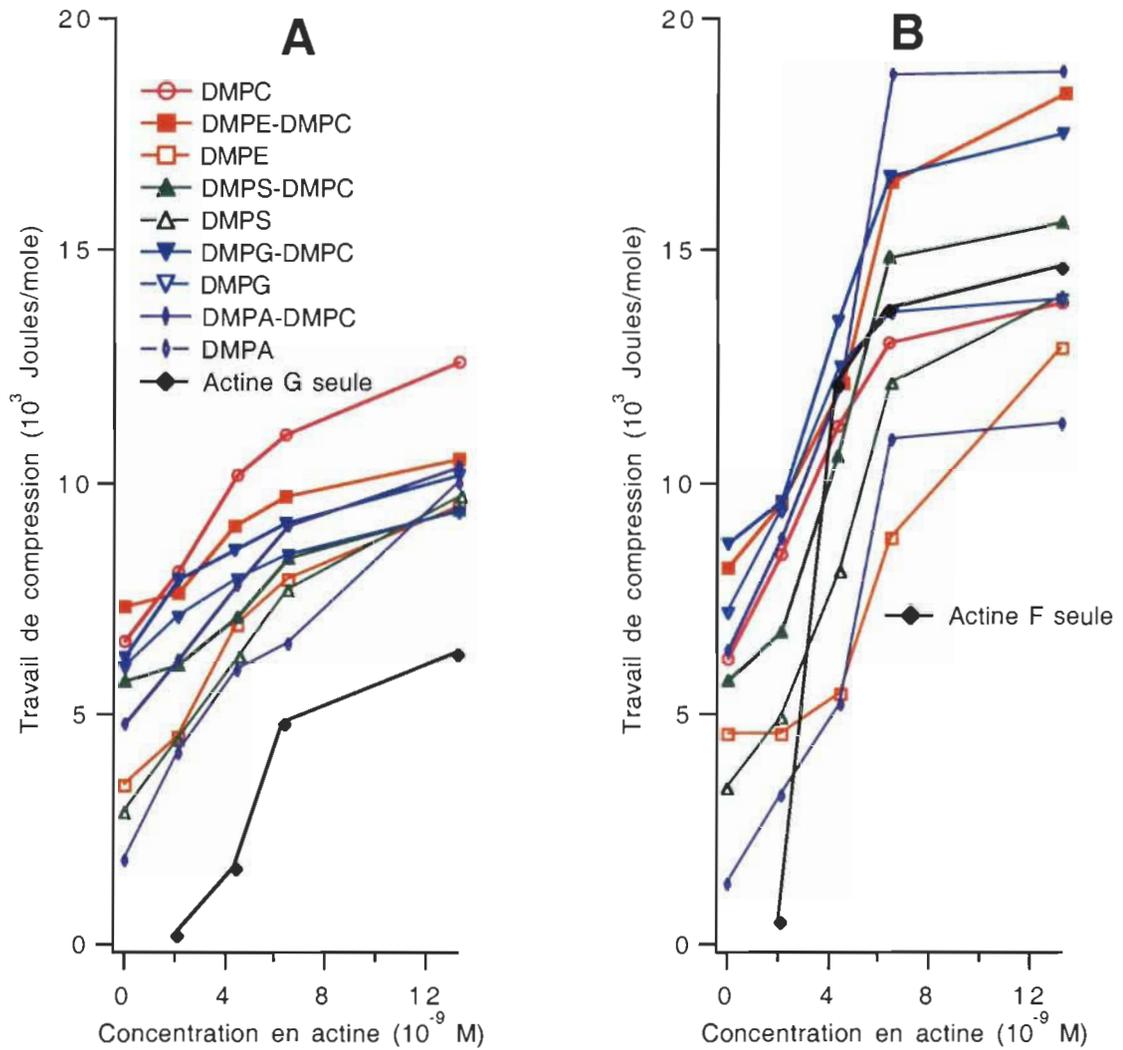


Figure 42. Graphiques du travail de compression d'un film de lipides en présence d'actine G (A) et d'actine F (B), en fonction de la concentration d'actine pour différents lipides ou mélanges de lipides.

Tableau 6. Travail requis pour comprimer les films de lipides sans actine, avec et sans magnésium en sous-phase.

Lipides	Travail (Joules/mole)	
	Lipides sans magnésium	Lipides + 3 mM magnésium
DMPC	6533	6128
DMPE	3443	4494
DMPG	2840	3379
DMPG	5982	7153
DMPA	1777	1247
DMPE + DMPC (1:1)	7315	8102
DMPG + DMPC (1:1)	5656	5657
DMPG + DMPC (1:1)	6178	8660
DMPA + DMPC (1:1)	4727	6318

Par contre, pour les films composés d'un lipide mélangé au DMPC, le travail pour comprimer un film mixte de lipides et d'actine est égal à la somme du travail pour comprimer l'actine seule et les lipides seuls. Il semble donc que l'actine F ait moins d'affinité pour les films lorsqu'ils contiennent du DMPC.

3.6.4. Conclusions sur l'effet de l'actine sur le travail de compression

L'actine G a un effet différent de l'actine F sur la rigidité des films. Les molécules d'actine G semblent se comporter, durant la compression, indépendamment des molécules de lipides, ce qui indique une absence d'interaction entre l'actine G et les lipides. Par contre, l'actine F interagit avec les molécules de lipides à l'interface et provoquent la fluidification du film. Ceci indique que, contrairement à l'actine G, l'actine F interagit avec les molécules de

lipides à l'interface. Toutefois, cette affinité de l'actine F est moins prononcée lorsque les films sont composés du mélange d'un lipide avec du DMPC.

Chapitre IV: Discussion

4.1. REPRODUCTIBILITÉ DES EXPÉRIENCES

Pour chaque lipide ou mélange de lipides étudié, nous avons répété les expériences de deux à trois fois et ce, autant avec l'actine F qu'avec l'actine G. La comparaison des isothermes obtenus montre que nos expériences sont reproductibles. Les valeurs d'aires moléculaires des lipides sont en deçà des normes d'erreur de 5% établies par Adamson [2]. De plus, nos isothermes sont très semblables à ceux obtenus lors d'expériences analogues faites par d'autres expérimentateurs à Lyon.

Les isothermes que nous présentons sont ceux d'une seule expérience mais qui a été répétée plusieurs fois pour s'assurer de la reproductibilité des résultats.

4.2. INTERACTION DE L'ACTINE AVEC LES LIPIDES

Les travaux antérieurs qui concernent l'interaction actine-lipides ont été faits avec des liposomes et non avec des monocouches. De ces travaux, il a été établi que l'actine G n'interagit pas avec les lipides membranaires de charge neutre ou négative [10, 55, 75]. Par contre, si l'on ajoute des cations divalents, magnésium ou calcium, l'actine polymérise et se fixe à la surface des liposomes. Il existe donc une interaction entre l'actine F et les lipides membranaires neutres ou chargés négativement. Il a été montré que les liens entre l'actine F et les lipides sont de nature électrostatique [21, 31, 55, 71, 75]. L'interaction actine-lipides a été étudiée par FTIR, qui permet de mettre en évidence des modifications de la bande amide I de l'actine, par ultracentrifugation, qui permet d'isoler des complexes actine-

lipides, et par DSC qui mesure l'énergie impliquée lors de cette interaction. De plus, la microscopie électronique a permis d'observer directement la formation de cristaux bidimensionnels d'actine à la surface des liposomes.

Nous avons complété ces études en utilisant la technique des monocouches, qui permet de suivre le comportement de molécules de lipides situées à l'interface air-eau et de mettre en évidence d'éventuelles interactions entre ces molécules de lipides et d'actine. Cette technique a l'avantage de n'utiliser que de très faibles quantités de lipides et de protéines. Cependant, cette technique présente certaines limites et la démonstration d'une interaction entre les molécules n'est pas toujours évidente. Ainsi, nous avons montré que l'actine injectée en sous-phase déplace les isothermes vers la droite. Cela ne signifie pas qu'il existe une interaction entre l'actine et les lipides. En effet, les molécules d'actine remontent à l'interface et s'insèrent entre les molécules de lipides sans qu'il y ait nécessairement interaction entre les deux. Il est essentiel de faire un examen plus approfondi des résultats pour montrer l'existence d'une interaction.

Ainsi, en ce qui concerne nos travaux avec l'actine F, deux résultats permettent de confirmer l'existence d'une affinité entre l'actine F et les lipides. Tout d'abord, à haute pression de surface, les isothermes des lipides sont déplacés vers la gauche en présence d'actine, c'est-à-dire que les lipides ont une aire moléculaire apparente plus petite. Nous suggérons que, lors de la compression, les molécules d'actine sont expulsées en sous-phase et entraînent avec elles des molécules de lipides. Il doit donc exister une forte affinité entre les molécules

d'actine F et les lipides. Un autre résultat qui vient confirmer l'interaction actine F-lipides est que le travail nécessaire pour comprimer un film de lipides en présence d'actine F est inférieur au travail pour comprimer un film de lipides seul et un film d'actine F seul. Les autres résultats que nous avons obtenus, c'est-à-dire le déplacement des isothermes vers la droite à basse pression de surface, l'analyse des K_s , ou la contribution de l'actine à 10 mN/m ne prouvent pas l'existence d'une interaction, mais ne sont pas en contradiction avec l'existence d'une telle interaction. Nos résultats sont donc en accord avec ceux qui ont été publiés par d'autres auteurs, qui ont établi par d'autres techniques qu'il existe une interaction entre l'actine F et les lipides [10, 55, 75].

En ce qui concerne nos travaux avec l'actine G, nos résultats sont en général compatibles avec le fait qu'il n'y a pas d'interaction entre l'actine G et les lipides. En particulier, le fait que le travail nécessaire pour comprimer un film d'actine G et des lipides soit égal à la somme du travail pour comprimer un film d'actine G seul et un film de lipides seuls. Les deux molécules se comportent donc indépendamment à l'interface, avec apparemment aucune interaction entre les deux. Par contre, un résultat est en contradiction avec cette conclusion et suggère l'existence d'une interaction entre l'actine G et certains lipides. Au cours de la compression, et pour de hautes pressions de surface, les isothermes du DMPC, du DMPG et du DMPA seuls, ainsi que ceux des mélanges de DMPS+DMPC et de DMPG+DMPC sont déplacés vers la gauche en présence d'actine G. Deux hypothèses peuvent expliquer cette contradiction :

- ① Il existe une interaction entre l'actine G et ces lipides qui n'avait pas été mise en évidence par les autres techniques.
- ② Il est connu que certaines protéines changent de conformation, ou se dénaturent à l'interface air-eau [90]. Elles exposent alors leurs groupements hydrophobes. Ces groupements hydrophobes ont plus d'affinité pour les lipides. Par conséquent, lorsque ces protéines plongent en sous-phase, elles peuvent entraîner avec elles des molécules de lipides. Cette hypothèse nous paraît plus probable car elle ne contredit pas les travaux antérieurs. Nous n'avons cependant aucune preuve pour démontrer cette hypothèse et des travaux complémentaires utilisant d'autres techniques sont nécessaires.

4.3. EFFET DE LA TÊTE POLAIRE SUR L'INTERACTION DES LIPIDES AVEC L'ACTINE

Un des objectifs de notre travail est de déterminer si la nature de la tête polaire a une influence sur l'interaction actine-lipides. En effet, Rioux et Gicquaud [75], Laliberté et Gicquaud [55], St-Onge et Gicquaud [85, 86] ainsi que J.F. Comtois [21] ont montré que cette interaction est de nature électrostatique. En conséquence, la densité de charges sur la tête polaire devrait modifier l'affinité de l'actine pour les lipides. Comme l'actine est chargée négativement, nous nous attendions à ce que les lipides qui ont deux charges négatives, tels que le DMPS et le DMGP, aient moins d'affinité que les lipides à une charge négative tel le DMPA, et moins d'affinité que les lipides neutres tels le DMPC et le DMPE. Nos résultats montrent que la nature de la tête polaire modifie bien l'interaction actine-lipides. Cependant, il n'existe pas de relation entre la charge « théorique » du lipide et son affinité pour l'actine. Ainsi, le DMPS qui a deux charges négatives, et le DMPA et le DMGP qui

ont une charge négative n'attirent pas moins l'actine que le DMPE et le DMPC qui ont une charge globale nulle. Cependant, il faut faire la distinction entre la charge « théorique » d'un lipide et sa charge réelle dans un milieu particulier. En effet, Herbette *et al.* [42] ont montré, par diffraction des neutrons, que les cations divalents, et en particulier le calcium, se fixent au niveau des têtes polaires du DPPC et neutralisent la charge négative portée par le phosphate. Cette étude n'a pas été faite avec d'autres lipides, tels le DMPC, le DMPE, le DMPS, le DMPCG et le DMPA, mais il est probable que le même phénomène se produise avec ces lipides. Les charges négatives des lipides sont donc en partie neutralisées par les cations divalents. Comme on ignore la constante d'affinité des lipides pour ces cations, on ne peut connaître la charge réelle d'un lipide dans les conditions ioniques utilisées au cours de nos expériences et, par conséquent, on ne peut prédire l'affinité de l'actine avec ces lipides dans ces conditions expérimentales.

Un autre effet sur l'attraction de l'actine F par les lipides que nous avons mis en évidence est celui des cations divalents. Nos travaux ont montré que les isothermes des films de lipides sans actine, sur du tampon F, qui contient du magnésium, étaient légèrement déplacés vers la droite par rapport aux isothermes des films de lipides sans actine, sur du tampon G. De plus, les films de lipides sur du tampon F ont une élasticité légèrement inférieure et une rigidité plus grande que les films des mêmes lipides sur du tampon G. Selon Herbette *et al.* [42], les cations divalents joueraient le rôle de contre-ions des charges des têtes polaires de tous les lipides, mais spécialement avec les lipides anioniques, soient le DMPS, le DMPCG et le DMPA. Ainsi, dans les expériences faites en présence de magnésium, les charges négatives des têtes polaires des phospholipides seraient neutralisées par les ions magnésium. La membrane devient alors chargée positivement. C'est

cette neutralisation des charges négatives des lipides par le magnésium qui explique en partie l'attraction de l'actine F pour les lipides chargés négativement. Les résultats obtenus par Herbette *et al.* permettent d'expliquer l'interaction, en présence de cations divalents, de l'actine qui est chargée négativement avec les lipides qui sont chargés négativement. Cependant, le travail de Herbette *et al.* a un point faible. L'auteur n'a regardé que le Ca^{2+} , qui neutralise les charges négatives du phosphate, mais il n'a jamais mentionné l'ion Cl^- , qui accompagne le Ca^{2+} lorsque l'on dissout le CaCl_2 . Ce contre-ion ne vient-il, pas neutraliser aussi les charges positives qui se trouvent au niveau de la tête polaire de certains lipides tels le DMPE, le DMPS et le DMPC ?

