

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

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

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE

PAR
GUILLAUME GRENIER

CRISTALLISATION BIDIMENSIONNELLE DE L'ACTINE: ÉTUDE PAR
MONOCOUCHE ET PAR MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

SEPTEMBRE 1998

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.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	v
REMERCIEMENTS	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	ix
LISTE DES TABLEAUX	x
LISTE DES FIGURES	x
CHAPITRE I	
Introduction	1
1.1. Généralités sur l'actine	1
1.2. Polymérisation de l'actine	4
1.2.1. La nucléation	5
1.2.2. L'élongation.....	6
1.2.3. Phase stationnaire	7
1.3. Les structures de l'actine filamenteuse	8
1.3.1. Modèle de Heidelberg de l'actine filamenteuse	9
1.3.2. Modèle de transition ruban-hélice de l'actine filamenteuse.....	10
1.3.3. Modèle de Egelman-Adràon de l'actine filamenteuse	10
1.3.4. Modèle du "Fluttering Wings" ou du "doux battement d'ailes"	11
1.4. Les paracristsaux d'actine	11
1.4.1. Paracristsaux obtenus en solution	12
1.4.2. Cristaux bidimensionnels d'actine formés à la surface des lipides	13
1.5. Étude structurale des protéines.....	14
1.5.1. La cristallisation bidimensionnelle interfaciale des protéines	15
1.5.1.1. <i>Cristallisation bidimensionnelle de protéines sous une monocouche de lipides</i>	17
1.5.1.1.1. Les monocouches de lipides	19

1.5.1.1.2. Cristallisation bidimensionnelle des protéines sous une monocouche de lipides	21
1.5.2. La technique de Langmuir-Blodgett	22
1.5.3. Petite histoire de la cristallisation bidimensionnelle de l'actine	23
1.6. Objectifs du projet de recherche	25

CHAPITRE II

Matériel et méthodes	26
2.1. Matériel	26
2.1.1. Produits utilisés	26
2.1.2. Solutions tampons	27
2.1.3. Préparation de l'actine	27
2.1.3.1. Contrôle de la pureté de l'actine	28
2.1.4. Cuves en Téflon™ utilisées pour faire des monocouches	29
2.1.5. Les solvants d'étalement	31
2.1.6. Support informatique utilisé	32
2.2. Méthodes	32
2.2.1. Étude des interactions actine-lipides en monocouche	32
2.2.1.1. Préparation des films de lipides	32
2.2.1.2. Mesure de la pression de surface	33
2.2.1.2.1. L'isotherme de pression de surface en fonction de l'aire par molécule (π -A)	34
2.2.1.2.2. Mesure du travail de compression (W_c)	36
2.2.1.3. Étude des interactions actine-lipides en monocouches	37
2.2.2. Observation des monocouches en microscopie électronique	38
2.2.3. Les films de Langmuir-Blodgett	41
2.2.3.1. Le transfert sur support solide	41
2.2.3.2. Les différents types de transfert	41
2.2.3.3. Technique d'Uzgiris	43

CHAPITRE III

Résultats	46
3.1. Étude de l'interaction actine-lipides à l'interface air-eau.....	46
3.1.1. Interactions actine-lipides en monocouche.....	46
3.1.2. Effet de l'actine sur le travail de compression (W_c) d'un film.....	55
3.1.2.2. <i>Travail de compression de films mixtes de lipides et d'actine</i>	56
3.1.3. Conclusions sur les interactions actine-lipides en monocouches	57
3.2. Observation par microscopie électronique des films actine-lipides	58
3.3. Recherche de conditions optimales pour l'obtention de cristaux bidimensionnels d'actine par microscopie électronique	62
3.3.1. Effet d'un excès de lipides sur la polymérisation de l'actine.....	63
3.3.2. Effet du $MgCl_2$ sur l'organisation de l'actine en présence d'un excès de lipides	73
3.3.3. Effet de la fluidité des lipides sur la formation de cristaux bidimensionnels d'actine	79
3.3.4. Conclusions de ces expériences faites en microscopie électronique	82
3.4. Étude de la formation de cristaux bidimensionnels d'actine sur un support solide	83
3.4.1. Isothermes de EYPC seul et de mélanges EYPC:SA étalés à l'interface air-eau	84
3.4.2. Recherche des conditions optimales pour l'obtention de filaments et de cristaux bidimensionnels d'actine par la technique de Langmuir-Blodgett modifiée par Uzgiris	85
3.4.2.1. <i>Effet de la concentration d'actine sur la formation de filaments à la surface des lipides</i>	85
3.4.2.2. <i>Effet du temps et de la température d'incubation de l'actine avec les lipides sur la formation de filaments</i>	87
3.4.2.3. <i>Effet de la concentration en $MgCl_2$ sur la formation de filaments d'actine à la surface des lipides</i>	88
3.4.3. Conditions optimales pour l'observation de cristaux bidimensionnels d'actine par la technique de Langmuir-Blodgett modifiée par Uzgiris	90
3.4.4. Conclusions sur l'étude de la formation de cristaux bidimensionnels d'actine sur support solide.....	94

CHAPITRE IV	
Discussion	96
4.1. Critique des techniques	96
4.1.1. Les monocouches.....	96
4.1.2. Microscopie électronique.....	96
4.1.2.1. <i>La méthode de récupération des films</i>	97
4.1.2.2. <i>L'effet du colorant sur les préparations</i>	99
4.2. Importance de la quantité de lipides sur la formation de filaments et de cristaux bidimensionnels d'actine	100
4.3. Relation entre imperfections membranaires et la formation de filaments et cristaux bidimensionnels d'actine observés dans la technique de Langmuir-Blodgett modifiée par Uzgis	103
4.4. Proposition d'un mécanisme de polymérisation et de cristallisation de l'actine à la surface des lipides	105
4.5. Poursuite des études d'interactions actine-lipides dans les systèmes bidimensionnels	109
4.5.1. Étude des forces régissant les interactions actine-lipides	109
4.5.2. Étude de la structure du filament d'actine	110
CHAPITRE V	
Conclusions	114
RÉFÉRENCES	116

RÉSUMÉ

L'actine est une protéine impliquée dans les phénomènes de contraction musculaire et de motilité cellulaire. C'est aussi une des composantes du cytosquelette. Cette protéine n'a jamais été cristallisée à l'état pur. Cependant, notre laboratoire a trouvé que l'actine peut se fixer à la surface de liposomes chargés positivement et former des structures cristallines. Cette technique a cependant des limites car les liposomes sont des structures sphériques, et la qualité des cristaux est affectée par le rayon de courbure. L'objectif de notre travail est de définir les conditions où l'actine forme des cristaux bidimensionnels sur une surface plane.

Nous avons tout d'abord étudié les interactions actine-lipides à l'aide de la technique des monocouches. Nos résultats montrent que l'actine injectée en sous-phase remonte à l'interface air-eau. L'adsorption des molécules d'actine, qui possède une charge négative, est favorisée par la présence, à l'interface, d'un film de lipides chargés positivement. Cette interaction qui est de nature électrostatique est augmentée par la présence de $MgCl_2$ en sous-phase. L'interaction actine-lipides est maximale avec un film de lipides chargés positivement (DLPC:SA [70:30]) étalé sur un tampon contenant 3 mM de $MgCl_2$ et 1,1 $\mu g/ml$ d'actine. Cependant, nous n'observons pas de cristaux bidimensionnels d'actine à l'interface dans ces conditions.

Par la suite, dans une série d'expériences en microscopie électronique, nous avons étudié l'influence de la concentration en actine, de la concentration en $MgCl_2$ et de

la quantité de lipides étalés à l'interface air-eau. Nos résultats montrent qu'il y a formation de cristaux bidimensionnels d'actine à l'interface lorsque des lipides chargés positivement (DLPC:SA [70:30]) en excès d'un facteur 2, sont étalés sur un tampon contenant 3 mM de $MgCl_2$ et 10 $\mu g/ml$ d'actine. Ces cristaux bidimensionnels d'actine se forment à partir d'imperfections du film de lipides. Ils sont faits de filaments parallèles juxtaposés en phase, et dont la périodicité latérale est de 37,5 nm. Le diamètre des filaments est de 8 nm et la distance moyenne entre les filaments est d'environ 4,8 nm. Notre étude montre également que la fluidité de la membrane est un facteur important pour la formation de cristaux bidimensionnels à l'interface. Lorsque nous utilisons un mélange de lipides plus fluide (EYPC:SA [75:25]), nous obtenons des cristaux bidimensionnels plus compacts. Ces cristaux ont la même morphologie que ceux obtenus avec des mélanges DLPC:SA (70:30) mais la distance moyenne entre les filaments est plus petite, de l'ordre de 1,7 nm.

Dans ce travail, nous avons également développé une technique de cristallisation bidimensionnelle de l'actine sur support solide basée sur la méthode de Langmuir-Blodgett, modifiée par Uzgiris. Cette méthode consiste à transférer une bicouche constituée de lipides chargés positivement sur une grille de microscopie électronique recouverte de FormvarTM-carbone. Lorsque cette grille recouverte d'une bicouche de lipides est déposée sur une préparation contenant 80 $\mu g/ml$ d'actine et 2 mM de $MgCl_2$, l'actine en contact avec cette bicouche polymérise en cristaux bidimensionnels. Ces cristaux sont faits de filaments parallèles de 7 nm de diamètre, juxtaposés en phase, et dont la périodicité latérale est de 37,5 nm. Ces cristaux se forment à partir de germes de cristallisation qui sont des imperfections dans la membrane. Selon l'endroit où se forment les cristaux, leur morphologie est

différente. Au milieu de la grille, la distance entre les filaments qui contient le cristal est de l'ordre de 15 nm. Par contre, sur le bord d'un barreau de grille de microscopie électronique, la distance entre les filaments est $<2,7$ nm. L'avantage de cette méthode est de former, en peu de temps et avec peu d'actine, de grands cristaux bidimensionnels. La technique que nous avons mise au point permet la formation de cristaux bidimensionnels qui pourraient être utilisés pour l'étude des cristaux d'actine par microscopie à champ proche.

L'ensemble des résultats nous permet de proposer un mécanisme de formation des cristaux bidimensionnels de l'actine à la surface des lipides. Selon ce mécanisme, la formation de cristaux bidimensionnels se fait à partir d'imperfections membranaires qui servent de germes de cristallisation. De plus, le $MgCl_2$ joue un rôle clef en augmentant l'affinité de l'actine pour les lipides et l'attraction latérale entre les filaments d'actine.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de projet, le professeur Claude Raoul Gicquaud, pour toute l'attention et le support inestimable qu'il a su m'apporter tout au long de ce projet.