4.4. COMPARAISON DE NOS RÉSULTATS AVEC CEUX DE J.F. COMTOIS

J.F. Comtois a étudié l'interaction actine-lipides en utilisant comme techniques la DSC et la microscopie électronique. Il a orienté sa recherche sur l'effet de la tête polaire des lipides sur l'attraction de l'actine. Comme il avait été montré auparavant que l'actine G n'interagit pas avec des liposomes neutres ou négatifs, Comtois a fait ses expériences seulement avec de l'actine F. Nous ne pouvons donc comparer nos résultats à ceux de J.F. Comtois que pour l'actine F.

4.4.1. Rappel des résultats de J.F. Comtois

Avec des liposomes neutres, composés de DMPC seul, ainsi que d'un mélange équimolaire de DMPE+DMPC, cet auteur a montré que l'actine F se fixe à la surface des liposomes par des liens électrostatiques, et forme des paracristaux bidimensionnels. Avec des liposomes anioniques, les résultats obtenus sont différents selon que les liposomes contiennent du DMPA, du DMPS ou du DMPC.

Voyons tout d'abord ce qui se passe avec les liposomes qui contiennent DMPS ou du DMPG.

Les liposomes qui contiennent du DMPS ou du DMPG induisent une dépolymérisation de l'actine qui a été mise en évidence par microscopie électronique, résultat qui a été confirmé par DSC. Selon cet auteur, les lipides anioniques captent les ions magnésium et il n'en reste plus sous forme libre dans le milieu pour maintenir l'actine à l'état polymérisé. L'effet du DMPS et du DMPG sur l'actine F serait donc un effet indirect dû à la captation du magnésium plutôt qu'une fixation des lipides sur la molécule d'actine. De plus, l'auteur note aussi un possible effet détergent de ces lipides, qui empêcherait la précipitation de l'actine au cours de la dénaturation thermique dans le DSC.

Le DMPA étant un lipide anionique, il devrait donner les mêmes résultats que le DMPS et le DMPG. Or, les résultats de J.F. Comtois montrent que les liposomes qui contiennent du DMPA donnent des résultats semblables à ceux obtenus avec les liposomes neutres DMPC ou DMPE. Les thermogrammes des liposomes formés par un mélange de DMPA+DMPC montrent que ces liposomes sont constitués plutôt par des domaines de DMPA qui coexistent avec des domaines de DMPC. L'auteur suggère que l'actine interagit alors avec les domaines de DMPC et que le DMPA n'a que peu d'effet.

4.4.2. Comparaison de nos résultats avec J.F. Comtois

Bien que nous ayons travaillé avec les mêmes mélanges de lipides que J.F.

Comtois, il nous est difficile de comparer nos résultats avec les siens pour deux raisons :

1) Les lipides dans un liposome sont dans un état différent des mêmes lipides dans une monocouche.

Nous avons déjà mentionné que la technique des monocouches a l'avantage sur les liposomes de n'utiliser qu'un faible nombre de molécules de lipides. Dans les liposomes, les molécules de lipides forment une bicouche où les molécules sont très près les unes des autres. À l'interface d'un bain de monocouches, les molécules de lipides sont très espacées les unes des autres. Comme l'actine remonte à l'interface air-eau en absence de lipides, il est logique que l'actine remonte aussi à l'interface en présence de lipides en phase gazeuse. L'actine occupe alors les espaces entre les molécules de lipides. Dans cette position, l'actine se trouve non seulement au contact des têtes polaires, mais aussi des chaînes acyles, alors que l'actine se trouve surtout au contact des têtes polaires des lipides d'un liposome. Dans le cas de monocouches, de possibles interactions hydrophobes entre les chaînes acyles et la protéine vont être facilitées.

Le fait que l'actine remonte à l'interface en présence de lipides en phase gazeuse ne signifie pas qu'il existe une interaction entre l'actine et ces lipides. Les molécules d'actine occupent simplement les espaces entre les molécules de lipides. Cependant, nos résultats ont établi que la nature de la tête polaire modifie la contribution de l'actine F à l'interface. En particulier, les lipides chargés négativement augmentent la contribution de l'actine à l'interface davantage que les lipides neutres. Cet effet n'est pas dû aux chaînes acyles, car ce sont les mêmes

chaînes myristoyl pour tous les lipides. Il semble que l'actine rend plus compact à l'interface les molécules de lipides chargées négativement. Il existe donc bien une interaction avec ces lipides, interaction influencée par la tête polaire.

2) Le magnésium utilisé dans les expériences de J.F. Comtois était présent en quantité insuffisante.

Pour interpréter ses résultats, Comtois a suggéré qu'il n'y avait pas suffisamment de magnésium dans le milieu pour maintenir l'actine polymérisée. Herbette [42] a montré que les phospholipides captent les cations divalents en solution. Dans les expériences de J.F. Comtois, le rapport lipides/cations était de 7 molécules de lipides (14 mM) pour 1 ion magnésium (2 mM). En posant l'hypothèse qu'une molécule de lipide sur 10 capte un ion magnésium, il ne reste que 0,6 mM de magnésium libre et, par conséquent, l'actine F dépolymérise. Dans nos expériences en monocouche, nous avons étalé $3,6 \times 10^{16}$ molécules de lipides à l'interface pour $2,1 \times 10^{21}$ ions magnésium en sous-phase (3 mM), soit un rapport d'environ 1/57 000. Même si, dans une monocouche, chaque molécule de lipide capte un ion magnésium, il reste tout de même une concentration de magnésium en sous-phase de 2,9999 mM. Il en reste donc suffisamment pour maintenir l'actine F sous forme polymérisée. Guillaume Grenier, qui a fait des expériences de cristallisation de l'actine sur support Langmuir-Blodgett [40], a observé des paracristaux d'actine en microscopie électronique, aux mêmes concentrations d'actine et de magnésium que nous avons utilisées. Ceci est un argument qui nous permet de dire que le magnésium libre dans le milieu est présent en quantité suffisante pour maintenir l'actine polymérisée en filaments.

Nous avons établi une corrélation entre la tête polaire et la contribution de l'actine à l'interface, et classé l'effet de la tête polaire sur l'attraction de l'actine F. Cependant, nous ne pouvons comparer nos résultats à ceux de J.F. Comtois car les conditions expérimentales sont trop différentes.

4.4.3. Résultats obtenus avec les films composés d'un seul lipide

Un avantage de la technique des monocouches est qu'il est possible d'utiliser des lipides purs. Par contre, certains lipides, tels le DMPS, le DMPG et le DMPA, ne forment pas de liposomes dans les conditions ioniques qui sont compatibles avec celles que nous avons utilisées pour étudier l'actine [21]. J.F. Comtois a donc dû utiliser des lipides mélangés au DMPC pour former des liposomes. L'interprétation de ses résultats est parfois difficile car on ne peut différencier ce qui est dû au lipide étudié de ce qui est dû au DMPC.

Nos résultats montrent que les lipides n'ont pas le même effet sur l'actine s'ils sont purs ou mélangés au DMPC. Ainsi, nous avons établi que la contribution de l'actine F à la surface est plus grande en présence d'un lipide seul qu'en présence du même lipide mélangé au DMPC. Le DMPC réduit donc l'interaction de l'actine pour le lipide. Pourtant, le DMPC seul ne repousse pas l'actine de l'interface. Le même phénomène peut être observé avec l'actine G. Cette conclusion est confirmée par l'analyse du travail de compression de films de lipides en présence d'actine (page 81). L'actine F exerce sur les films de lipides un effet fluidifiant qui est moins important lorsque les films sont composés par un lipide mélangé au DMPC, donc que l'actine F a moins d'affinité pour les lipides en présence de DMPC.

4.4.4. Conclusions sur la comparaison de nos travaux avec ceux de J.F. Comtois

L'objectif de notre travail était le même que celui de Jean-François Comtois, c'est-à-dire d'étudier quel est l'effet de la tête polaire des lipides sur leur interaction avec l'actine, mais en utilisant une autre technique, celle des monocouches. Nous avons bien établi que la tête polaire des lipides influence l'interaction avec l'actine. Cependant, il n'est pas possible de comparer nos résultats avec ceux de Comtois, car les méthodes et les conditions expérimentales ne sont pas comparables. En effet, la captation d'une grande partie du magnésium par les lipides dans les expériences de J.F. Comtois a entraîné une dépolymérisation de l'actine et les résultats qu'il a mesurés n'ont finalement rien à voir avec l'affinité des lipides pour l'actine. La comparaison de nos résultats est donc au départ impossible. Idéalement, il faudrait refaire les expériences de Comtois avec une concentration fixe de magnésium libre dans le milieu, pour tous les lipides étudiés.

4.5. PROPOSITION D'UN MODÈLE *IN VIVO* D'INTERACTION DIRECTE DE L'ACTINE AVEC LES LIPIDES MEMBRANAIRES

Comme nous l'avons mentionné en introduction, l'actine est un composant du cytosquelette, et elle joue aussi un rôle important dans la motilité des cellules. D'autre part, l'actine se retrouve dans le cytoplasme sous forme globulaire, séquestrée par des ABP, ainsi que sous forme filamenteuse. Les filaments d'actine s'organisent en différents arrangements selon leur fonction. Par exemple, les filaments situés immédiatement sous la membrane forment un réseau bidimensionnel, alors que les filaments qui servent de fibres de traction de part en

part de la cellule sont organisés en faisceaux.

Nous avons vu que les filaments d'actine doivent être liés à la membrane. Il est admis dans la littérature que l'ancrage des filaments dans la membrane se fait par l'intermédiaire d'ABP membranaires. Toutefois, les recherches menées dans notre laboratoire avec des membranes artificielles composées uniquement de lipides ont montré que l'actine peut se lier directement aux lipides membranaires par un mécanisme électrostatique. Les résultats de mes propres travaux sont en accord avec cette conclusion. Toutefois, cette interaction actine-membrane repose sur des expériences qui ont été faites *in vitro* et peut difficilement être mise en évidence directement *in vivo*. Cependant, cette interaction se fait *in vitro* dans des conditions ioniques comparables à celles qui existent *in vivo*. En effet, dans une cellule de mammifère, la concentration du magnésium est de l'ordre de 1 à 8 mM et celle des ions monovalents (potassium, sodium) d'environ 150 mM [58]. L'interaction directe actine-lipides apparaît donc comme possible. Le mécanisme d'interaction entre l'actine et une membrane en présence de cations a déjà été proposé par notre laboratoire [10, 36] et est illustré à la **figure 43**.

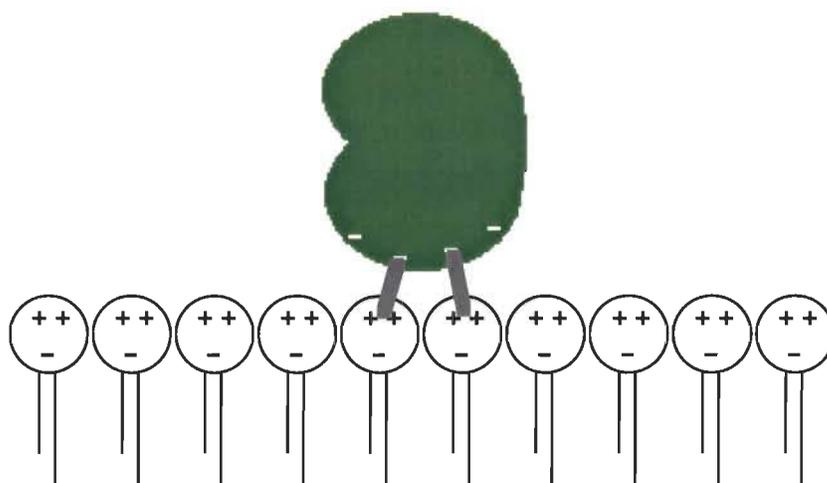


Figure 43. Mécanisme proposé pour l'interaction actine-lipides lorsque des cations divalents sont présents dans le milieu, d'après Gicquaud et Wong [36].

Les cations neutralisent charges négatives de la tête polaire des lipides qui deviennent alors des lipides cationiques. L'actine, qui a des charges négatives en périphérie est attirée par ces charges positives et interagit avec la membrane de la cellule. Ce modèle d'interaction actine-membrane que nous proposons ne remet pas en question le mécanisme qui implique des ABP membranaires. Une interaction électrostatique entre l'actine et les lipides pourrait constituer un deuxième type d'interaction dont le rôle reste à définir.

4.6. CRITIQUE DE LA TECHNIQUE DES MONOCOUCHE ET SUGGESTIONS DE TRAVAUX COMPLÉMENTAIRES

Nos résultats montrent qu'il existe un effet de la tête polaire sur l'interaction des lipides avec l'actine. En principe, nous nous attendions à ce que l'actine, qui est chargée négativement, soit moins attirée par les lipides qui ont deux charges négatives, que ceux qui ont une charge négative, et que ceux qui ont une charge globale nulle. Or, nous n'avons pas pu établir une telle relation entre le nombre de charges sur la tête polaire et l'affinité pour l'actine. L'hypothèse que nous présentons est que certaines charges de la tête polaire des lipides sont neutralisées par les cations, en particulier les cations divalents. La charge d'un lipide dépend donc du nombre possible de charges sur la tête polaire, mais aussi de l'affinité de la tête polaire pour les cations. La mesure de la constante d'affinité des lipides pour le magnésium permettrait de vérifier cette hypothèse. Cette mesure peut se faire par l'expérience suivante : des liposomes composés de chacun des lipides sont mis en présence d'une quantité connue de magnésium. Après un temps d'incubation déterminé, on centrifuge la solution de liposomes et on dose le magnésium dans le surnageant.