Je tiens également à remercier ceux qui ont contribué à ma formation et à mon ouverture sur le monde de la biophysique. Il s'agit plus précisément du Dr. Jean-Paul Chauvet de l'École Normale Supérieure de Lyon, du Dr. Bruno Berge du C.N.R.S. en spectrophysique de l'Université Joseph Fourier de Grenoble et du Dr. Pierre Tancrede de l'UQTR. Par ailleurs, je ne voudrais pas oublier le Dr. Marc Brullemans avec qui j'ai eu la chance d'échanger énormément sur le sujet des monocouches et des membranes.

J'aimerais remercier tous mes collègues du laboratoire qui ont su m'aider au cours des dernières années. Il s'agit de Jean Désilets, Hervé Junior Brisson, Hélène Hovington, Éleine Bizier, Agnès Lejeune, Dominique Pelletier, Louise Tessier, Louis Robert Villeneuve et Geneviève Coulombe.

Enfin, j'aimerais remercier mes amis en dehors de mon microcosme universitaire. Il s'agit de Jean-François Néron, Martin Bouchard, Christian *Jésus* Lalonde, Nathalie Côté, Germain Lachance et bien sûr, Denise Goulet.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABP	Actin Binding Protein
ACS	American Chemical Standard
Actine F	Actine filamenteuse
Actine G	Actine globulaire
ADP	Adénosine diphosphate
AFM	Atomic Force Microscopy
ATP	Adénosine triphosphate
DLPC	Dilaurylphosphatidylcholine
ÉNS	École Normale Supérieure
EYPC	Phosphatidylcholine de jaune d'oeuf
GRBM	Groupe de Recherche en Biotechnologie des Membranes
IgG	Immunoglobuline de type G
L.-B.	Langmuir-Blodgett
M.É.	Microscopie électronique
PM-IRRAS	Spectroscopie Infra-Rouge par Modulation de Polarisation
R.M.N.	Résonance Magnétique Nucléaire
SA	Stéarylamine
SDS	Dodécyl sulfate de sodium
STM	Scanning Tunneling Microscopy
ULV	Unilamellar vesicle
U.V.	Ultra violet

Liste des tableaux

<i>Tableaux</i>	<i>Description</i>	<i>Page</i>
<i>1</i>	Liste des principales protéines liant l'actine (ABP).	<i>2</i>
<i>2</i>	Composition du tampon G.	<i>27</i>
<i>3</i>	Quantité de filaments observés en microscopie électronique en fonction de la concentration d'actine incubée 60 minutes, sur une grille recouverte d'une bicouche de lipides (EYPC:SA [75:25]) de type-Y.	<i>86</i>
<i>4</i>	Quantité de filaments observés en microscopie électronique en fonction du temps et de la température d'incubation, pour une concentration d'actine de 100 µg/mL.	<i>88</i>
<i>5</i>	Quantité de filaments observés en microscopie électronique en fonction d'une concentration croissante de MgCl ₂ , en présence de 80 µg/mL d'actine après 60 minutes d'incubation.	<i>89</i>

Liste des figures

<i>Figures</i>	<i>Description</i>	<i>page</i>
<i>1</i>	Schéma montrant l'association d'un filament d'actine à la membrane plasmique via la ponticuline.	<i>3</i>
<i>2</i>	Schéma montrant la structure de l'actine G obtenue par diffraction des rayons X.	<i>4</i>
<i>3</i>	Schéma montrant le phénomène d'échange des nucléotides dans l'actine.	<i>7</i>
<i>4</i>	Schéma montrant la formation d'un cristal en solution.	<i>15</i>
<i>5</i>	Schéma représentant les deux modèles utilisés pour la cristallisation bidimensionnelle d'une protéine hydrosoluble.	<i>17</i>
<i>6</i>	Schéma montrant le comportement interfacial d'un lipide étalé sur une phase aqueuse.	<i>20</i>

7	Schéma montrant les différents mouvements des lipides dans une monocouche.	21
8	Électrophorèse de différentes préparations d'actine.	29
9	Schéma de la cuve en Téflon™ utilisée à Lyon.	30
10	Montage utilisé pour faire la microscopie électronique lors de l'étude d'interaction actine-lipides.	31
11	Représentation schématique d'un isotherme de l'acide stéarique à l'interface air-eau.	35
12	Schéma montrant le comportement des molécules amphiphiles après le collapse.	36
13	Schéma montrant le protocole suivi pour l'étude de l'interaction actine-lipides en monocouches.	38
14	Schéma montrant le protocole suivi pour l'observation, par microscopie électronique, de l'actine à l'interface.	40
15	Différents types de transferts utilisés pour la déposition de monocouches sur des supports solides.	42
16	Schéma montrant le transfert de films monomoléculaires (type-Y) de l'interface air-eau sur un support hydrophile selon la technique de Langmuir-Blodgett modifiée par Uzgiris.	43
17	Isothermes d'actine seule, de lipides seuls et de lipides étalés sur une sous-phase contenant des concentrations croissantes d'actine.	47
18	Différences d'aires moléculaires de films actine-lipides moins l'aire moléculaire des lipides seuls à $\pi = 10$ mN/m, en fonction de la concentration d'actine.	53
19	Schéma montrant notre interprétation de l'effet de la concentration d'actine s'adsorbant à l'interface.	54
20	Schéma expliquant la différence d'aire moléculaire de l'actine pour une même concentration à $\pi = 10$ mN/m, en absence (a) ou en présence de lipides (b).	54
21	Graphique montrant le travail de compression en fonction de la concentration d'actine.	55
22	Micrographie d'un film de DLPC:SA (70:30) à une aire moléculaire de 38 \AA^2 étalé sur une sous-phase contenant 3 mM de MgCl_2 en absence et en présence de 1,1 $\mu\text{g/ml}$ d'actine.	58

23	Structures formées à l'interface par l'actine en fonction de la quantité de lipides (DLPC:SA ([70:30]) étalés sur un tampon ne contenant pas de $MgCl_2$.	63
24	Structures formées à l'interface par l'actine en fonction de la quantité de lipides (DLPC:SA [70:30]) étalé sur un tampon contenant 3 mM de $MgCl_2$.	68
25	Micrographie montrant l'effet de différentes concentrations de $MgCl_2$ sur la polymérisation de l'actine au contact d'un film de lipides constitué de DLPC:SA (70:30) en excès d'un facteur 2.	74
26	Cristal bidimensionnel d'actine formé sur un film d'EYPC:SA (75:25) en excès d'un facteur 2.	80
27	Isothermes de différents mélanges EYPC:SA.	84
28	Réseaux cristallins d'actine obtenus par la méthode de L.-B. modifiée par Uzgiris	90
29	Réseaux cristallins d'actine obtenus par la méthode de L.-B. modifiée par Uzgiris	92
30	Schéma illustrant la méthode de l'arrachage.	97
31	Schéma montrant la méthode de changement de niveau	98
32	Schéma montrant l'effet possible qu'ont les multicouches sur la récupération des cristaux d'actine pour l'observation en microscopie électronique.	102
33	Schéma montrant une vue latérale de deux grilles de microscopie électronique recouvertes de Formvar™, d'une couche de carbone et d'une bicouche lipidique.	103
34	Schéma montrant différentes conformations que peut avoir une bicouche de lipides déposée sur un support solide.	104
35	Schéma montrant le mécanisme d'interaction actine-lipides proposé par St-Onge et Gicquaud.	106
36	Schéma d'un mécanisme de polymérisation de l'actine à la surface des lipides, en absence de $MgCl_2$.	107
37	Schéma d'un mécanisme de polymérisation de l'actine à la surface des lipides, en présence de 2 mM de $MgCl_2$.	108

CHAPITRE I: INTRODUCTION

1.1. Généralités sur l'actine

Depuis sa découverte dans le muscle strié dans les années '40, puis dans les cellules non musculaires dans les années '60, l'actine, protéine cytoplasmique qui se trouve dans toutes les cellules eucaryotes, est l'une des protéines les plus étudiées en biologie cellulaire. L'engouement pour l'étude de cette protéine s'explique par son implication dans de nombreuses fonctions cellulaires, dont trois principales: *la contraction musculaire, le maintien de l'architecture cytoplasmique et la motilité des cellules non musculaires* (Pollack 1990; Stossel 1994; Nodder & Martin 1997).

L'actine participe à un grand nombre de fonctions cellulaires en s'associant avec d'autres protéines qu'on appelle les protéines de liaison à l'actine ou ABP (de l'anglais *Actin Binding Protein*). C'est donc en partie l'association avec un type d'ABP qui permet à l'actine de jouer un rôle particulier dans la cellule.

Comme exemple d'ABP, citons la *profiline*. Cette protéine se lie aux monomères d'actine (actine G) et inhibe sa polymérisation en filaments (actine F). Cette association profiline-actine G permet à certaines régions du cytoplasme d'être peu visqueuse (état de sol). Par contre, lorsque la profiline est inhibée, l'actine peut polymériser et le cytoplasme devient visqueux (état de gel). La transformation (gel-sol) du cytoplasme est une étape clef de la motilité des cellules non musculaires. Le tableau 1 dresse une liste des principales protéines liant l'actine.

Tableau 1.

Liste des principales protéines liant l'actine (ABP) (Wolfe 1993; Comtois 1994; Maillet 1995; Schutt *et al.* 1995a).

Nom de la protéine	Source	Fonction
α -actinine	plupart des cellules	Lie l'actine au complexe taline-vinculine
Caldesmone	plupart des cellules	Se lie à la tropomyosine et à l'actine et empêche la formation d'actomyosine
Filamine	muscle lisse et macrophages	Assure la réticulation des filaments
Fimbrine	bordures en brosse	Lie les filaments pour former des faisceaux (fasciculation)
Fodrine	plupart des cellules	Lie les filaments d'actine les uns aux autres
Gelsoline	macrophages, cerveau, plasma et plaquettes	Induit la nucléation de l'actine, recouvre l'extrémité des filaments d'actine et fragmente les filaments
Myosine	plupart des cellules	Permet le glissement des filaments les uns par rapport aux autres
Myosine II	muscle	Responsable des mouvements de déplacement le long des filaments d'actine
Ponticuline	<i>Dictyostelium</i> et neutrophiles	Site de nucléation de l'actine sur les membranes
Spectrine	plupart des cellules	Ancrage latéral des filaments d'actine sur la membrane plasmique
Taline	muscle lisse et plaquettes	Lie l'actine à la membrane plasmique via la vinculine. Site de nucléation de l'actine
Tropomyosine	cellules musculaires et plupart des cellules	Contrôle l'interaction actine-myosine
Villine	bordures en brosse	Dépendant de la concentration en Ca^{2+} , elle permet la nucléation ou la fragmentation du filament d'actine
Vinculine	plupart des cellules	Lie l' α -actinine et la taline. Lie aussi l'actine directement à la membrane plasmique

Certaines ABP sont fixées aux membranes. Citons la ponticuline qui intervient, via sa portion cytoplasmique, dans l'ancrage latéral des filaments d'actine à la membrane plasmique (figure 1). Dans ce cas, la liaison de la ponticuline à l'actine contribue à la formation de pseudopodes (Luna *et al.* 1981; 1984; Wuestehube & Luna 1987).

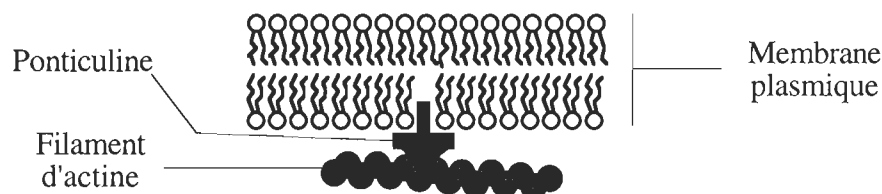


Figure 1.

Schéma montrant l'association d'un filament d'actine à la membrane plasmique via la ponticuline.

Le Groupe de Recherche en Biotechnologie des Membranes (GRBM) de l'Université du Québec à Trois-Rivières a mis en évidence une interaction entre l'actine et les lipides membranaires sans l'implication d'ABP. Ce groupe propose un modèle d'interaction électrostatique entre les lipides et l'actine. Cette interaction nécessite la présence des cations divalents comme le Mg^{2+} ou le Ca^{2+} (Rioux & Gicquaud 1985; Laliberté & Gicquaud 1988; St-Onge & Gicquaud 1988; 1990; Gicquaud 1995). Il existe donc deux possibilités d'interaction entre l'actine et les membranes: une interaction par l'intermédiaire de protéines et une interaction directe avec les lipides.

Les résultats obtenus par le GRBM montrent aussi que l'association de l'actine aux lipides membranaires conduit dans certains cas à la formation de cristaux

bidimensionnels d'actine à la surface des liposomes. Ces cristaux bidimensionnels sont constitués par des filaments juxtaposés et en phase.

Ces résultats ont orienté les travaux du GRBM vers deux objectifs: d'une part, identifier le rôle des interactions actine-lipides dans la cellule, et d'autre part, développer une méthode permettant de former des cristaux bidimensionnels d'actine pour en faire l'étude cristallographique.

1.2. Polymérisation de l'actine

L'actine existe sous deux formes: le monomère ou actine globulaire, appelé actine G et le polymère qui a une structure filamenteuse, appelé actine F.

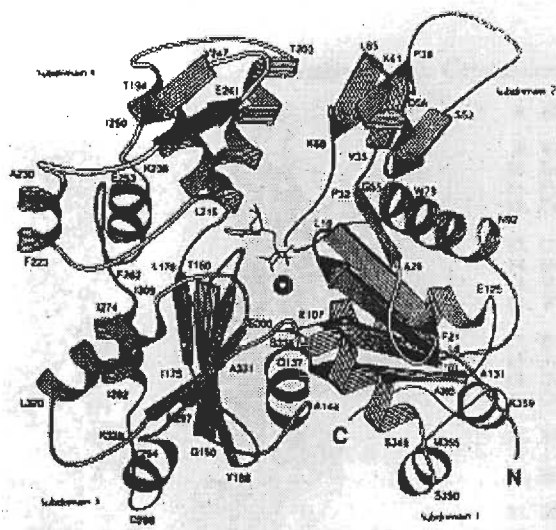


Figure 2.

Schéma montrant la structure de l'actine monomérique (actine G) obtenue par diffraction des rayons X (tiré de Mannherz 1992).

Le monomère, illustré à la figure 2, est composé d'une séquence de 375 acides aminés, et a une masse moléculaire de 42 kDa (Mannherz 1992). Il a une structure globulaire de 35 x 55 x 55 Å, organisée en deux domaines qui sont à leur tour subdivisés en deux sous-domaines (Darnell *et al.* 1986). Les deux domaines principaux sont réunis par un complexe cation-nucléotide, le Mg-ADP ou le Mg-ATP. En absence de cation divalent, l'actine se dénature. Le monomère d'actine possède une charge globale négative à pH neutre. Il a plusieurs sites de haute, moyenne et faible affinités pour les cations divalents.

L'actine F est composée de monomères disposés en deux brins qui s'enroulent pour former une double hélice. Cette double hélice a un diamètre de l'ordre de 7 nm et une longueur pouvant atteindre près de 1 µm. La périodicité ou le pas de cette hélice est de 37,5 nm.

Le mécanisme de polymérisation comprend trois étapes: *la nucléation, l'élongation et la phase stationnaire.*

1.2.1. La nucléation

La polymérisation de l'actine débute par la formation d'un nucléus constitué de trois monomères. La formation de ce nucléus résulte d'un changement de conformation des monomères, induit par les cations divalents, généralement le Mg²⁺ ou le Ca²⁺ qui se lient aux sites de moyennes affinités des monomères (Pollard 1986; 1990).



Le nucléus est un trimère. En effet, le nucléus doit être une structure stable à partir de laquelle croissent les filaments. Or les dimères sont instables car les liens entre deux monomères sont faibles. L'ajout d'un monomère au dimère augmente le nombre de liaisons entre les monomères, ce qui résulte en une structure plus stable.

1.2.2. L'élongation

L'élongation consiste en l'addition de nouveaux monomères à partir du nucléus, ce qui forme un filament.

Chaque nouveau monomère qui s'ajoute au filament contient un ATP. Cet ATP sera par la suite hydrolysé, mais avec un temps de latence. Durant la croissance du filament, les extrémités sont donc constituées de monomères actine-ATP et la partie centrale de monomères actine-ADP. On dit alors que le filament est *ATP-capped*. Le rôle du *cap* de monomères ATP est d'empêcher la dépolymérisation des extrémités car les monomères ATP-actine sont plus fortement liés au polymère que les monomères ADP-actine.

Lorsqu'il y a dépolymérisation, les monomères ADP-actine libérés vont échanger leur ADP avec l'ATP du milieu et redevenir des monomères ATP-actine (figure 3).

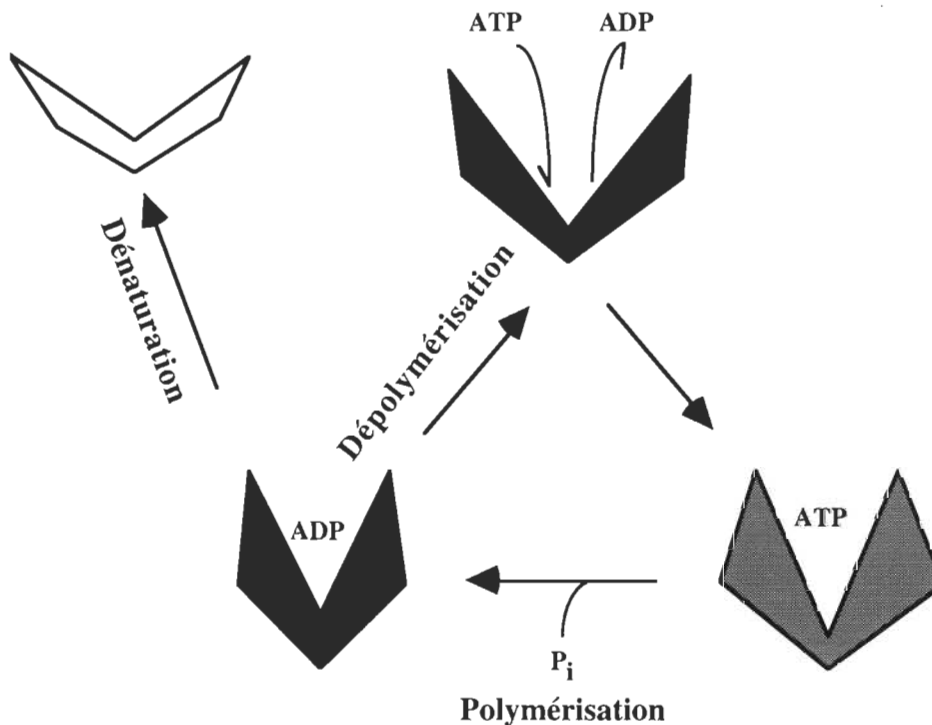


Figure 3.

Schéma montrant le phénomène d'échange de nucléotides de l'actine. On note qu'il existe des modifications dans la conformation du monomère au cours des échanges de nucléotides (tiré de Alberts *et al.* 1994, modifié).

1.2.3. Phase stationnaire

Les deux extrémités du filament ne sont pas identiques. Une des extrémités a plus d'affinité pour les monomères. C'est l'extrémité à croissance rapide ou *barbed end*. L'autre extrémité est l'extrémité à croissance lente ou *pointed end*.

Pointed end et barbed end sont définies par la décoration des filaments d'actine à l'*Heavy meromyosin* (HMM). L'HMM se fixe sur les filaments d'actine avec un certain angle. On obtient ainsi une structure dite en arête de poisson.

En conséquence, à l'équilibre, l'extrémité à croissance rapide va continuer à croître par addition de monomères ATP-actine. L'extrémité à croissance lente va libérer des monomères ADP-actine dans le milieu. Ce phénomène est appelé le *treadmilling*. Ainsi, il y a de part et d'autre du filament, pertes ou ajouts de monomères.

S'il n'y a plus d'ATP dans le milieu pour phosphoryler les monomères ADP-actine en ATP-actine, le *treadmilling* s'arrête.

1.3. Les structures de l'actine filamenteuse

L'étude de la structure d'une protéine est importante pour comprendre son fonctionnement. Connaître la structure de l'actine permettra de comprendre les nombreuses fonctions qui en dépendent. Cependant, la détermination de la structure de l'actine filamenteuse à l'échelle atomique n'a jamais été résolue pour différentes raisons, en particulier à cause de ses multiples conformations et surtout parce que cette protéine est difficile à cristalliser.

Les différents modèles atomiques proposés pour l'actine F ont été élaborés à partir de co-cristaux d'actine et de DNase ou de profiline. Les auteurs qui ont élaboré ces modèles, en arrivent à des structures différentes selon les techniques utilisées. Voici une courte revue de la littérature des modèles proposés pour l'actine F.

1.3.1. Modèle de Heidelberg de l'actine filamenteuse

Le nom de ce modèle est attribué en l'honneur de la ville allemande où ont été effectués les travaux qui ont conduit à ce modèle. Ce modèle de l'actine F fut élaboré par Holmes *et al.* (1990) à partir d'un patron de diffraction de rayons X d'un gel d'actine F orienté, stabilisé avec de la phalloïdine (Popp *et al.* 1987), ainsi que de la structure atomique de l'actine G obtenue par diffraction de cristaux de complexe DNase I:actine (Kabsch *et al.* 1990).