Un point que nous n'avons pu résoudre, et qui a limité l'interprétation des résultats, est que nous ne savons pas le nombre de molécules d'actine qui remontent à l'interface. Il n'a donc pas été possible de mesurer l'aire occupée par un monomère d'actine à l'interface. Il existe plusieurs façons de mesurer la quantité d'actine à l'interface et que nous n'avions pas à notre disposition à Lyon. L'une d'elles consiste à marquer l'actine avec un isotope radioactif puis de mesurer la radioactivité à l'interface [2, 38, 39]. Cette technique est largement utilisée dans l'étude des protéines en monocouches et permet d'avoir une estimation du nombre de protéines qui sont à l'interface.

Une autre technique d'intérêt consisterait à effectuer des cinétiques de remontée de l'actine à l'interface. La vitesse de remontée de la protéine pour un lipide donné étalé à l'interface, nous donne l'affinité de cette protéine pour le lipide [9]. Si l'on change le lipide à l'interface, on devrait s'attendre à ce que la vitesse de remontée de la protéine change elle aussi. La technique consiste à étaler une quantité connue de lipides à l'interface. L'aire du bain est fixe tout au long de l'expérience. La pression de surface initiale est donc constante elle aussi. On injecte ensuite une quantité connue d'actine dans la sous-phase, puis on mesure la pression de surface en fonction du temps. Lorsque l'on n'enregistre plus d'augmentation de la pression de surface, toutes les molécules sont à l'interface [20, 25]. Cette technique a été utilisée pour différentes protéines: l'albumine de sérum bovin (BSA) [37, 55, 61], la pepsine [61], le lysozyme [61, 80, 95], l'ovalbumine [9, 62], l'alpha et la gamma globulines [19, 80], les cytochromes [41, 53, 67, 77], les lipoprotéines de haute densité (HDL) [14], et plusieurs autres protéines [11, 80].

Chapitre V: Conclusions

Le but de nos travaux était de déterminer si la tête polaire influence l'interaction des lipides avec l'actine. Nos travaux montrent que la nature de la tête polaire a un effet sur l'interaction des lipides avec l'actine. Toutefois nous n'avons pu établir de relation entre la nature de la tête polaire d'un lipide, en particulier le nombre de charges négatives, et son affinité pour l'actine. Nous suggérons que les ions présents dans le milieu neutralisent certaines charges des lipides et de l'actine et, par conséquent, changent les attractions électrostatiques entre la protéine et les lipides. Nous avons cependant établi qu'il y a un effet de l'état de l'actine sur son interaction avec les lipides : l'actine G est davantage attirée par les lipides neutres alors que l'actine F a plus d'affinité pour les lipides négatifs. La présence de cations divalents dans le milieu lors des expériences avec l'actine F expliquerait la différence d'affinité des deux formes d'actine.

D'autre part, nous devons déterminer si la présence de DMPC dans les membranes a un effet sur l'attraction de l'actine. Nos résultats ont montré que l'actine G et l'actine F ont plus d'affinité pour les monocouches qui ne contiennent pas de DMPC. Par conséquent, le DMPC diminue l'affinité des autres lipides pour l'actine. Comme le DMPC seul attire aussi l'actine, nous concluons que le DMPC organise les molécules de lipides en complexes qui ont moins d'affinité pour l'actine.

Références

1. Adams, R. J., et Pollard, T. D. Propulsion of organelles isolated from *Acanthamoeba* along actin filaments by myosin-I. *Nature*, 1986, **322**: 754-756.
2. Adamson, A. W. Physical chemistry of surfaces. 5th edition. New York: John Wiley et Sons Inc., 1990.
3. Ahluwalia, A., Stussi, E., et Domenici, C. Mechanical properties of immunoglobulin G and albumin monolayers. *Langmuir*, 1996, **12**: 416-422.
4. Ballweber, E., Giehl, K., Hannappel, E., Huff, T., Jockusch, B. M., et Mannherz, H. G. Plant profilin induces actin polymerization from actin: β -thymosin complexes and competes directly with β -thymosin and with negative co-operativity with DNase I for binding to actin. *FEBS Letters*, 1998, **425** : 251-256.
5. Barden, J. A., Curmi, P. M. G., et Dos Remedios, C. G. The environment of the high-affinity cation binding site on actin and the separation between cation and ATP sites as revealed by proton NMR and fluorescence spectroscopy. *Journal of Biochemistry*, 1984, **96** : 913-921.
6. Bearer, E. L., DeGiorgis, J. A., Medeiros, N. A., et Reese, T. S. Actin-based motility of isolated axoplasmic organelles. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 1996, **33**: 106-114.
7. Benjamins, J., DE Feijter, J. A., Evans, M. T. A., Graham, D. E., et Phillips, M. C. Dynamic and static properties of proteins adsorbed at the air/water interface. *Faraday Discussions in the Chemical Society*, 1975, **59**: 218-229.
8. Birdi, K. S. Lipid and biopolymer monolayers at liquid interfaces. New York: Plenum Press, 1989.
9. Blank, M. Lucassen, J., et Van den Tempel, M. The elasticities of spread monolayers of bovine serum albumin and of ovalbumin. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1977, **33(1)**: 94-100.
10. Bombardier, H., Wong, P., et Gicquaud, C. Effect of the nucleotides on the denaturation of F Actin: A differential scanning calorimetry and FTIR spectroscopy study. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997, **236**: 798-803.

11. Booij, P., Demel, R. A., DE Pater, B. S., et Kijne, J. W. Insertion of pea lectin into a phospholipid monolayer. *Plant Molecular Biology*, 1996, **31**: 169-173.
12. Bornens, M., Camonis, J., Goud, B., Thiéry, J.-P., et Louvard, D. Le nouvel âge de la cellule. *Médecine/Sciences*, 1996, n° spécial, **12** : 50-66.
13. Brookhaven National Laboratory: Protein Databank.
<http://www.pdb.bnl.gov/pdb-bin/send-pdb?filename=1atnetshort=1>
14. Camejo, G., Colacicco, G. et Rapport, M. M. Lipid monolayers : interaction with the apoprotein of high density plasma lipoprotein. *Journal of Lipid Research*, 1968, **9** : 562-569.
15. Carlier, M.-F., Valentin-Ranc, C., Combeau, C., Fievez, S., et Pantoloni, D. Actin polymerization: regulation by divalent metal ion and nucleotide binding, ATP hydrolysis and binding of myosin. In: *Actin: Biophysics, Biochemistry, and Cell Biology*. Ed. Estes, J. E., et Higgins, P. J. New York: Plenum Press, 1994.
16. Carraway, K. L., et Carothers Carraway, C. A. Membrane-cytoskeleton interactions in animal cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1989, **988**: 147-171.
17. Champagne, M. Étude de l'interaction directe entre l'actine et les phospholipides membranaires par la technique des moteurs à l'actomyosine. Mémoire de maîtrise en biophysique, UQTR, 1993.
18. Chatteraj, D. K. et Birdi, K. S. Adsorption and the Gibbs surface excess. New York: Plenum Press, 1984.
19. Colacicco, G. Lipid monolayers : mechanisms of protein penetration with regard to membrane model. *Lipids*, 1967, **5(7)** : 636-649.
20. Colacicco, G. Applications of monolayer techniques to biological systems : symptoms of specific lipid-protein interaction. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1969, **29(2)** : 345-364.
21. Comtois, J.-F. Effet des têtes polaires des phospholipides sur l'interaction entre l'actine et les lipides membranaires: une étude par calorimétrie différentielle à balayage et microscopie électronique. Mémoire de maîtrise en biophysique, UQTR, 1994.

22. Davies, G. E. Association of actin with the platelet membrane. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1984, **772**: 149-160.
23. DeCouet, H. G., Stowe, S., et Blest, A. D. Membrane-associated actin in the rhabdomeral microvilli of crayfish photoreceptors. *Journal of Cell Biology*, 1984, **98**: 834-846.
24. Demel, R. A. Monolayers. Description of use and interaction. *Methods in Enzymology*, 1974, **32**: 539-545.
25. Demel, R. A. Monomolecular layers in the study of biomembranes. In: *Subcellular biochemistry*, volume 23: Physicochemical methods in the study of biomembranes. Ed. Herwig J. Hilderson et Gregory B. Ralston. New York: Plenum Press, 1994.
26. Demel, R. A., Geurts van Kessel, W. S. M., Zwaal, R. F. A., Roelofsen, B., et Van Deenen, L. L. M. Relation between various phospholipase actions on human red cell membranes and the interfacial phospholipid pressure in monolayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1975, **406**: 97-107.
27. Dietz, C., et Schnetter, R. Arrangement of F-actin and microtubules in the pseudopodia of *Cryptochlora perforans* (Chlorarachniophyta). *Protoplasma*, 1996, **193** : 82-90.
28. Dos Remedios, C. G., et Dickens, M. J. Actin microcrystals and tubes formed in the presence of gadolinium ions. *Nature*, 1978, **278** : 731-733.
29. Egelman, E. H. New angles on actin dynamics. *Structure*, 1997, **5(9)**: 1135-1137.
30. Evans, L. L., et Bridgman, P.C. Particles move along actin filament bundles in nerve growth cones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, **92** : 10954-10958.
31. ExPASy Molecular Biology Server. <http://www.expasy.ch/cgi-bin/get-sprot-entry?ACTS HUMAN>
32. Finn, D. M., et Ohlendieck, K. Membrane Protein Structure: The Domain Approach - Cross-linking analysis of rabbit skeletal-muscle dystrophin. *Biochemical Society Transactions*, 1998, **26** : S291.
33. Fowler, V. M. Regulation of actin filament length in erythrocytes and striated muscle. *Current Opinion in Cell Biology*, 1996, **8**: 86-96.

34. Freire, E., Mayorga, O. L., et Straume, M. Isothermal titration calorimetry : direct thermodynamic characterization of biological molecular interactions. *Analytical Chemistry*, 1990, **62** : 950-959.
35. Gaines, G. L. Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces. New York: Interscience Publishers, 1966.
36. Gicquaud, C., et Wong, P. Mechanism of interaction between actin and membrane lipids : a pressure-tuning infrared spectroscopy study. *Biochemical Journal*, 1994, **303** : 769-774.
37. Gonzalez, G., et MacRitchie. Equilibrium adsorption of proteins. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1970, **32(1)**: 55-61.
38. Graham, D. E., et Phillips, M. C. Proteins at liquid interfaces. I. Kinetics of adsorption and surface denaturation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1979, **70(3)**: 403-414.
39. Graham, D. E., et Phillips, M. C. Proteins at liquid interfaces. II. Adsorption isotherms. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1979, **70(3)**: 415-426.
40. Grenier, G. Cristallisation bidimensionnelle de l'actine : étude par monocouches et microscopie électronique. Mémoire de maîtrise en biophysique, UQTR, 1998.
41. Heckl, W. M., Zaba, B. N., et Möhwald, H. Interactions of cytochromes b_5 and c with phospholipid monolayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1987, **903** : 166-176.
42. Herbette, L., Napolitano, C. A. et McDaniel, R. V. Direct determination of the calcium profile structure for dipalmitoyllecithin multilayers using neutron diffraction. *Biophysical Journal*, 1984, **46**: 677-685.
43. Horton, H., Moran, L., Ochs, R., Rawn, J., et Scrimgeour, K. Principes de biochimie. Bruxelles : De Boeck – Wesmael S.A., 1994.
44. Isenberg, G. Actin binding proteins — lipid interactions. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 1991, **12**: 136-144.
45. Isenberg, G., et Niggli, V. Interaction of cytoskeletal proteins with membrane lipids. *International Review of Cytology*, 1998, **178** : 73-125.
46. Jung, E., Fucini, P., Stewart, M., Noegel, A. A., et Schleicher, M. Linking microfilaments to intracellular membranes : the actin-binding and

vesicle-associated protein comitin exhibits a mannose-specific lectin activity. *EMBO Journal*, 1996, **15** : 1238-1246.

47. Kabsch, W., Mannherz, H. G., Suck, D., Pai, E. F., et Holmes, K. C. Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature*, 1990, **347**: 37-44.
48. Kabsh, W., et Vandekerckhove, J. Structure and function of actin. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 1992, **21** :49-76.
49. Karp, G. Biologie cellulaire et moléculaire. Concepts et expériences. Bruxelles : DeBoeck Université S.A., 1998.
50. Kawamura, M., et Maruyama, K. Polymorphism of F-actin. Three forms of paracrystals. *Journal of Biochemistry*, 1970, **68** : 885-899.
51. Kirschner, M. W. Implication of treadmilling for the stability and polarity of actin and tubulin polymers in vivo. *Journal of Cell Biology*, 1980, **86** :330-334.
52. Korn, E. .D., Carlier, M.-F., et Pantaloni, D. Actin polymerization and ATP hydrolysis. *Science*, 1987, **238**: 638-644.
53. Kozarac, Z., Dhathathreyan, A., et Möbius, D. Adsorption of cytochrome c to phospholipid monolayers studied by reflection microscopy. *FEBS Letters*, 1988, **229(2)** : 372-376.
54. Kuznetsov, S. A., Langford, G. M., et Weiss, D. G. Actin-dependent organelle movement in squid axoplasm. *Nature*, 1992, **356**: 722-725.
55. Laliberté, A., et Gicquaud, C. Polymerization of actin by positively charged liposomes. *Journal of Cell Biology*, 1988, **106**: 1221-1227.
56. Lamarche, F. Une approche permettant de qualifier et de quantifier les interactions lipide-protéine et chlorophylle-protéine à l'interface air-eau. Thèse de doctorat en biophysique, UQTR, 1988.
57. Li, Q., Jin, J.-P., et Granzier, H. L. The effect of genetically expressed cardiac titin fragments on in vitro actin motility. *Biophysical Journal*, 1995, **69**: 1508-1518.
58. Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., et Darnell, J. Molecular Biology of the Cell. New York: W.H. Freeman et Co., 1997.

59. Luna, E. J., Fowler, V. M., Swanson, J., Branton, D., et Lansing Taylor, D. A. membrane cytoskeleton from *Dictyostelium discoideum* I. Identification and partial characterization of an actin-binding activity. *Journal of Cell Biology*, 1981, **88**: 396-409.
60. Luna, E. J., Goodloe-Holland, C. M., et Ingalls, H. M. A membrane cytoskeleton from *Dictyostelium discoideum* II. Integral proteins mediate the binding of plasma membrane to F-actin affinity beads. *Journal of Cell Biology*, 1984, **99**: 58-70.
61. MacRitchie, F., et Alexander, A. E. Kinetics of adsorption of proteins at interfaces, part I: the role of bulk diffusion in adsorption. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1963, **18** : 453-457.
62. MacRitchie, F., et Alexander, A. E. Kinetics of adsorption of proteins at interfaces, part II: the role of pressure barriers in adsorption. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1963, **18** : 458-463.
63. Mannherz, H. G. Crystallization of Actin in Complex with Actin-binding Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, **267** : 11661-11664.
64. Meyer, R. K. Vinculin-lipid monolayer interactions: a model for focal contact formation. *European Journal of Cell Biology*, 1989, **50**: 491-499.
65. Miller, L., Phillips, M., et Reisler, E. Polymerization of actin modified with fluorescein isothiocyanate. *European Journal of Biochemistry*, 1988, **174** : 23-29.
66. Mingotaud, A.-F., Mingotaud, C., et Patterson, L. K. Handbook of monolayers (vol. 1). San Diego: Academic Press Inc., 1993.
67. Morse, P. D., et Deamer D. W. Interaction of cytochrome *c* with lipid monolayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1973, **298** : 769-782.
68. Nonomura, Y., Katayama, E., et Ebashi, S. Effect of phosphates on the structure of the actin filament. *Journal of Biochemistry (Tokyo)*, 1975, **78**: 1101-1104.
69. Papahadjopoulos, D., Moscarello, M., Eylar, E. H., et Isac, T. Effect of proteins on thermotropic phase transitions of phospholipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1975, **401** : 317-335.
70. Paulsson, M., et Dejmek, P. Surface film pressure of β -lactoglobulin, α -lactalbumin and bovine serum albumin at the air/water interface

studied by Wilhelmy plate and drop volume. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1991, **150**(2): 394-403.

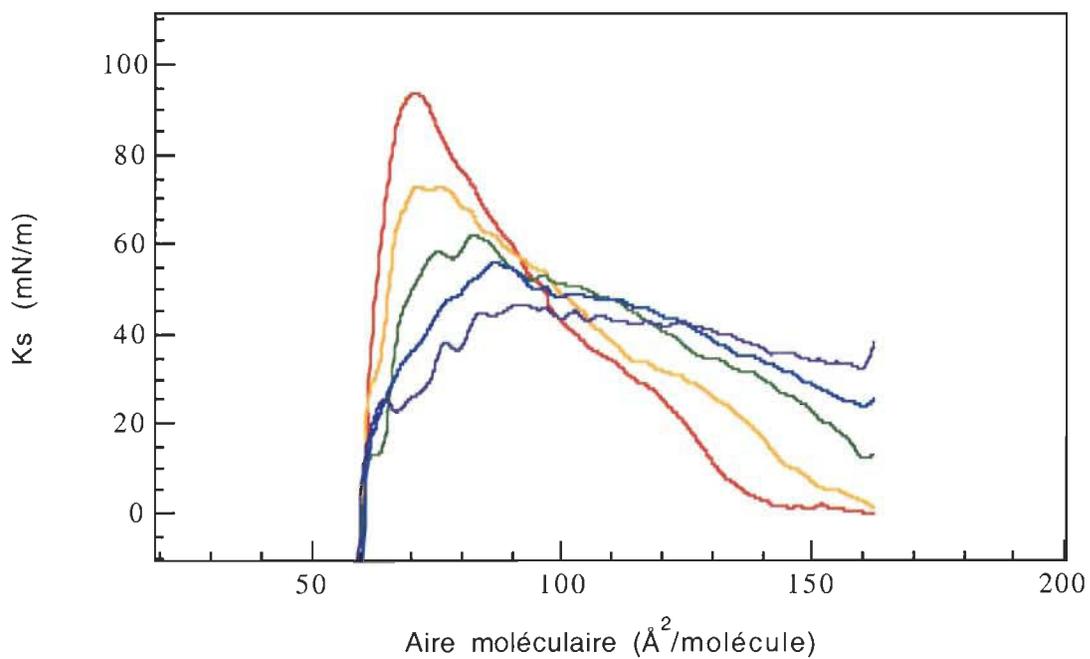
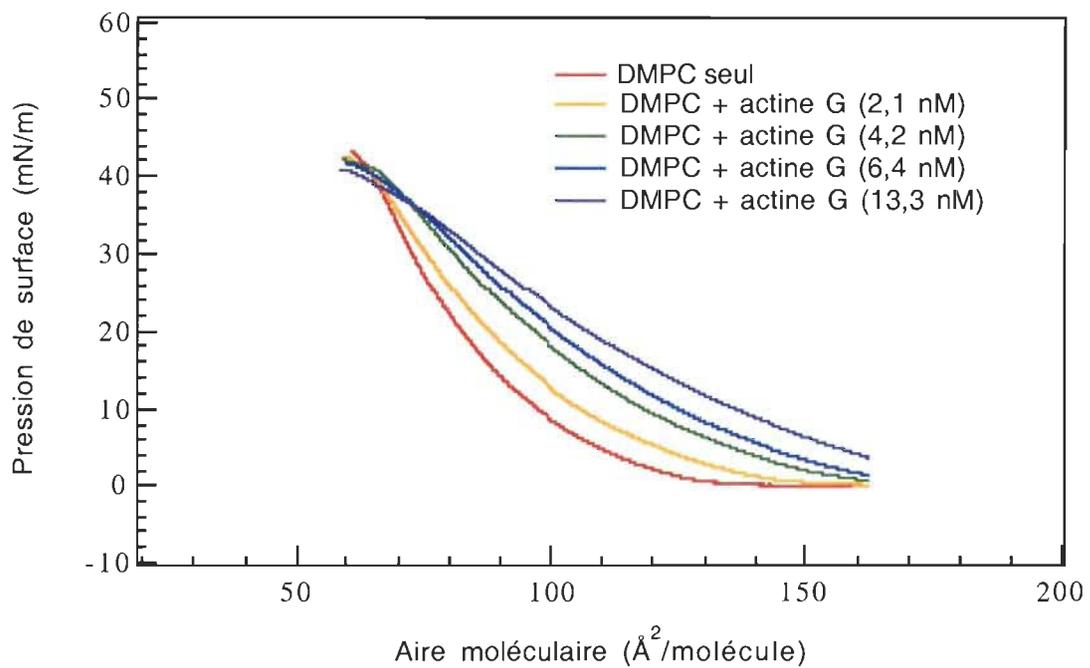
71. Pigeon, B. Étude de l'interaction directe entre l'actine et les lipides membranaires (liposomes) par calorimétrie différentielle à balayage et microscopie électronique. Mémoire de maîtrise en biophysique, UQTR, 1992.
72. Pollard, T. D. et Cooper, J. A. Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and function. *Annual Review of Biochemistry*, 1986, **55**: 987-1035.
73. Privalov, P. L. Stability of proteins: small globular proteins. *Advances in Protein Chemistry*, 1979, **33** : 167-241.
74. Richelme, F., Benoliel, A.-M., et Bongrand, P. The leukocyte actin cytoskeleton. *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 1996, **94**: 257-284.
75. Rioux, L., et Gicquaud, C. Actin paracrystalline sheets formed at the surface of positively charged liposomes. *Journal of Ultrastructure Research*, 1985, **93**: 42-49.
76. Ross, R., Ross, X. L., Schwing, J., Langin, T., et Reske-Kunz, A. B. The actin-bundling protein fascin is involved in the formation of dendritic processes in maturing epidermal Langerhans. *Journal of Immunology*, 1998, **160** : 3776-3783.
77. Saint-Pierre-Chazalet, M., Fressigné, C., Billoudet, F., et Pileni, M. P. Phospholipid-protein interactions at the air-water interface: a monolayer study. *Thin Solid Films*, 1992, **211**: 743-746.
78. Schmid, M. F., Agris, J. M., Jakana, J., Matsudaira, P., Chiu, W. Three-dimensional structure of a single filament in the *Limulus* acrosomal bundle: Scruin binds to homologous helix-loop-beta motifs in actin. *Journal of Cell Biology*, 1994, **124**: 341-351.
79. Schwartz, M. A., et Luna, E. J. How actin binds and assembles onto plasma membranes from *Dictyostelium discoideum*. *Journal of Cell Biology*, 1988, **107**: 201-209.
80. Shibata, A., Iizuka, Y., Ueno, S., et Yamashita, T. Effect of water activity on unfolding of adsorbed protein at the interface. *Thin Solid Films*, 1996, **285**: 549-551.

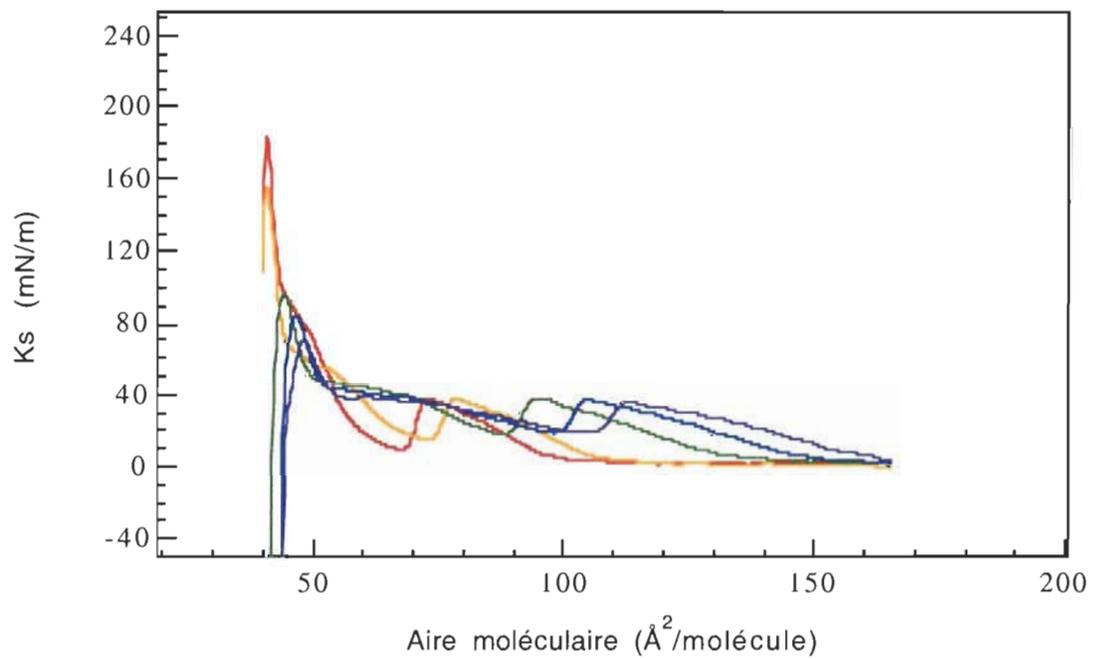
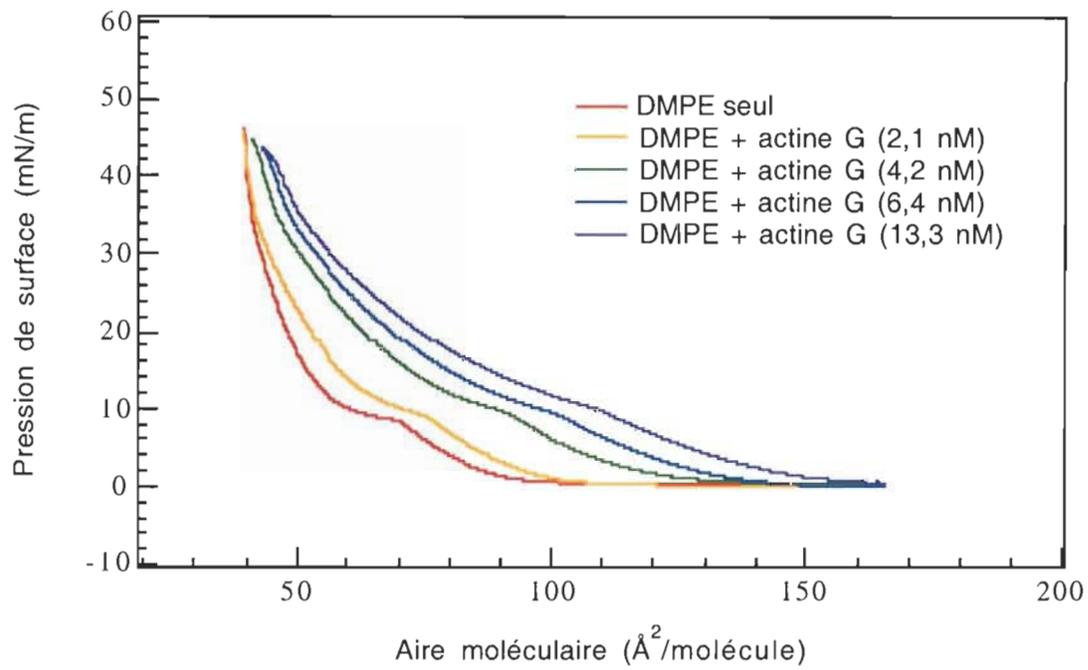
81. Simon, V. R., Swayne, T. C., et Pon, L. A. Actin-dependent mitochondrial motility in mitotic yeast and cell-free systems: identification of a motor activity on the mitochondrial surface. *Journal of Cell Biology*, 1995, **130(2)**: 345-354.
82. Smith, M. G., Simon, V. R., O'Sullivan, H., et Pon, L.A. Organelle-cytoskeletal interactions: actin mutations inhibit meiosis-dependent mitochondrial rearrangement in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 1995, **6**: 1381-1396.
83. Soeno, Y., Hayakawa, K., et Obinata, T. Effects of exogenous β -actinin (CapZ) on actin filamentous structures in cultured muscle cells. *Zoological Science*, 1998, **15**: 217-225.
84. Spudich, J. A., et Watt, S. The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I: Biochemical studies of the interaction of tropomyosin-troponin complex with actin and proteolytic fragments of myosin. *Journal of Biological Chemistry*, 1971, **246**: 4866-4871.
85. St-Onge, D. et Gicquaud, C. Evidence of direct interaction between actin and membrane lipids. *Biochemistry and Cell Biology*, 1989, **67**: 297-300.
86. St-Onge, D., et Gicquaud, C. Research on the mechanism of interaction between actin and membrane lipids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1990, **167**: 40-47.
87. Stossel, T. P., Chaponnier, C., Ezzel, R. M., Hartwig, J. H., Janmey, P. A., Kwiatkowski, D. J. et Lind, S. E. Nonmuscle actin-binding proteins. *Annual Review of Biology*, 1985, **1**: 353-402.
88. Sussman, M. A., Welch, S., Cambon, N., Klevitsky, R., Hewett, T. E., Price, R., Witt, S. A., et Kimball, T. R. Myofibril degeneration caused by tropomodulin overexpression leads to dilated cardiomyopathy in juvenile mice. *Journal of Clinical Investigation*, 1998, **101**: 51-62.
89. Taylor, K. A., et Taylor, D. W. Formation of two-dimensional complexes of F-actin and crosslinking proteins on lipid monolayers: demonstration of unipolar α -actinin-F-actin crosslinking. *Biophysical Journal*, 1994, **67**: 1976-1983.
90. Ter-Minassian-Saraga, L. Protein denaturation on adsorption and water activity at interfaces: an analysis and suggestion. *Science*, 1981, **80(2)**: 393-401.