Dans l'élaboration de ce premier modèle, Holmes et ses collègues ont considéré l'actine G comme une structure rigide ayant une dimension de 35 x 55 x 55 Å. Par calcul de probabilités, les auteurs ont associé, de façon théorique, les monomères à différents angles de rotation jusqu'à ce que ceux-ci forment un filament. La structure théorique d'un filament a été obtenue en enlevant plusieurs séries d'acides aminés du monomère avec l'aide d'un logiciel de mutagenèse dirigée (Holmes *et al.* 1990).

Pour palier à la faiblesse de ce premier modèle, d'autres équipes ont par la suite repris les mêmes données initiales et élaboré un second modèle, mais cette fois en tenant compte des encombrements stériques et des forces d'interactions entre les monomères qui peuvent affecter les domaines du monomère au sein du filament (Lorenz *et al.* 1993; Tirion *et al.* 1995). Les auteurs ont utilisé de nouveaux logiciels possédant des algorithmes plus élaborés. Ils ont obtenu un filament formé par 13 molécules par demi-pas de 37,75 nm et dont le diamètre est de 9,5 nm. Ce filament est stabilisé par de nombreuses interactions entre les monomères qui sont détaillées par Tirion *et al.* (1995).

1.3.2. Modèle de transition ruban-hélice de l'actine filamenteuse

Ce modèle, très contesté, a été proposé par l'équipe de Schutt à partir de l'analyse des cristaux mixtes de profiline-actine (Schutt *et al.* 1989; 1993; 1994; 1995b). Selon ce modèle, les filaments d'actine existent sous deux conformations: la forme en double hélice et la forme en ruban, d'où le nom, modèle *transition ruban-hélice*. C'est la transition entre la conformation hélice et la conformation ruban qui serait à la base du mécanisme de la contraction musculaire.

1.3.3. Modèle de Egelman-Adròn de l'actine filamenteuse

Une critique qui est souvent formulée, concernant les modèles précédents, est qu'ils ont été élaborés à partir d'actine *in vitro*. Egelman & Adròn (1984) ont utilisé une stratégie complètement différente pour élaborer un modèle structural de l'actine filamenteuse. Les auteurs ont établi leur modèle à partir de patrons de diffraction des rayons X d'une fine section de muscle de grenouille (*Sartorius* sp.) au repos et de mesures directes, par microscopie électronique, à partir de filaments isolés.

Les résultats montrent que *in vivo*, le filament est une double hélice à droite (two right-handed) dont le pas est de 36 nm, que ce filament est fait de deux brins, constitués chacun de 13 monomères par tour qui se succèdent avec un angle de rotation de 166°. Le diamètre du filament est de 10 nm.

1.3.4. Modèle du “Fluttering Wings” ou du “doux battement d’ailes”

Ce modèle développé par l’équipe de Grazi veut d’abord répondre à une question: “Pourquoi le filament d’actine a des diamètres différents (entre 5 et 10 nm) selon la technique utilisée (Grazi 1997)?”.

Les travaux de Grazi montrent que le diamètre du filament d’actine varie avec la concentration d’actine (Grazi *et al.* 1993; 1994; Schwienbacher *et al.* 1995). L’équipe de Grazi explique ce phénomène par des influx et des efflux d’eau à travers le filament. Cette circulation d’eau ferait varier significativement l’orientation des monomères, leurs contacts, et par conséquent, leur conformation.

1.4. Les paracristaux d’actine

Pour déterminer la structure de l’actine F, il existe plusieurs méthodes. L’une d’elles consiste à fabriquer des paracristaux d’actine. Les paracristaux sont des structures constituées de filaments d’actine d’un diamètre de 7-8 nm, disposés parallèlement et en phase. Ils ont donc en général une périodicité transversale égale au pas de l’hélice soit 37 nm. Ces paracristaux se forment soit en solution, soit sur des surfaces donnant alors des cristaux de type bidimensionnel.

Il existe plusieurs hypothèses de mécanisme de la contraction musculaire. Connaître la structure du filament d’actine en détail permettra d’éliminer ou au contraire de renforcer certaines de ces hypothèses.

1.4.1. Paracrystaux obtenus en solution

Les premiers paracrystaux d'actine ont été obtenus par Hanson en 1967. Ces paracrystaux se forment lorsque l'actine est mise en présence d'une concentration de MgCl_2 supérieure à 20 mM.

Par la suite, Kawamura & Maruyama (1970) ont préparé trois types de paracrystaux (types I, II et III). Ces paracrystaux sont obtenus en mettant l'actine en présence de 0,1-0,2 M de KCl et 0,4 mM d'ATP dans un milieu à pH égal au point isoélectrique de l'actine (pH 4,5). Les paracrystaux de type I sont formés par recouvrement de filaments les uns sur les autres de façon périodique. Le type II se présente sous l'aspect d'un filet, c'est-à-dire que les filaments d'actine sont entrecroisés. Enfin le type III est semblable aux paracrystaux de Hanson.

Vers la fin des années '70, l'équipe de dos Remedios a obtenu des "microcristaux" d'actine en présence de fortes concentrations d'ions de la famille des Lanthanides, dont le gadolinium (Gd^{3+}) (dos Remedios & Dickens 1978; Barden *et al.* 1981a; 1981b). Ces microcristaux formés en présence de Gd^{3+} sont composés de monomères d'actine disposés en feuillet de façon très ordonnée. Ces microcristaux de dos Remedios possèdent une bonne résolution pour la diffraction électronique en raison de la forte cohésion modulaire. Néanmoins, ces cristaux ont été obtenus en présence d'ions Gd^{3+} , qui n'existent pas dans les cellules. La conformation de l'actine dans ces cristaux n'est probablement pas celle qui existe *in vivo*. L'analyse cristallographique n'a donc pas été poursuivie.

1.4.2. Cristaux bidimensionnels d'actine formés à la surface des lipides

Des cristaux bidimensionnels d'actine ont été faits à la surface de liposomes constitués de lipides chargés positivement (Laliberté & Gicquaud 1985) ou de lipides neutres en présence de $MgCl_2$ (St-Onge & Gicquaud 1990). L'idée de l'équipe de Gicquaud, d'utiliser des liposomes pour former des cristaux bidimensionnels d'actine à leur surface, est certes excellente, mais ces cristaux bidimensionnels ont une surface courbe. Cette technique a donc été modifiée par d'autres auteurs pour former des cristaux bidimensionnels plans.

Les équipes de Ward (1990) et de Taylor & Taylor (1992) ont fabriqué de tels cristaux bidimensionnels d'actine sous des monocouches de lipides chargés positivement à l'interface air-eau. Les résultats obtenus par ces équipes sont semblables à ceux de Gicquaud en termes d'organisation structurale du cristal. Cependant, bien que les structures cristallines obtenues soient planes et de grande surface, leur production est sujette à plusieurs aléas techniques que nous développerons à la section 1.5.3.

Les cristaux bidimensionnels de protéines constituent un matériel intéressant pour l'analyse cristallographique des protéines. En effet, grâce à de nouvelles techniques, la diffraction électronique combinée à la cryomicroscopie, il est possible de déterminer la configuration des protéines avec une bonne résolution (DeRosier & Klug 1968; Bremer *et al.* 1992; Chiu & Schmid 1997). De plus, à partir de cristaux bidimensionnels formés à l'interface air-eau ou lipides-eau, il est

possible d'obtenir des données cristallographiques sur les protéines en utilisant un faisceau à incidence rasante généré par un Synchrotron (Alkire & Rotella 1997).

1.5. Étude structurale des protéines

Connaître la structure d'une protéine est essentiel pour en comprendre les interactions avec le milieu et par conséquent, ses fonctions dans la cellule. La détermination de la structure des protéines est donc un domaine de recherche très important. Pour déterminer la structure des protéines, plusieurs techniques physiques ont été développées, en particulier la diffraction des rayons X, la résonance magnétique nucléaire (R.M.N.) et autres. Pour utiliser ces techniques, il est nécessaire d'avoir des échantillons de protéines très pures et/ou cristallisées.

La méthode la plus ancienne et la plus utilisée pour cristalliser une protéine consiste à la cristalliser en solution. Le cristal formé est composé de sous-unités qui interagissent entre elles (association modulaire) de manière cohérente et ordonnée en deux ou trois dimensions tel qu'illustré à la figure 4.

La diffraction des rayons X permet, à partir d'un cristal, de résoudre la structure de protéines à très hautes résolutions, c'est-à-dire à l'échelle atomique.

Cependant, l'obtention d'un cristal de protéine pour faire de la diffraction peut être extrêmement difficile et longue puisqu'il existe un grand nombre de paramètres comme la concentration en sels, la température, le pH,... qui influencent la cristallisation (Durbin & Feher 1996; Rosenbaum & Zukoski 1996). De plus, il n'est

pas toujours possible d'obtenir un cristal qui soit analysable par diffraction des rayons X, car certaines protéines ne cristallisent pas ou cristallisent mal (Rosenbaum & Zukoski 1996). C'est le cas de l'actine.

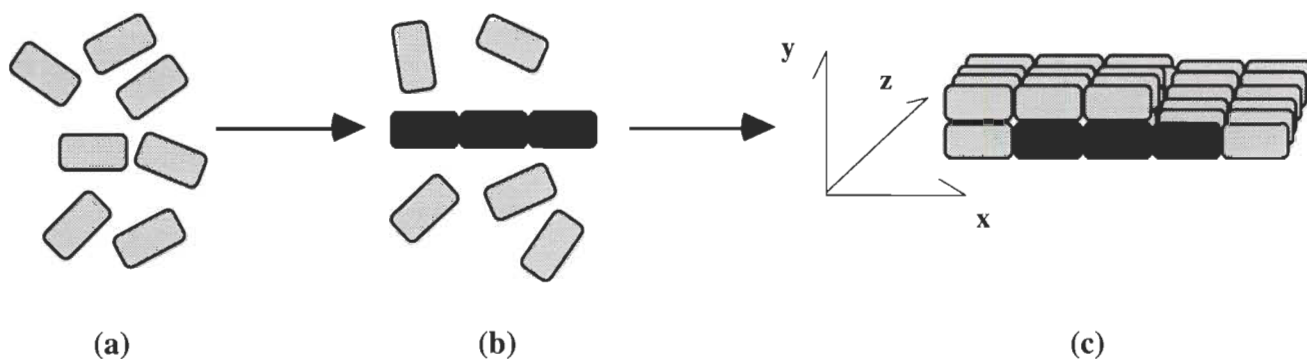


Figure 4.

Schéma montrant la formation d'un cristal en solution. En (a) on voit des monomères en solution. Après modification de certaines conditions (eg. concentration en sels), il se forme un germe de cristallisation (b). Enfin en (c), on voit la croissance d'un cristal dans les trois dimensions (x,y et z).