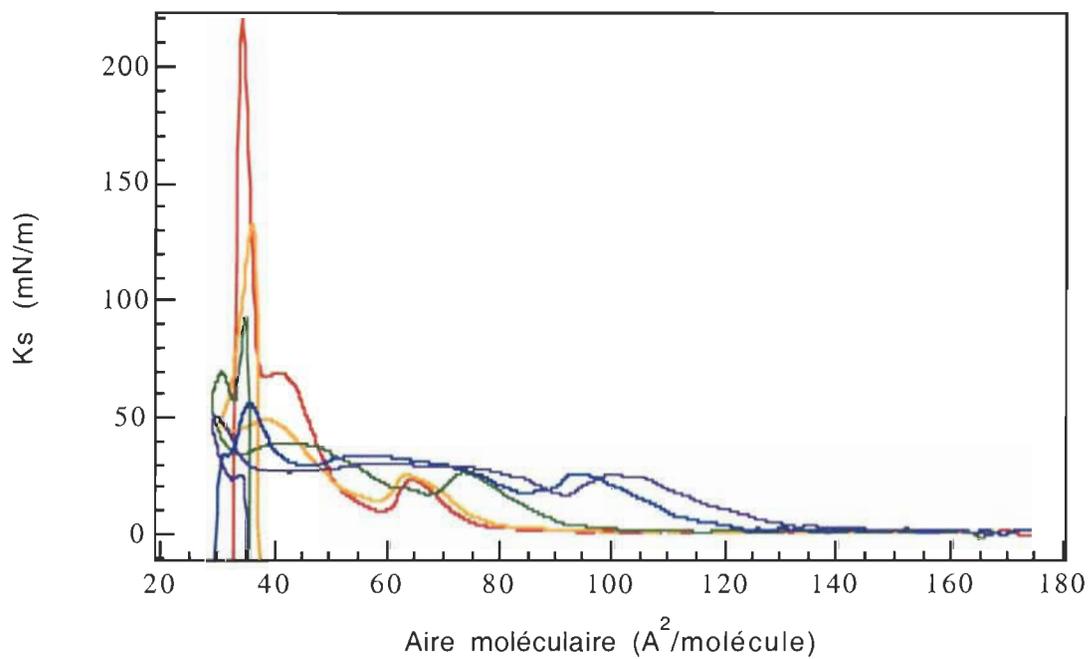
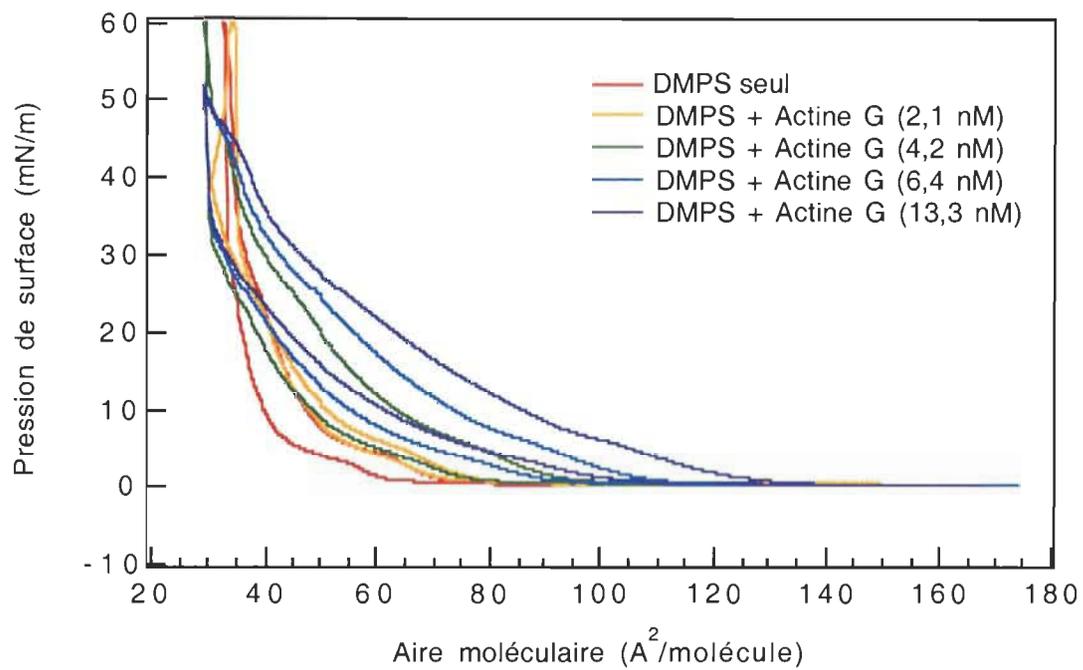
91. Tranter, M. P., Sugrue, S. P., et Schwartz, M. A. Binding of actin to liver cell membranes: the state of membrane-bound actin. *Journal of Cell Biology*, 1991, **112**: 891-901.
92. Voet, D., et Voet, J. G. Biochimie. 2e édition. Bruxelles : DeBoeck Université, 1998.
93. Wuestehube, L. J., et Luna, E. J. F-actin binds to the cytoplasmic surface of ponticulin, a 17-kD integral glycoprotein from Dictyostelium discoideum plasma membranes. *Journal of Cell Biology*, 1987, **105**: 1741-1751.
94. Yamashiro, S., Yamakita, Y., Ono, S., et Matsumura, F. Fascin, an Actin-bundling Protein, Induces Membrane Protrusions and Increases Cell Motility of Epithelial Cells. *Molecular Biology of the Cell* - Bethesda, 1998, **9** : 993-1007.
95. Yamashita, T., et Bull, H. B. Spread monolayers of lysozyme. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1967, **24** : 310-316.

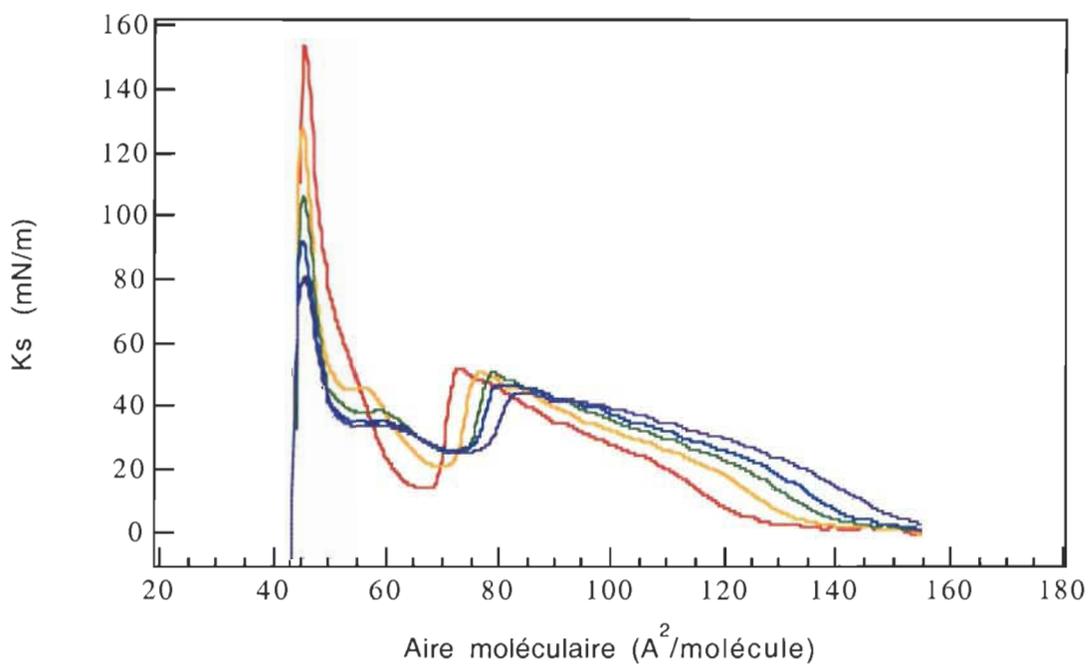
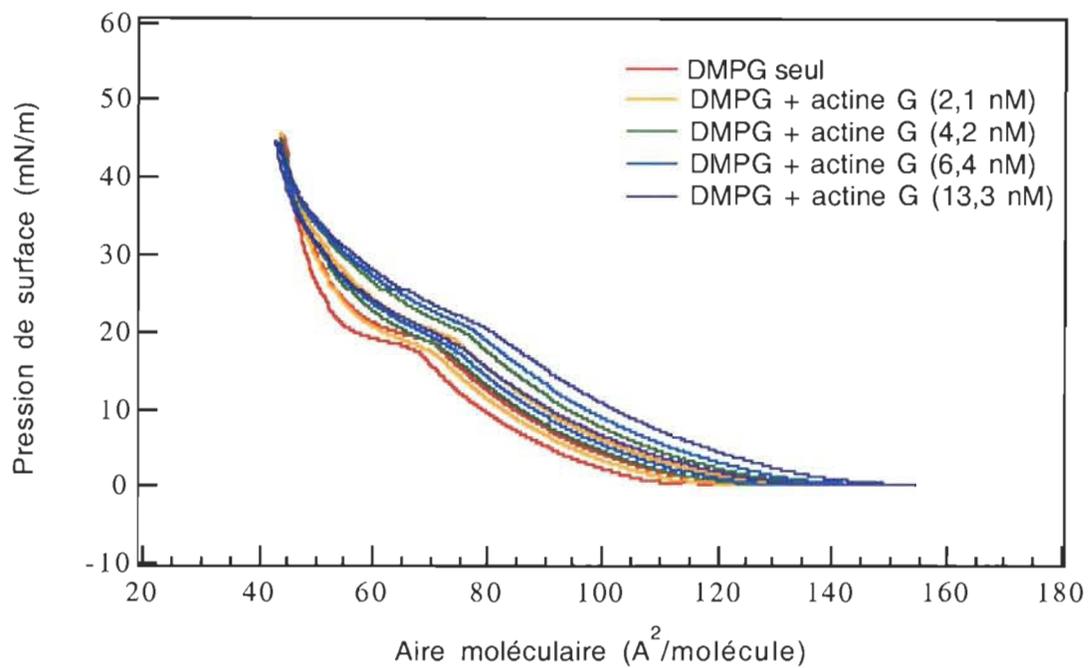
ANNEXE A

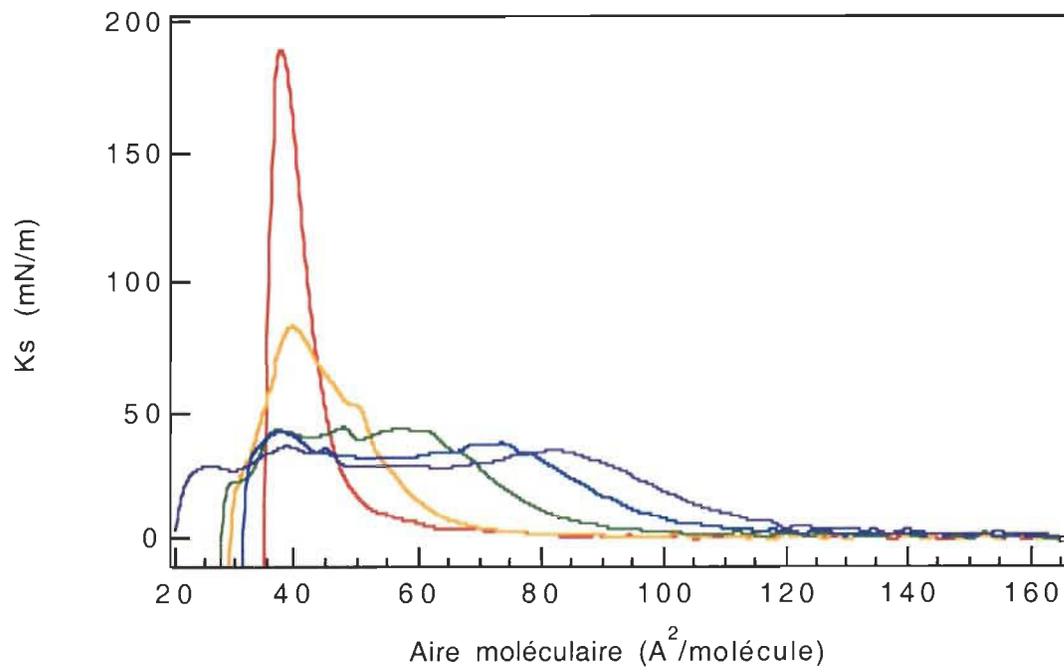
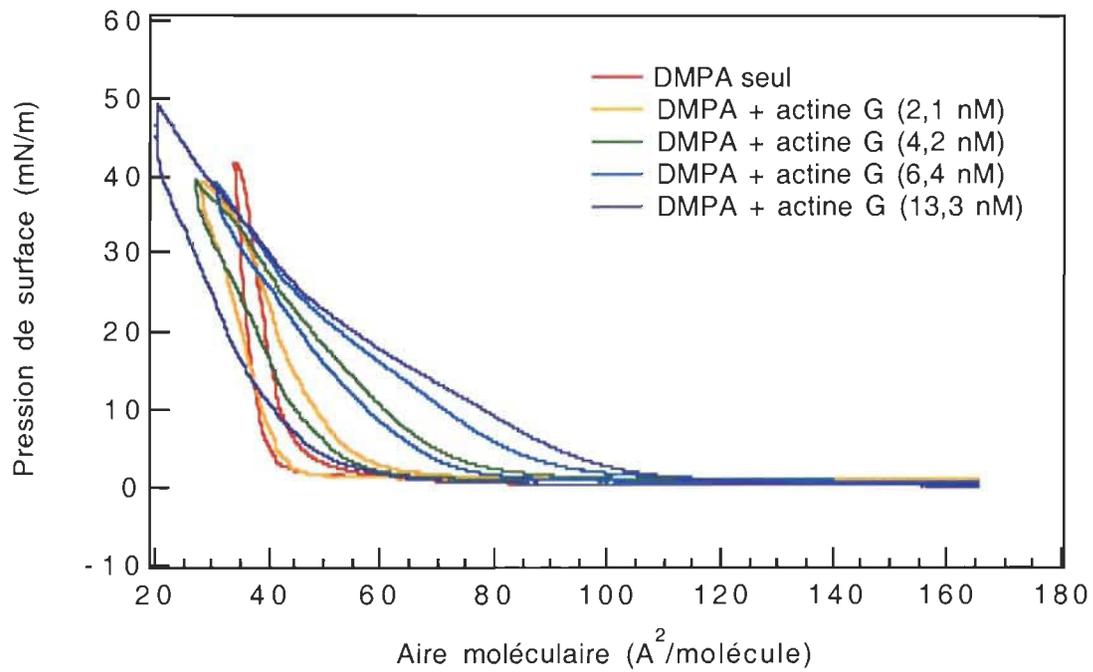
Isothermes des films de lipides seuls en présence et en absence d'actine G et les courbes de Ks correspondantes





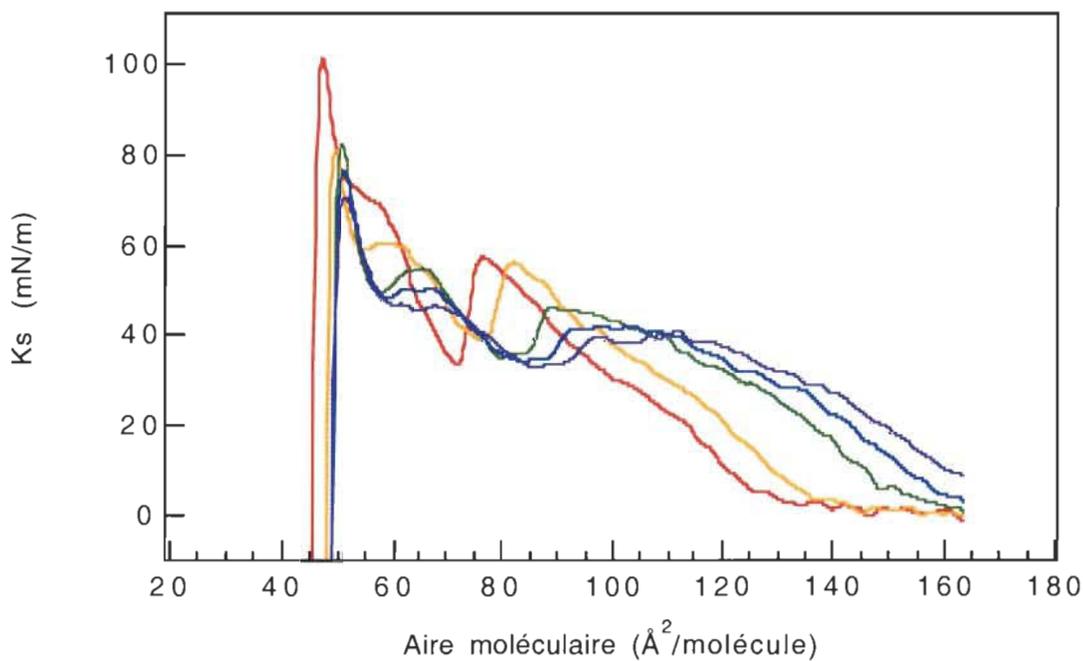
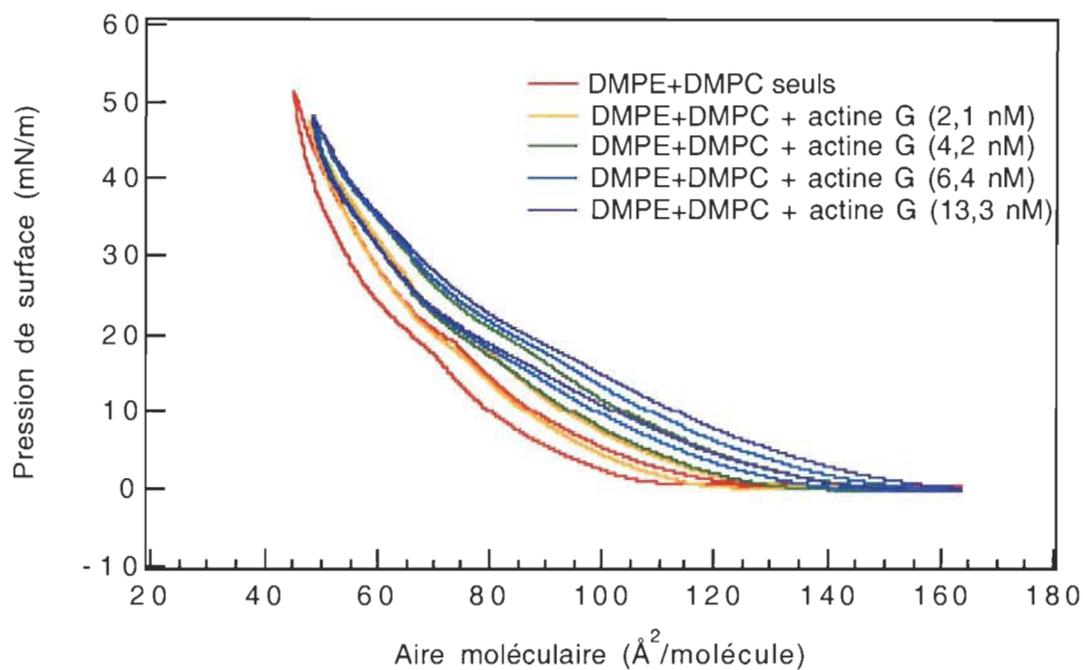


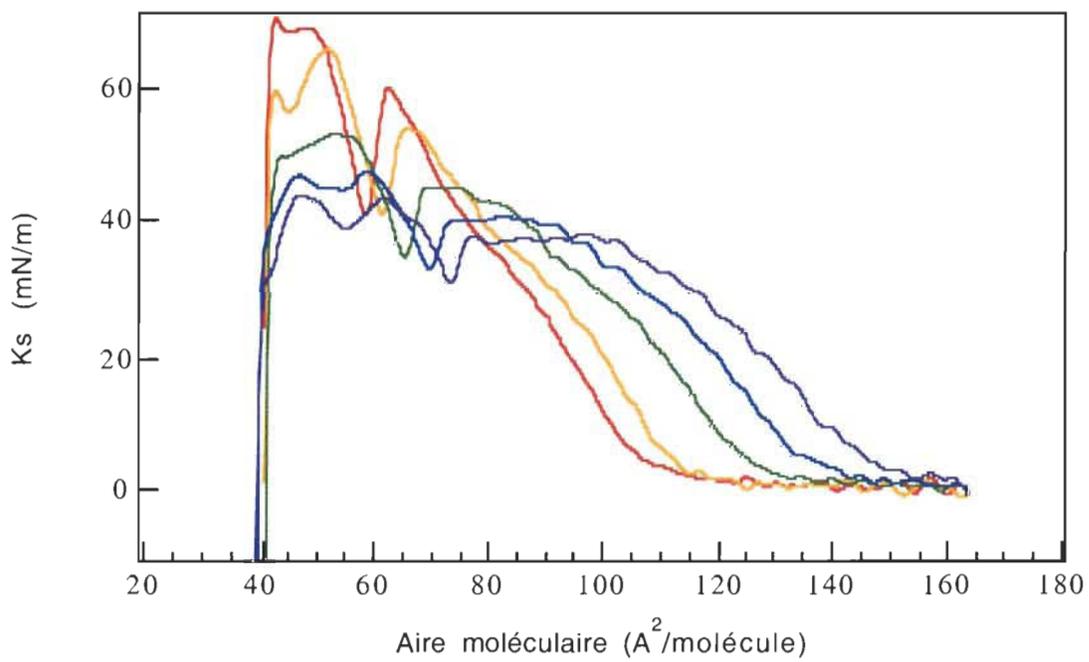
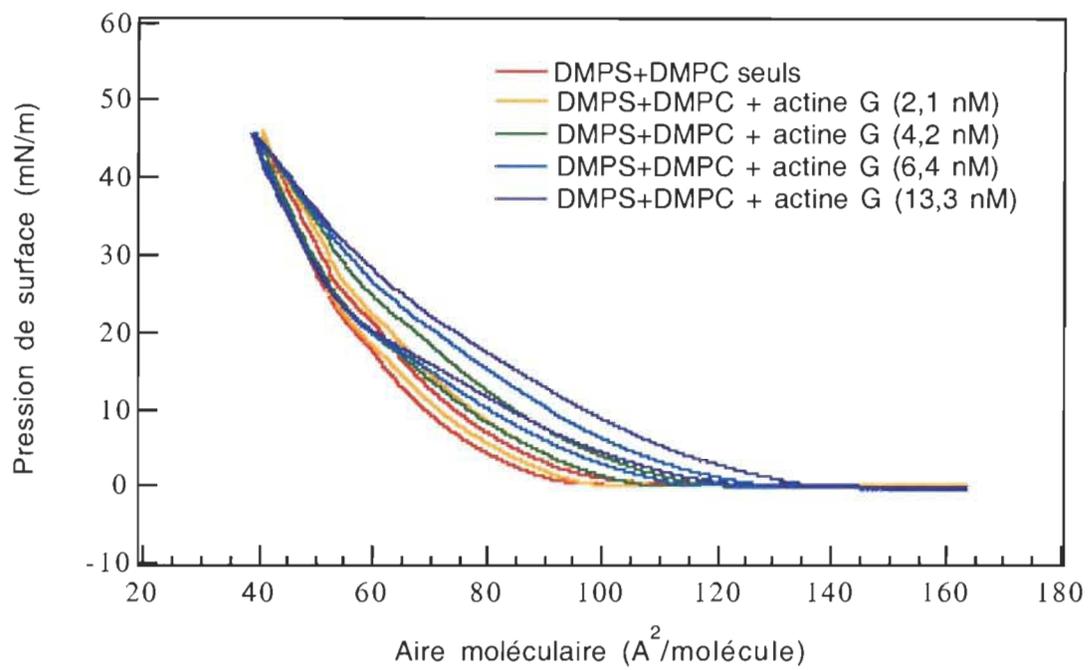


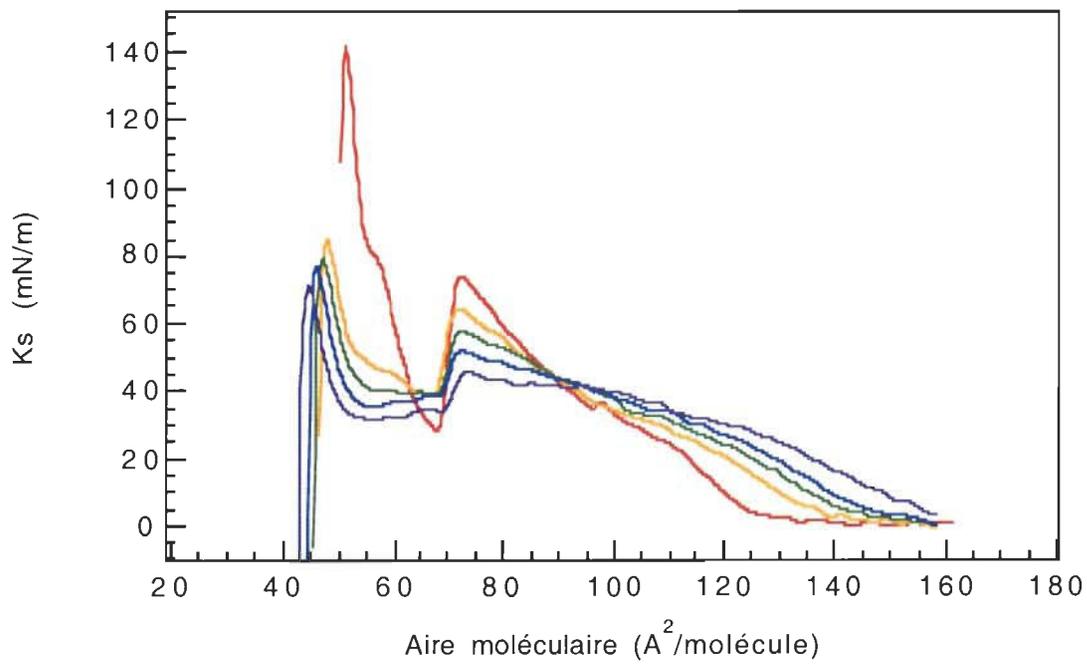
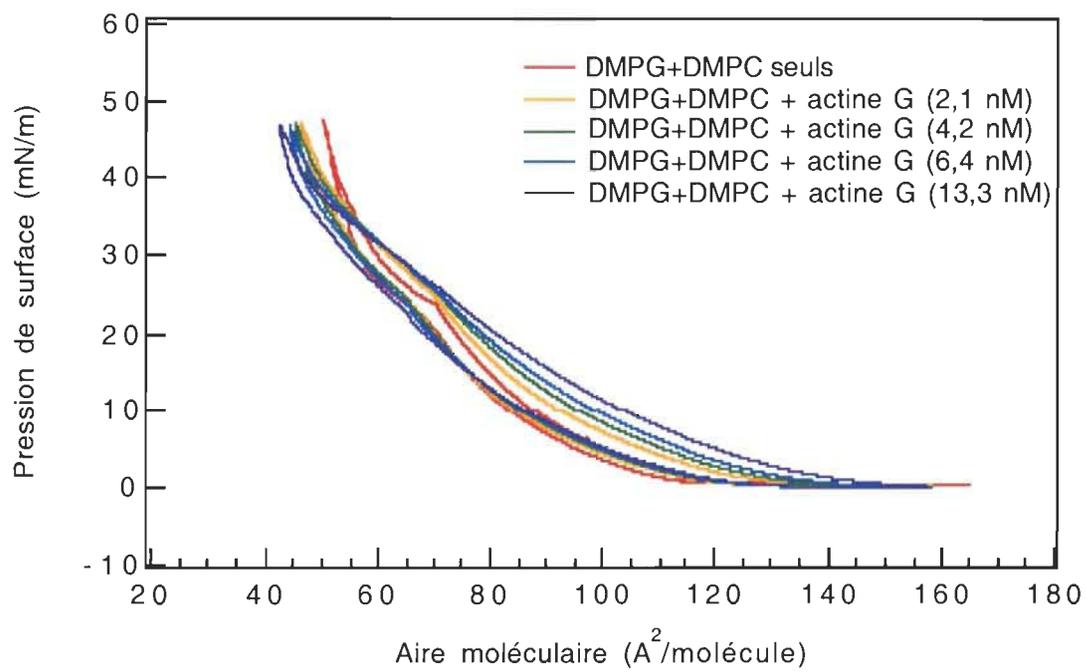