La créativité de certains chercheurs dont Uzgiris dans le début des années '80 a permis de développer une technique de cristallisation de protéines bien adaptée à certaines protéines, la cristallisation bidimensionnelle interfaciale.

1.5.1. La cristallisation bidimensionnelle interfaciale des protéines

Comme son nom l'indique, le cristal formé par cette technique va croître dans un plan, c'est-à-dire selon deux axes, en x et y, mais non en z. Les avantages que présente la technique de cristallisation bidimensionnelle interfaciale par rapport à la cristallisation classique sont importants et cette technique est maintenant utilisée par

de nombreux groupes de recherches à travers le monde. Les principaux avantages de cette technique sont les suivants.

Tout d'abord la quantité de protéine nécessaire est très faible. En effet, le cristal se forme sous une interface: il est peu épais et son volume est donc faible. Ainsi, pour des protéines difficiles à obtenir en grande quantité, quelques milligrammes seulement, voir même nanogrammes de protéines, seront suffisants (Newman 1991).

Le deuxième avantage de la cristallisation bidimensionnelle est le temps nécessaire pour cristalliser la protéine. Avec cette technique, on peut cristalliser en des temps courts, de l'ordre de quelques minutes (Reed *et al.* 1987; Ribí *et al.* 1988; Ward *et al.* 1989; Taylor & Taylor 1993) plutôt qu'en des temps pouvant excéder une dizaine de jours pour certaines techniques de cristallisation plus classiques (Wang *et al.* 1996).

Le troisième avantage est de permettre l'observation du cristal rapidement et très facilement par microscopie électronique après coloration négative ou, encore mieux, par cryomicroscopie (Bremer *et al.* 1992; Chiu *et al.* 1997). La microscopie donne une information rapide sur la morphologie et la cohésion du cristal. De plus, il est possible de reconstituer la structure du cristal en faisant de la diffraction électronique directement sur le négatif obtenu en microscopie électronique (DeRosier & Klug 1968).

La cristallisation bidimensionnelle peut se faire selon deux techniques: *sous une monocouche de lipides*, ou *par la technique de Langmuir-Blodgett sur support solide*.

1.5.1.1. Cristallisation bidimensionnelle de protéines sous une monocouche de lipides

La cristallisation bidimensionnelle sous une monocouche de lipides est sans aucun doute la technique la plus utilisée (pour une revue: Ahlers *et al.* 1990; Kornberg & Darst 1991; Newman 1991a; Jap *et al.* 1992). Cette technique consiste à injecter la protéine que l'on veut cristalliser sous une monocouche de lipides. Les protéines peuvent s'adsorber aux lipides, ce qui favorise les interactions entre les monomères de protéines et, par conséquent, leur cristallisation. Pour favoriser l'interaction protéines-lipides, on peut utiliser deux types de lipides: les lipides chargés ou les lipides fonctionnels (figure 5).

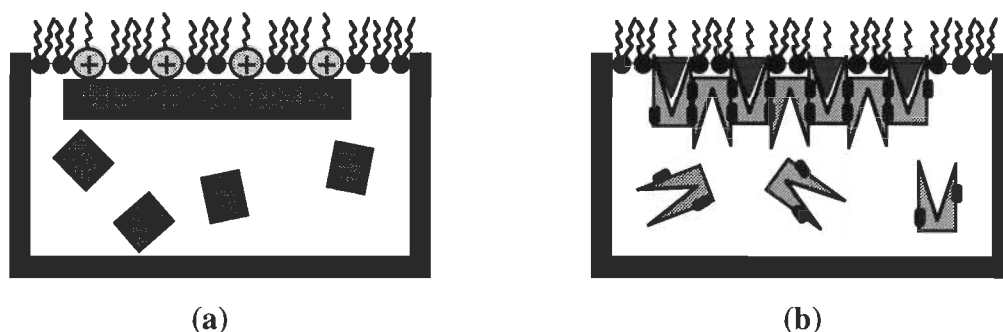


Figure 5. Schéma représentant les deux systèmes utilisés pour la cristallisation bidimensionnelle de protéines hydrosolubles. En (a) on voit une interaction non-spécifique de type électrostatique entre une membrane chargée positivement et une protéine de charge négative. En (b), on note une interaction de type spécifique entre une membrane constituée de lipides fonctionnels et une protéine (tiré de Jap *et al.* 1992, modifié).

L'utilisation de lipides chargés permet aux protéines dont la charge est contraire à celle des lipides de se lier par des interactions électrostatiques. On dit dans ce cas que les interactions protéines-lipides ne sont pas spécifiques. Plusieurs protéines ont été cristallisées de cette façon: l'aérolisine (Wilmsen *et al.* 1992; Parker *et al.* 1994),

l' α -actinine (Taylor & Taylor 1993), l'annexine (Brisson *et al.* 1991; Mosser *et al.* 1991b, Newman *et al.* 1991; Olofsson *et al.* 1994; Vogues *et al.* 1994), la créatine kinase (Schnyder *et al.* 1994), l'ARN polymérase (Darst *et al.* 1988; Darst *et al.* 1989; 1991a; Edward *et al.* 1990; Schultz *et al.* 1990; 1993; Asturias & Kornberg 1995), la sous-unité ribosomale 50S (Avila-Sakar *et al.* 1994), la toxine α (Olofsson *et al.* 1990; 1991; Ward & Leonard 1992) et l'actine F (Ward *et al.* 1990; Taylor & Taylor 1992; 1993).

Pour augmenter la spécificité de l'interaction lipides-protéines, on peut utiliser des lipides auxquels ont été greffés un ligand qui est spécifique à la protéine étudiée. Dans la littérature, on appelle ces lipides, des lipides fonctionnels. Plusieurs protéines ont été cristallisées de cette façon: l'IgG (Uzgiris & Kornberg 1983; Uzgiris 1985; 1986; 1987; 1990), l'avidine (Darst *et al.* 1991b; Liu *et al.* 1995; Avila-Sakar & Chiu 1996), l'ADN gyrase B (Lebeau *et al.* 1990; 1992; Schultz *et al.* 1990; Celia *et al.* 1994), le facteur de coagulation (Stoylova *et al.* 1994), la transcriptase inverse (Schultz *et al.* 1990; Kubalek *et al.* 1994), la toxine du choléra (Ludwig *et al.* 1986; Ribí *et al.* 1988; Mosser *et al.* 1991a; Cabra-Lilly *et al.* 1994) et la toxine du tétanos (Robinson *et al.* 1988).

Pour optimiser la cristallisation bidimensionnelle à l'interface lipides-eau, on doit être en mesure de contrôler certains paramètres. En particulier, il est important de suivre le comportement de la monocouche de lipides étalés à l'interface air-eau et qui interagit avec la protéine.

1.5.1.1.1. Les monocouches de lipides

Lorsqu'on dépose à l'interface air-eau des molécules amphiphiles comme des lipides, celles-ci s'assemblent pour former une monocouche (figure 6). On peut suivre le comportement interfacial de ces phospholipides avec une cuve de Langmuir munie d'une barrière mobile. En comprimant latéralement les molécules à l'aide de cette barrière, on peut faire varier la pression de surface (π) et mesurer les variations de tension de surface à l'aide d'une plaque de Whilhelmy reliée à une balance. En mesurant la variation de pression de surface (π) en fonction de l'aire moléculaire (A) de la monocouche de lipides, on obtient l'isotherme de π en fonction de A . L'aire moléculaire est définie comme étant l'aire du bain divisée par le nombre de molécules déposées à la surface.

Par cette technique, il est possible de mesurer l'interaction d'une protéine avec une monocouche de lipides. Si à une aire fixe, la pression de surface (π) d'un lipide augmente après injection d'une protéine en sous-phase, on peut conclure que la protéine pénètre, en tout ou en partie dans la portion hydrophobe du film (pour une revue: Verger & Pattus 1982). Au contraire, une protéine qui interagit par liaison électrostatique avec la tête polaire des lipides d'une monocouche provoquera une variation négligeable de la pression de surface (Newman 1991).

L'interaction d'une protéine avec les lipides peut augmenter la rigidité de la monocouche. En effet, lorsque l'on comprime un film de lipides seuls et un film de lipides avec une protéine, les molécules de lipides en interaction avec les molécules de protéine requièrent plus d'énergie pour être comprimées. Il est possible de calculer cette énergie en mesurant le travail de compression (W_c) à partir d'un

isotherme. Le travail de compression peut être calculé à partir de l'aire sous la courbe de l'isotherme.

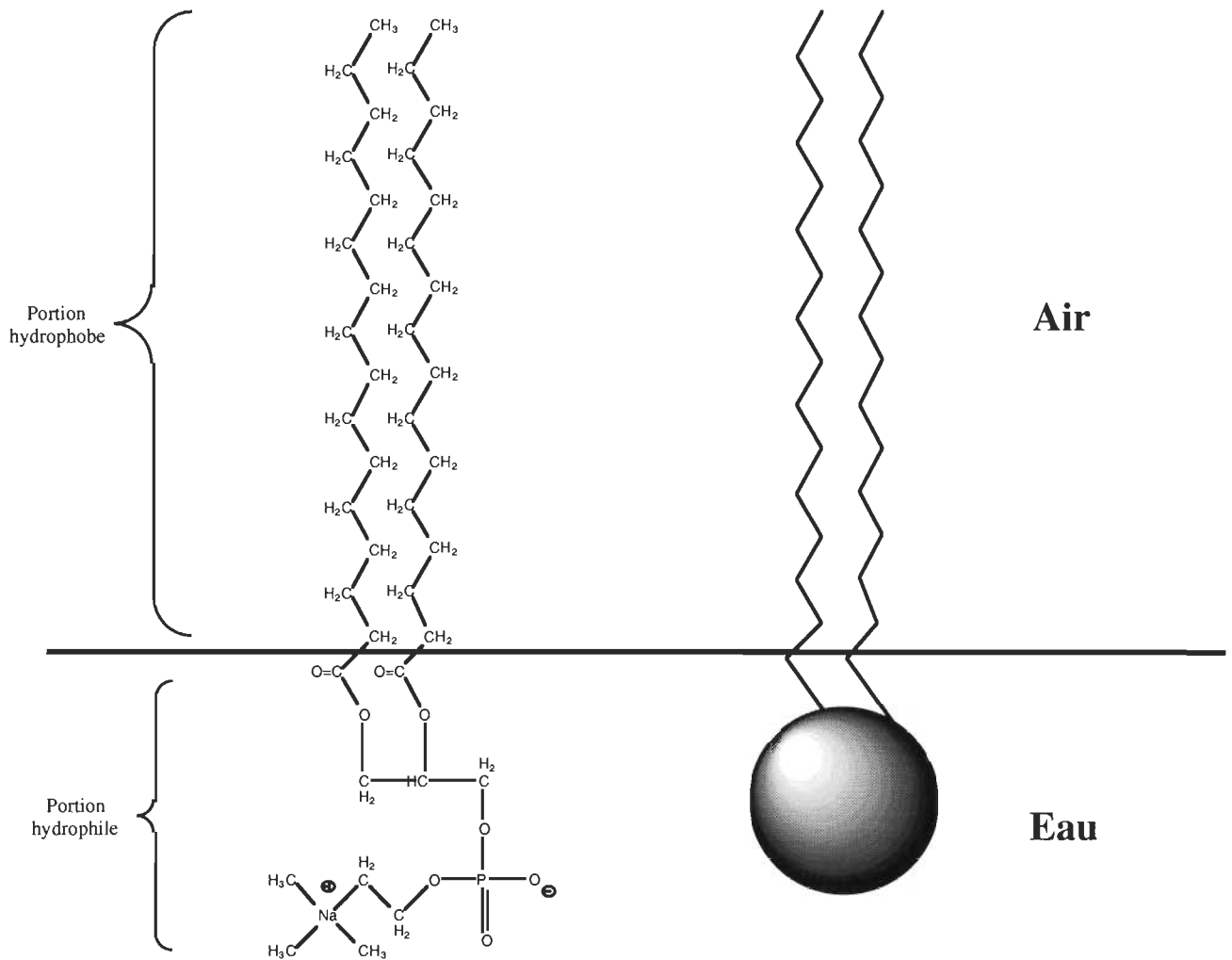


Figure 6.