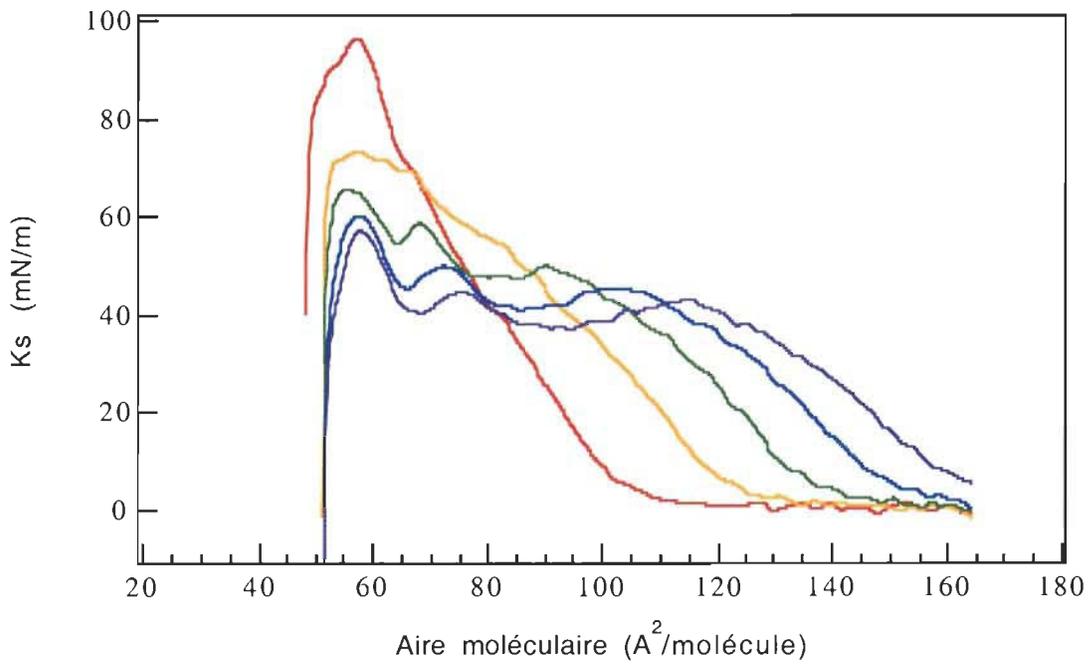
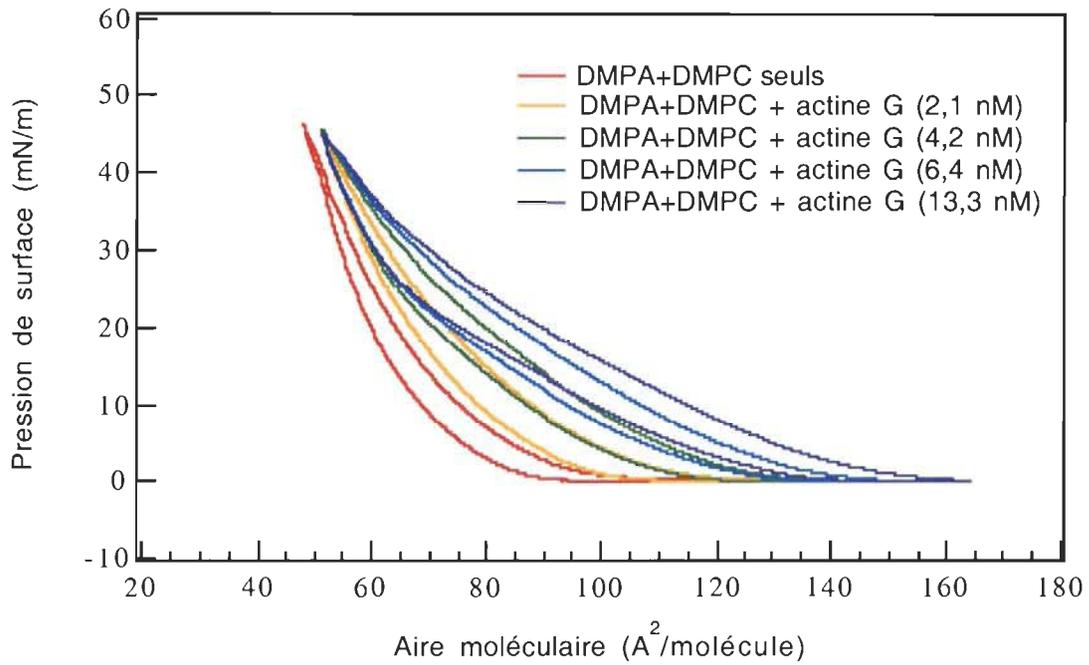
ANNEXE B

Isothermes des films de lipides mélangés au DMPC en présence et en absence d'actine G et les courbes de Ks correspondantes



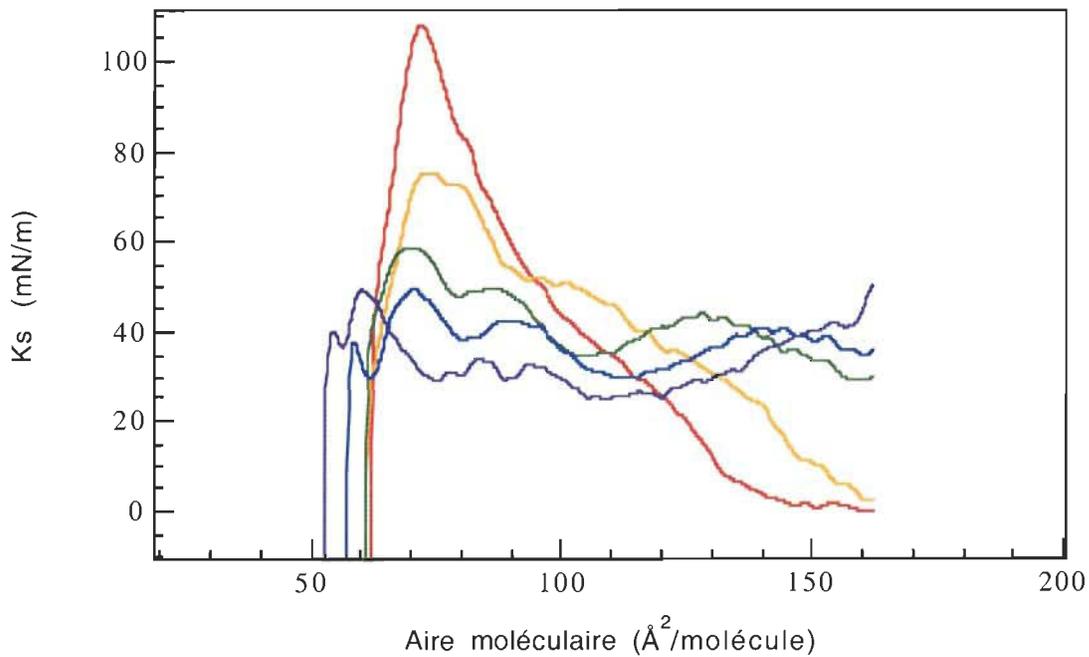
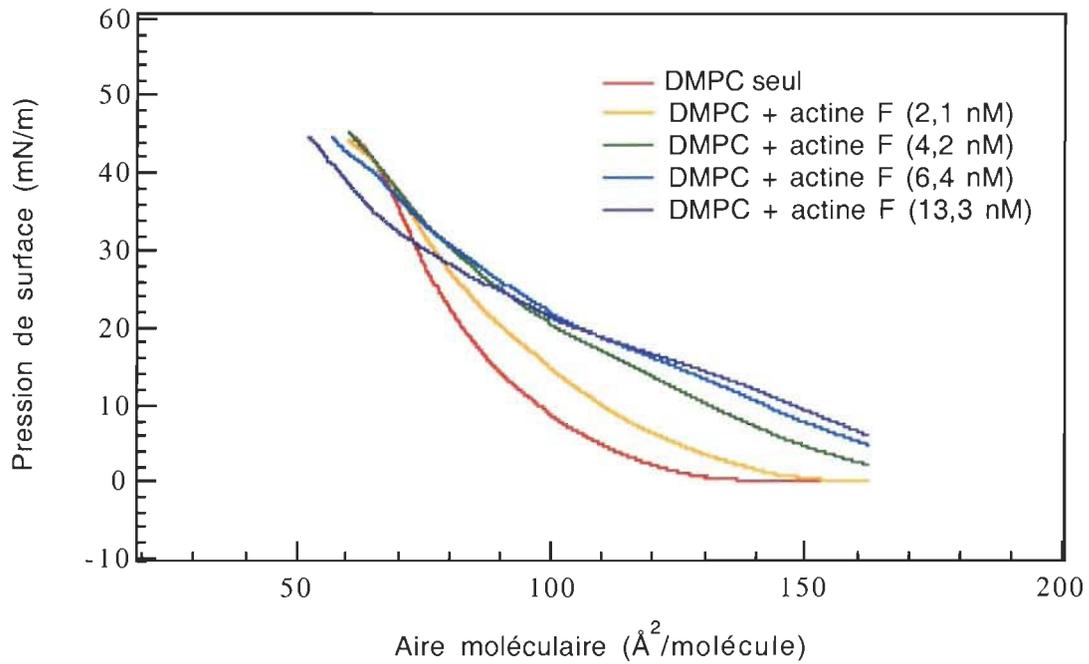


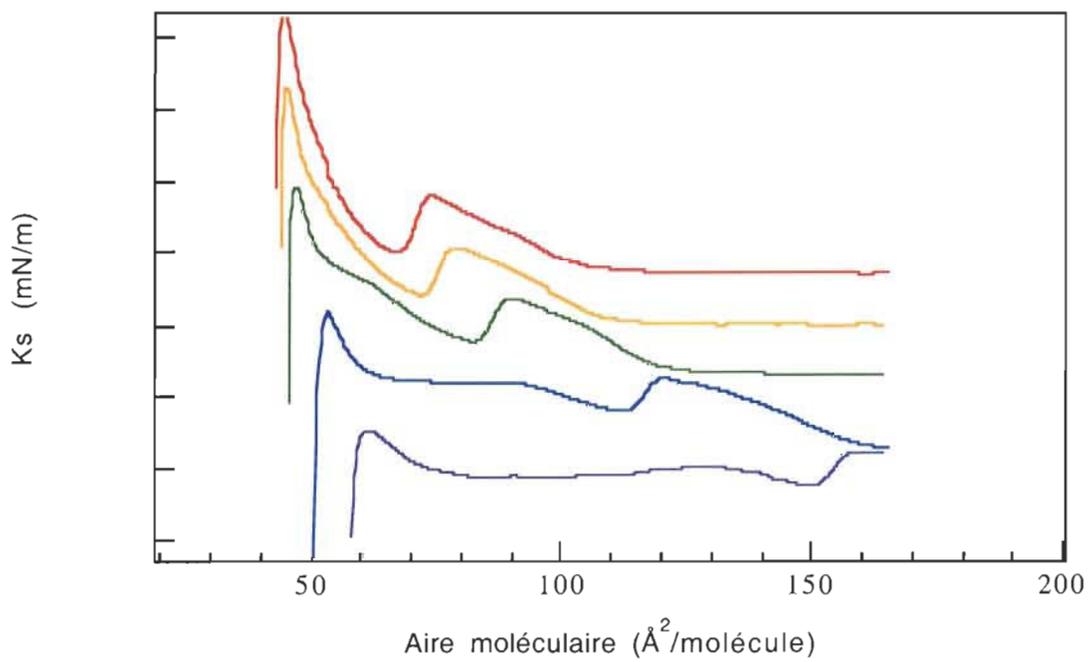
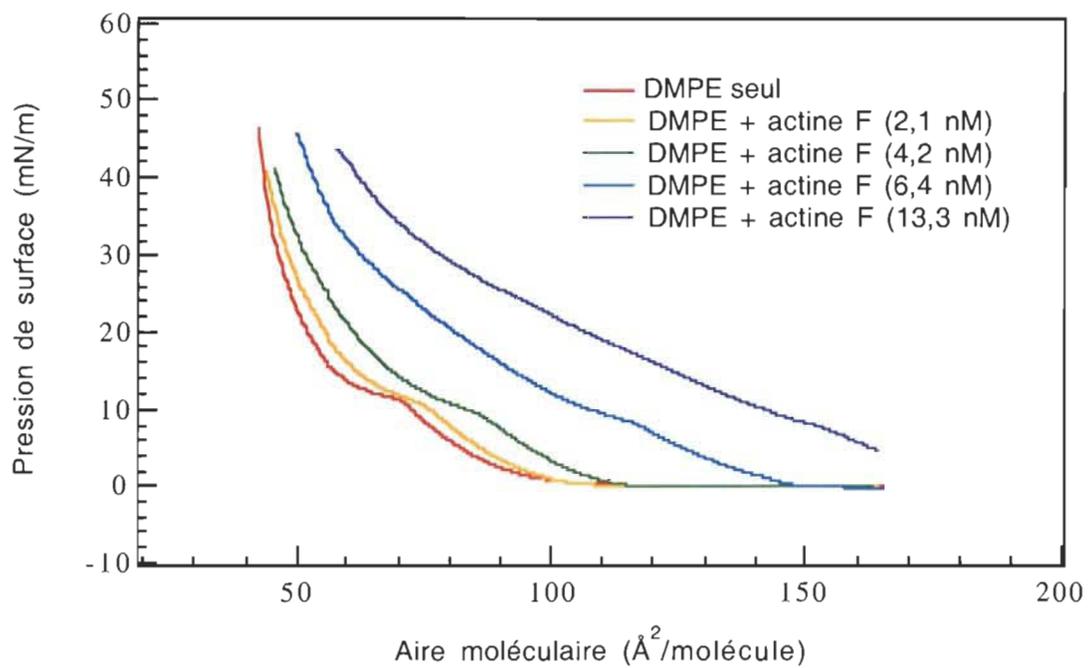