Schéma montrant le comportement interfacial d'un lipide, molécule amphiphile, étalé sur une sous-phase aqueuse. On peut noter que sa queue hydrophobe se met dans l'air et la tête polaire reste dans l'eau (tiré de Pigeon 1992, modifié).

1.5.1.1.2. Cristallisation bidimensionnelle des protéines sous une monocouche de lipides

La cristallisation d'une protéine sous une monocouche de lipides se produit en deux étapes. Premièrement, il faut que la protéine forme un germe de cristallisation. Deuxièmement, les monomères de la protéine doivent s'associer (association modulaire) pour permettre la croissance du cristal. Cette association modulaire est favorisée par la mobilité latérale des lipides dans la monocouche tel qu'illustré à la figure 7. Une plus grande mobilité latérale des lipides favorise un meilleur arrangement modulaire des protéines (Ward *et al.* 1990; Mosser & Brisson 1991; Newman 1991a; Jap *et al.* 1992; Taylor & Taylor 1993).

Selon plusieurs auteurs, la qualité du cristal de protéine est reliée à la fluidité de la monocouche. Cette fluidité dépend des lipides qui composent la monocouche. La présence de chaînes aliphatiques courtes et/ou des insaturations de chaînes donne des films plus fluides.

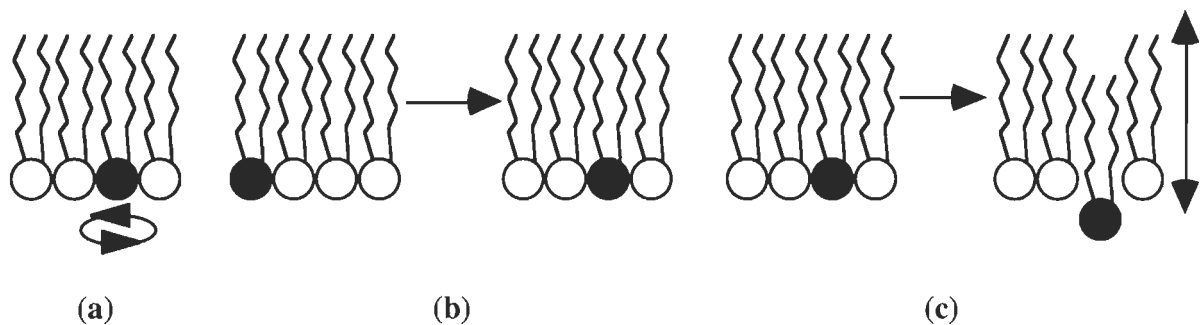


Figure 7.

Schéma montrant les différents mouvements des lipides dans une monocouche. En (a) on voit un mouvement de rotation, en (b) un mouvement latéral et en (c), un mouvement de cisaillement.

Outre ces avantages par rapport aux méthodes de cristallisation classiques en solution mentionnées précédemment (section 1.4.), la cristallisation bidimensionnelle à l'interface de lipides permet de faire aussi certaines analyses des cristaux de protéines directement à l'interface.

Trois techniques sont couramment utilisées: l'infra-rouge par modulation de polarisation (PM-IRRAS) (Dluhy *et al.* 1988; Flach *et al.* 1994; 1996; Mendelsohn *et al.* 1995), la microscopie à angle de Brewster (Hénon & Meunier 1992) et la diffraction des rayons X en incidence rasante au Synchrotron (Alkire & Rotella 1997).

1.5.2. La technique de Langmuir-Blodgett

La technique de Langmuir-Blodgett fut développée par Katarina Blodgett au milieu des années '30 (Roberts 1990). Cette technique consiste à transférer sur un support plan solide (*eg.* verre, mica,...) une ou plusieurs monocouches de molécules amphiphiles, à l'interface air-eau.

La cristallisation bidimensionnelle sur un support solide a été développée par Uzgiris (1986) pour cristalliser l'IgG. La technique d'Uzgiris est simple. Elle consiste à faire cristalliser la protéine directement sur une grille de microscopie électronique rendue hydrophile par un traitement aux rayonnements U.V., et sur laquelle a été transférée une bicouche de lipides qui ont des affinités pour la protéine. Selon cet auteur, cette technique permet d'obtenir des cristaux de meilleure qualité et de plus grande superficie, tout en utilisant une plus petite quantité de

protéines. Cette technique de Uzgiris permet de faire rapidement des préparations pour la microscopie électronique. Il est aussi possible de faire, sur ces préparations, de la microscopie à champ proche (STM-AFM) ce qui peut apporter des informations sur l'organisation et la structure des protéines. Par rapport à la microscopie électronique, la microscopie à champ proche a l'avantage d'étudier les protéines dans des conditions plus proches de celles qui existent *in vivo* (Ohnishi *et al.* 1996; Vélez *et al.* 1996). Par contre, la résolution est moins bonne qu'en microscopie électronique.

Il est aussi possible d'étudier, par ellipsométrie, l'orientation de certaines protéines dans une monocouche. Cette méthode fut développée avec succès pour l'IgG, suite aux travaux d'Uzgiris, par Tronin *et al.* (1995; 1996).

L'étude structurale d'une protéine sur support solide n'est qu'une infime partie des possibilités qu'offre la technique de Langmuir-Blodgett pour les protéines. Selon Petty (1992), l'étude du transfert sur support solide des protéines est un important progrès dans le domaine des nanotechnologies, et peut être utilisée pour développer les biosenseurs et les puces informatiques.

1.5.3. Petite histoire de la cristallisation bidimensionnelle de l'actine

La première équipe à cristalliser l'actine sur une surface de lipides est celle de Gicquaud. Comme nous l'avons mentionné dans la section 1.4.2., l'équipe de Gicquaud a obtenu des structures organisées d'actine sur des liposomes. Cependant les liposomes sont des surfaces courbes. Or, tel que mentionné plus haut, certaines

techniques et certaines applications (section 1.5.1. et 1.5.2.) ne sont pas utilisables avec des cristaux bidimensionnels courbés.

Dans cette perspective, Ward *et al.* (1990) puis Taylor & Taylor (1992) ont fabriqué les premiers cristaux bidimensionnels d'actine sous un film de lipides qui a l'avantage d'être plan. Les films préparés par Taylor & Taylor étaient chargés positivement par ajout d'ammonium quaternaire. Les deux équipes ont mentionné que des monocouches fluides sont nécessaires pour l'obtention de cristaux de qualité. D'autre part, comme l'ont noté plusieurs auteurs (Mosser *et al.* 1991; Jap *et al.* 1992), la cristallisation ne se produit que s'il y a un excès de lipides. Taylor & Taylor (1992) et Jap *et al.* (1991) ont justifié la nécessité d'un excès de lipides en reprenant l'explication de Mosser *et al.* (1991) qui avaient suggéré que l'excès de lipides forme une *goutte réservoir* qui permet de remplacer les molécules de lipides perdus sur les bords du bain.

L'étude de la cristallisation bidimensionnelle de l'actine à l'interface lipides-eau n'en est qu'à ses débuts car il n'y a eu aucune étude systématique pour optimiser ce système de cristallisation bidimensionnelle de l'actine. En effet, les auteurs n'ont que peu considéré le rôle des charges positives dans les films de lipides, le rôle des cations en sous-phase, ainsi que l'importance de l'excès de lipides. Ainsi, les conditions de cristallisation bidimensionnelle de l'actine ne sont pas bien définies. Enfin, pour ce qui est de la cristallisation bidimensionnelle de l'actine sur support solide, aucune étude sur le sujet n'a encore été envisagée.

1.6. Objectifs du projet de recherche

L'objectif général de notre projet de maîtrise vise à améliorer les techniques de formation de cristaux bidimensionnels d'actine, étape qui est un prérequis aux études de diffraction.

Dans une première partie, nous ferons une étude systématique des interactions actine-lipides en monocouche à l'aide d'une cuve à barrière mobile (méthode de Langmuir). Nous utiliserons la microscopie électronique pour visualiser les structures obtenues.

Dans une deuxième partie, nous mettrons au point une nouvelle technique de formation de cristaux bidimensionnels d'actine. Cette technique, inspirée de la méthode de Langmuir-Blodgett modifiée par Uzgiris (1986), sera comparée à la technique plus traditionnelle de cristallisation bidimensionnelle sous un film de lipides.

CHAPITRE II: MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Matériel

2.1.1. Produits utilisés

Les lipides (EYPC, DLPC, et SA) proviennent de Sigma Chemical Co. (St-Louis, Mo, USA) et sont utilisés sans aucune purification.

Les solvants d'étalement (hexane et éthanol) sont de grade spectrophotométrique, et proviennent de la compagnie Anachemia (Montréal, Québec). Les solvants sont redistillés.

L'eau déminéralisée est distillée, puis filtrée à l'aide d'un système Sybron/Barnstead modèle Nanopure (Boston, MA, USA). Elle a une résistivité supérieure à 18 Mohm-cm. Cette eau nanopure est par la suite redistillée juste avant usage dans un système à double distillation en quartz (Heraus Quarzschmelze, modèle Bil 8 T Hanau, Allemagne). La tension superficielle de l'eau doit être supérieure à 71 mN/m.

Les autres produits utilisés sont de grade ACS et proviennent des compagnies Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, USA), Fisher Scientific (Ontario, Canada) et Sigma Chemical Co. (St-Louis, Mo, USA).

2.1.2. Solutions tampons

Le tampon G permet de maintenir l'actine à l'état monomérique. La composition du tampon G est présentée dans le tableau suivant:

Tableau 2.
Composition du tampon G

Constituants	Concentration finale
Tris-HCl	2 mM
CaCl ₂	0,2 mM
Mercaptoéthanol 98%	0,5 mM
Azide de Na	0,01g/100 mL
ATP	0,2 mM

Le pH du tampon est ajusté à pH 7,5 avec du HCl de grade "chimique" à l'aide d'un pH-mètre HI 8416 (Hanna Instruments) muni d'une électrode de verre Cole Parmer (Niles, Illinois).

2.1.3. Préparation de l'actine

L'actine est extraite à partir de la poudre acétonique de muscle strié de lapin. La préparation de la poudre acétonique a été décrite à l'origine par Feuer *et al.* (1948). Pour connaître la façon dont la poudre acétonique a été produite par notre laboratoire, le lecteur peut se référer à Pigeon (1992).

L'actine est extraite de la poudre acétonique par la méthode de Spudich & Watt (1971). Cette méthode consiste à purifier l'actine par des cycles de polymérisation/dépolymérisation. Cette procédure, d'usage courant dans notre laboratoire, est décrite en détail par Pigeon (1992).

La concentration de l'actine est déterminée par spectrophotométrie U.V. à 290 nm, longueur d'onde correspondant à l'absorption du tryptophane. Sachant que le coefficient d'extinction molaire est: $\epsilon^{290}=0,63 \text{ ml}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Lehrer & Derwar 1972), on peut déterminer la concentration de l'actine en utilisant simplement la relation de Beer-Lambert ($A = \epsilon bc$).

L'actine est toujours conservée à l'état monomérique dans le tampon G à 0°C pour un maximum de six jours. L'actine G est polymérisée en actine F par addition de MgCl_2 à concentration finale de 2 mM.

2.1.3.1. Contrôle de la pureté de l'actine

La pureté des préparations d'actine est contrôlée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-sulfate dodecyl de sodium 12% (SDS-Page) avec un appareil Protean II (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA). Nous avons utilisé une série de protéines d'étalonnage de faible poids moléculaire (LMW) qui provient de la compagnie Pharmacia Fine Chemicals. La révélation se fait au bleu de Coomassie.

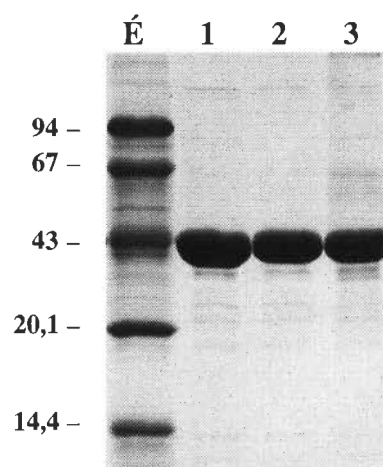


Figure 8.

Électrophorèse de différentes préparations d'actine. Dans le puits gauche (É), on voit des protéines d'étalonnage. Dans les puits 1, 2 et 3, il y a trois préparations différentes d'actine. Chacun des puits contient 10 µg de protéines.

L'électrophorèse montre, dans les puits 1, 2 et 3, une bande principale à ~45 kDa qui est l'actine. Cette bande montre que l'actine représente plus de 95% du matériel retrouvé sur le gel.

2.1.4. Cuves en Téflon™ utilisées pour faire des monocouches

Au cours de cette étude, nous avons utilisé trois types de cuves:

1. Pour l'étude de l'interaction actine-lipides en monocouche, nous avons utilisé, à l'ÉNS de Lyon, une cuve rectangulaire en Téflon™ de 13,01 x 45,65 cm (aire maximale 593,95 cm²) et d'une profondeur de 16 mm (volume maximal de 1005 cm³). Cette cuve schématisée à la figure 9 possède une barrière mobile en Téflon™. Elle est munie de trois agitateurs disposés en V à environ 12 cm les

uns des autres afin d'homogénéiser les produits injectés en sous-phase. La tension de surface est mesurée à l'aide d'une plaque de Whilelmy reliée à une balance microanalytique. La température de la cuve est maintenue à 20°C.

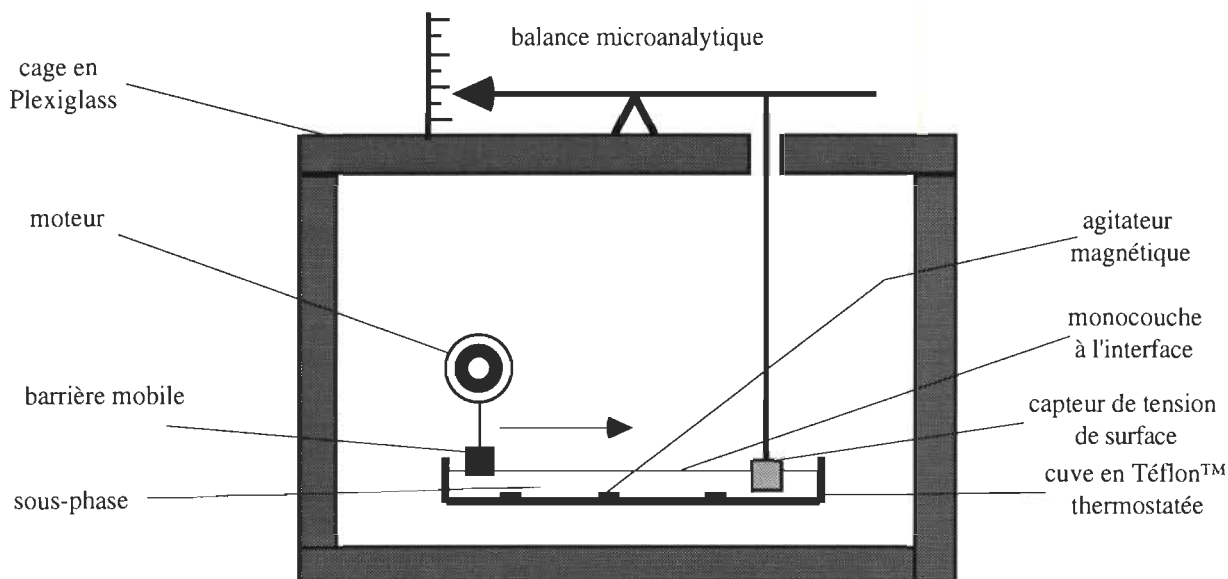


Figure 9.
Schéma de la cuve en Téflon™ utilisée à l'ÉNS de Lyon.

2. Pour l'étude en microscopie électronique, nous avons utilisé des cuves rectangulaires en Téflon™ à aire fixe de 3,18 x 6,0 cm (aire 19,05 cm² ou 1,905 E 17 Å²) et d'une profondeur de 0,42 cm (volume maximal de 8 cm³). Pour homogénéiser la sous-phase, un agitateur magnétique est placé dans une dépression au fond de la cuve. Les cuves sont maintenues dans des chambres humides.
3. Pour la technique de Langmuir-Blodgett modifiée par Uzgiris, nous avons utilisé une cuve en Téflon™ circulaire à aire fixe. Cette cuve a un diamètre de 6 cm (aire de 28,27 cm² ou 2,83 E 17 Å²) et possède un volume total de 21,0 cm³.

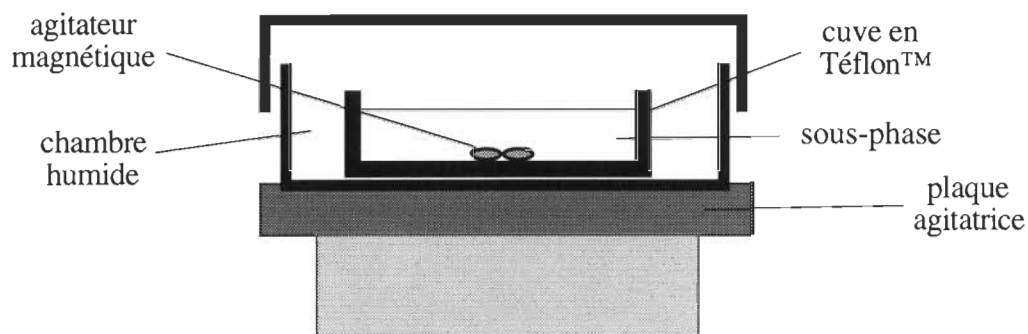


Figure 10.

Montage utilisé pour faire les préparations de microscopie électronique lors de l'étude d'interaction actine-lipides.

Les cuves sont nettoyées quotidiennement au chloroforme puis à l'eau nanopure. Après nettoyage, la tension superficielle de l'eau nanopure doit être supérieure à 71 mN/m. Chaque semaine, les cuves sont traitées une nuit dans l'acide sulfurique concentré activé par le *NoChromix*[™] (Godax Laboratories Inc., New-York). Après ce traitement à l'acide oxydant, les cuves sont transférées durant environ deux heures dans un bécher qui contient une solution d'hydroxyde de sodium (1M). Enfin, pour éliminer tout résidu acide, les cuves sont abondamment rincées à l'eau déminéralisée durant au moins une heure. Ce nettoyage permet d'éliminer toute trace de contamination organique.

2.1.5. Les solvants d'étalement

Au cours de ce travail, nous avons utilisé pour l'étalement des lipides à l'interface un mélange hexane:éthanol (9:1; v:v). Ce mélange solubilise facilement les lipides, est non miscible à l'eau, et possède l'avantage de s'évaporer très rapidement. Il reste donc peu de solvant résiduel emprisonné entre les chaînes aliphatiques des phospholipides. Par ailleurs, ce solvant d'étalement a une densité plus faible que le

chloroforme, solvant qui est parfois utilisé pour l'étalement des lipides. Ce point est important puisque lorsqu'on étale des lipides dissous dans le chloroforme, la goutte de chloroforme peut couler au fond de la cuve entraînant du même coup une quantité importante de lipides en sous-phase. En utilisant un solvant de faible densité comme le mélange hexane:éthanol, on évite l'effet d'entraînement de lipides en sous-phase par le solvant.

2.1.6. Support informatique utilisé

Les données des expériences actine-lipides en monocouche sont enregistrées par un ordinateur de type PC. Le traitement ultérieur des données a été fait à l'aide des logiciels Igor Pro v.3.01™ et Kaleida Graph™ sur interface Macintosh (PowerPC 7600/132).