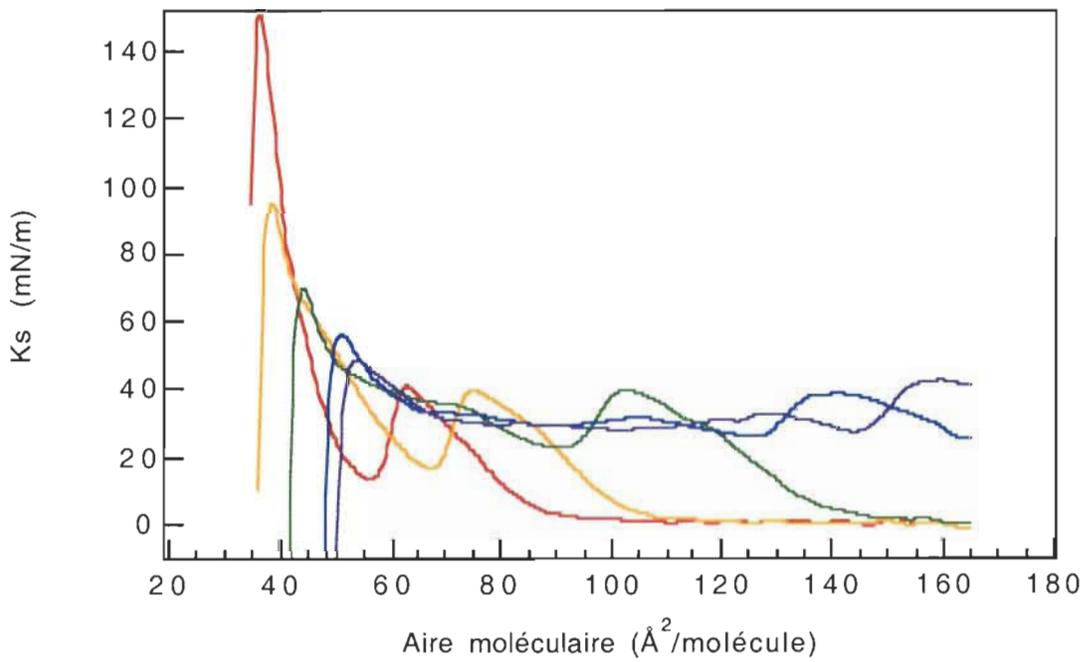
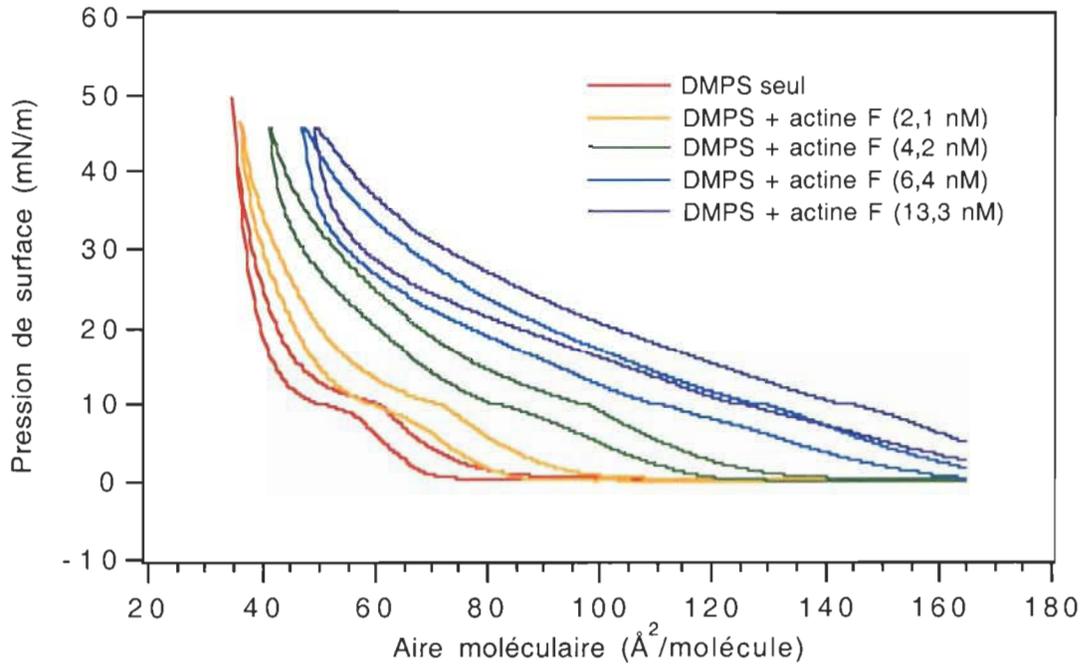


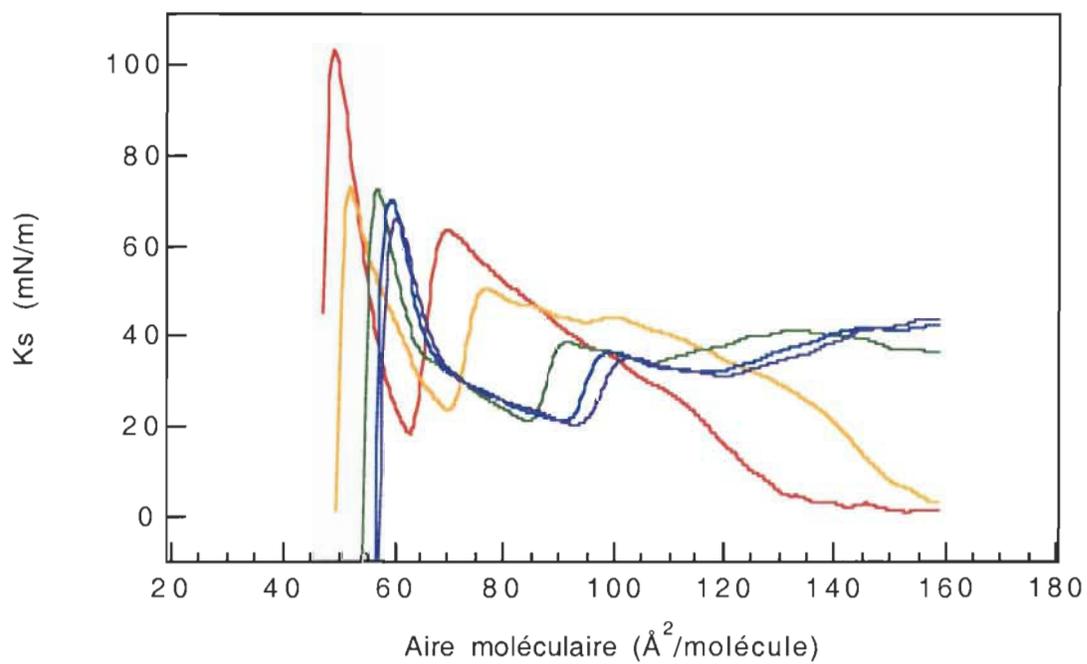
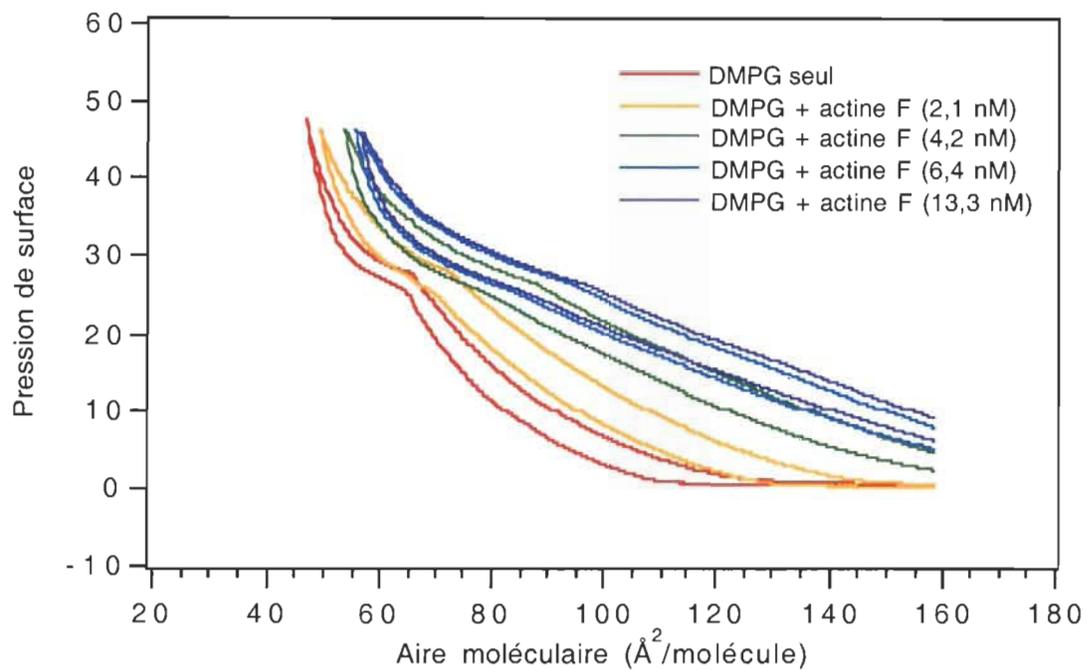
ANNEXE C

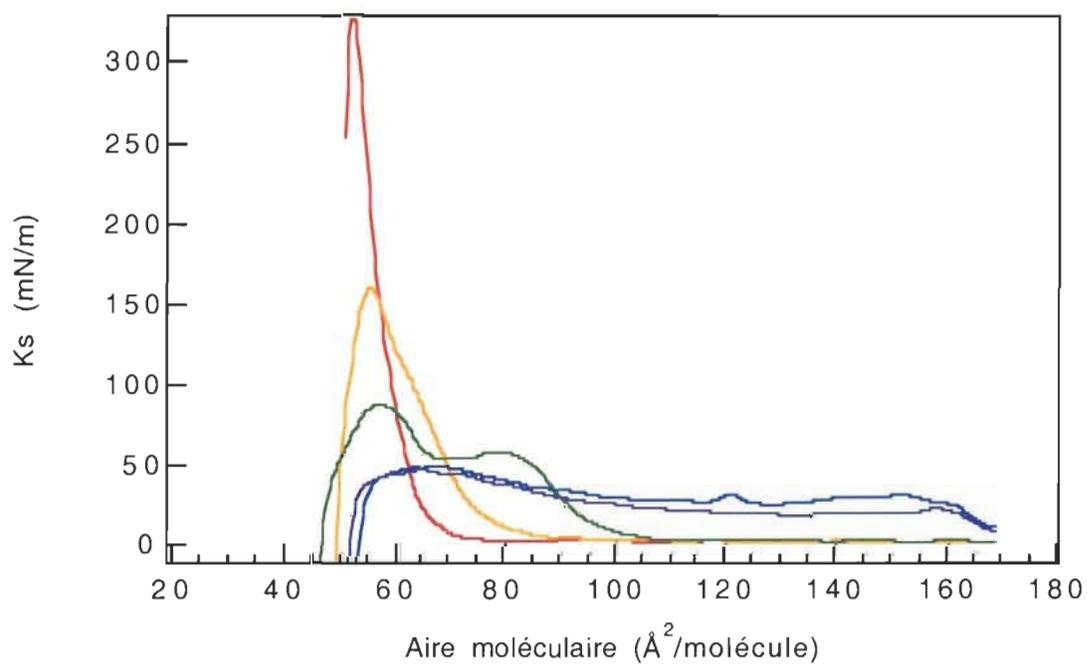
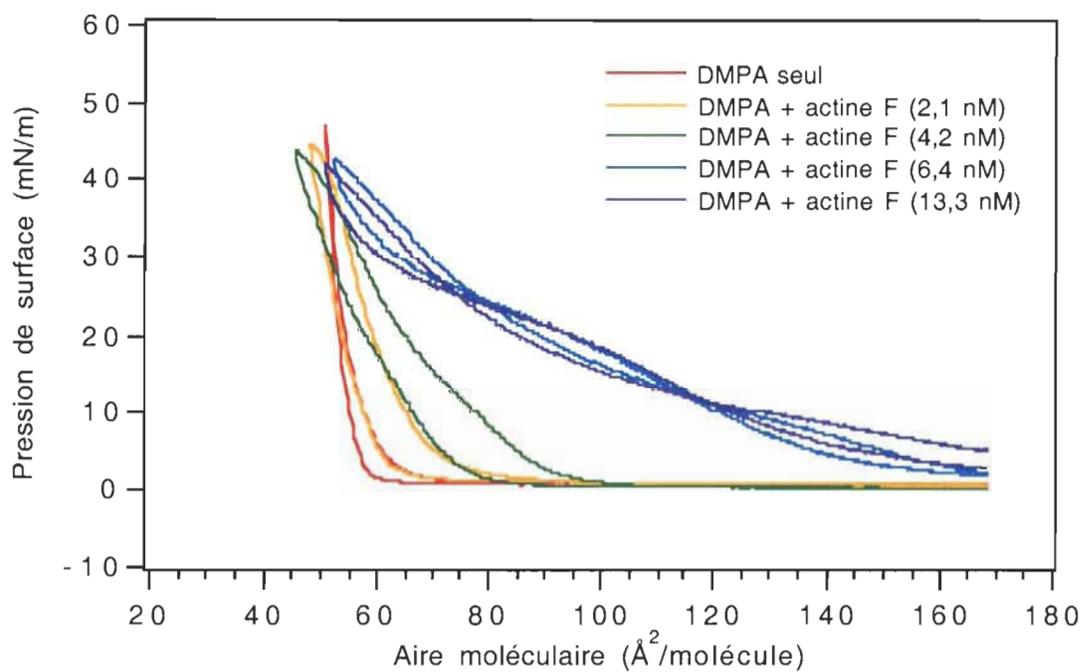
Isothermes des films de lipides seuls en présence et en absence d'actine F et les courbes de Ks correspondantes











ANNEXE D

Isothermes des films de lipides mélangés au DMPC en présence et en absence d'actine F et les courbes de Ks correspondantes