2.2. Méthodes

2.2.1. Étude des interactions actine-lipides en monocouche

2.2.1.1. Préparation des films de lipides

L'épandage de molécules amphiphiles comme les lipides à l'interface air-eau conduit à la formation d'une couche monomoléculaire. Ces molécules de lipides s'organisent de telle sorte que leurs têtes polaires hydrophiles restent dans l'eau et les chaînes aliphatiques, non polaires ou hydrophobes, s'orientent vers l'air.

Le nombre de molécules déposées sur une surface donnée nous permet de calculer l'aire occupée par une molécule (A), exprimée en Å²/molécule selon l'équation:

$$A = \frac{L \cdot l}{a \cdot N} \quad (2.4)$$

où L est la longueur et l est la largeur de la cuve. a correspond au nombre de moles déposées à l'interface et N au nombre d'Avogadro (6,023 E 23 molécules).

2.2.1.2. Mesure de la pression de surface

La mesure de pression de surface est à la base de la caractérisation de la monocouche. Cette mesure peut informer sur la stabilité (Boyle III & Mautone 1982), l'orientation des molécules dans un système bidimensionnel (Tronin *et al.* 1995; 1996) et enfin, sur les changements éventuels de conformation moléculaire (Chen *et al.* 1997). La pression de surface est mesurée par la méthode de Whilhelmy. Cette méthode consiste à mesurer, à l'aide d'une balance, la force verticale qu'exerce la tension de surface sur une lame mouillable de platine ou de papier filtre, légèrement immergée dans la sous-phase. La pression de surface d'un film monomoléculaire s'exprime par l'équation suivante:

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad (2.5)$$

où γ_0 est la tension superficielle de l'eau ou du tampon et γ , la tension superficielle après étalement des molécules amphiphiles. π et γ représentent une force par unité de longueur et sont exprimées en mN/m. Pour trouver γ , on peut utiliser l'équation suivante (Gaines 1966):

$$\gamma = \frac{mg + (\rho_L - \rho_G)gelh}{2(1 + e)\cos\theta} \quad (2.6)$$

où, γ = tension superficielle à l'interface air-eau ($N \cdot m^{-1}$)
 m = masse de la lame avant (γ_0) ou après mouillage (γ) (kg)
 g = accélération gravitationnelle ($m \cdot s^{-2}$)
 ρ_L = masse volumique du liquide ($kg \cdot m^{-3}$)
 ρ_G = masse volumique du gaz ($kg \cdot m^{-3}$)
 e = épaisseur de la lame (m)
 l = largeur de la lame (m)
 h = hauteur immergée de la lame (m)
 θ = angle de mouillage du liquide sur la lame ($^\circ$)

2.2.1.2.1. L'isotherme de pression de surface en fonction de l'aire par molécule (π -A)

Les isothermes de pression de surface représentent la pression de surface (π) en fonction de l'aire moléculaire (A). Lorsqu'on réduit la surface qu'occupent les molécules à l'interface, l'aire moyenne occupée par une molécule (A) diminue. Les molécules sont de plus en plus rapprochées ce qui augmente leurs interactions. Ainsi, pour un lipide, cette augmentation de cohésion produit une augmentation de la pression de surface, ce qui se fait en plusieurs phases, soit la phase gazeuse (G), liquide expansé (L1), liquide condensé (L2) et solide (S).

La phase gazeuse (G) est observée à de grandes aires moléculaires. Les molécules ont peu ou pas d'interaction. Elles s'entrechoquent aléatoirement. Les phases L1 et L2 apparaissent lorsqu'il y a des interactions entre les chaînes aliphatiques. Ces interactions sont de type Van der Waals. Enfin, la phase S correspond au moment où les molécules à l'interface ont une forte cohésion et sont très organisées. Les têtes polaires sont alors orientées par des liaisons hydrogènes. Cette phase correspond à l'aire d'une molécule dans la monocouche.

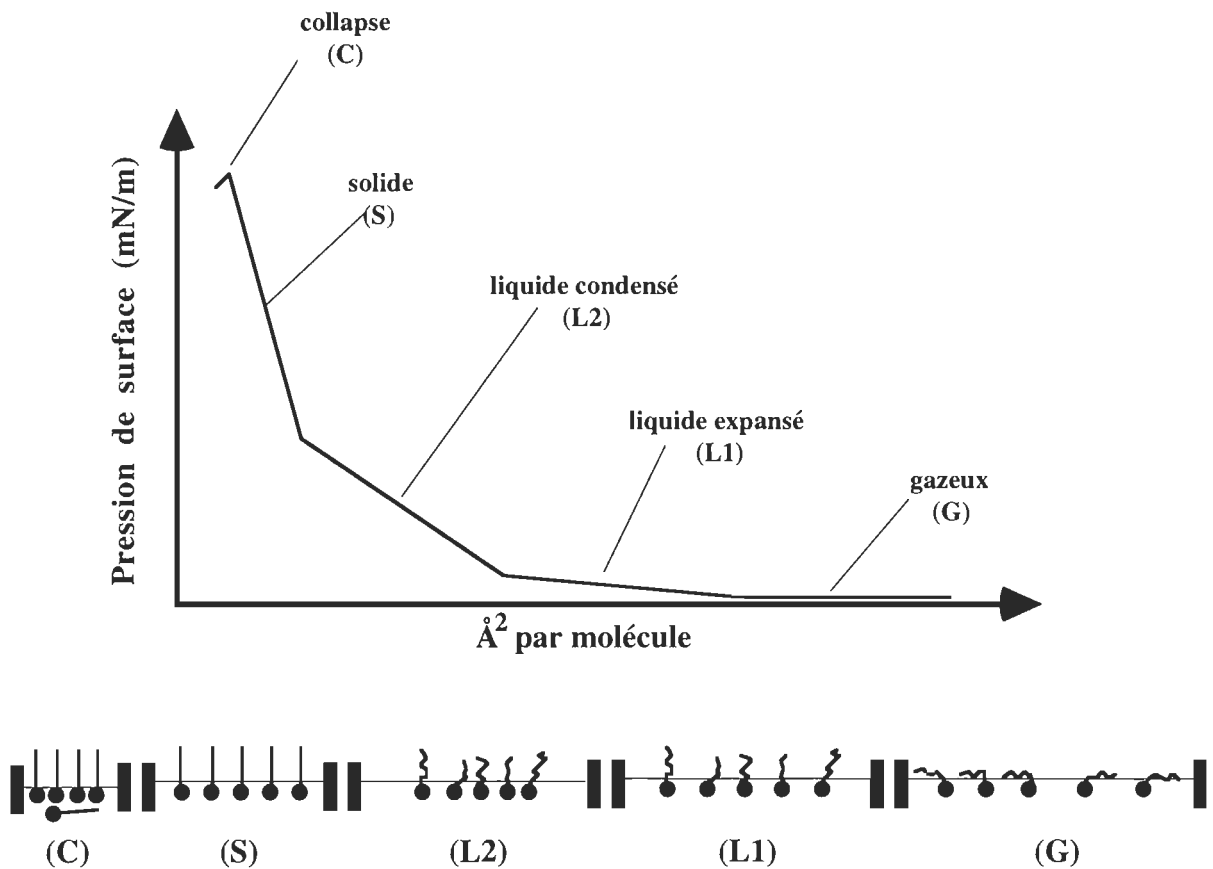


Figure 11.

Représentation schématique d'un isotherme de l'acide stéarique à l'interface air-eau: état non organisé ou phase gazeuse (G), partiellement comprimé ou L1 et L2, état comprimé où les molécules sont dans un état organisé (S) et collapse conduisant à une plongée de lipides en sous-phase (C) (tiré de Roberts 1990, modifié).

La dernière phase, lors de la compression, est le collapse (C), ou désorganisation du film monomoléculaire. Le collapse se produit lorsque l'aire du bain est trop faible pour contenir toutes les molécules en surface. Certaines molécules vont donc être expulsées en sous-phase. Le collapse dépend de la structure des molécules, de la longueur des chaînes aliphatiques et de leur insaturation, de la température, des sels en sous-phase, du pH de la sous-phase et de la vitesse de compression (Tazi 1996).

Les molécules amphiphiles, comme les lipides excédentaires qui sont expulsées en sous-phase, ont tendance à s'organiser. Il se forme alors des hémimicelles, des micelles ou des liposomes selon la quantité et la nature des molécules en excès tel qu'illustré à la figure 12.

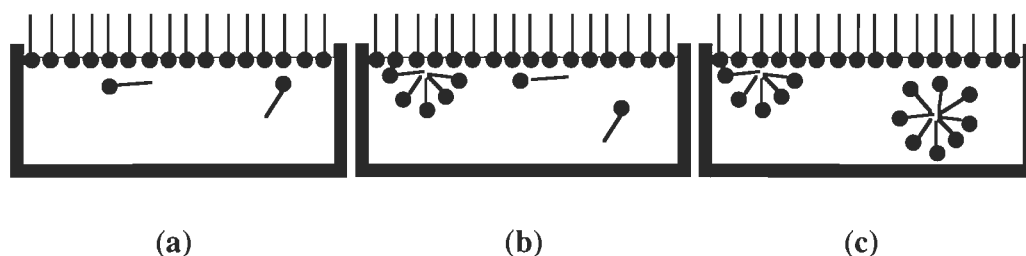


Figure 12.

Schéma montrant le comportement des molécules amphiphiles lors du collapsus. (a) Au début, quelques molécules vont en sous-phase. Lorsque l'on continue la compression, où que l'on ajoute des molécules à l'interface, les molécules vont en sous-phase jusqu'à l'apparition d'hémimicelles (b) et de micelles (c).

On peut calculer le nombre de molécules qui sont passées en sous-phase en connaissant l'aire moléculaire à laquelle se produit le collapsus. Par exemple, si un lipide possède une aire moléculaire de 40 \AA^2 et que l'on dépose un nombre de molécules pour saturer l'interface, on ne parle pas d'excès. Par contre, si pour le même lipide on dépose une quantité de lipides deux fois plus grande, alors on parle d'une quantité excédentaire de lipides d'un facteur deux.

2.2.1.2.2. Mesure du travail de compression (W_c)

Le travail de compression (W_c) est donné par l'équation 2.6.

$$W_c = \int_{initial}^{final} \Pi dA \quad (2.6)$$

L'énergie nécessaire pour comprimer le film augmente en fonction des interactions qui se produisent entre les molécules qui forment le film ou entre le film et les

molécules, par exemple les protéines, en sous-phase. Une augmentation du travail de compression nous indique une augmentation des interactions entre les molécules qui composent la monocouche.

2.2.1.3. Étude des interactions actine-lipides en monocouches

Cette partie du travail a été réalisée à l'École Normale Supérieure de Lyon (France) à l'aide d'une cuve de Langmuir à barrière mobile dont les caractéristiques ont été décrites à la section 2.1.4.

Le protocole pour l'étude des interactions actine-lipides en monocouches est schématisé à la figure 13.

Dans la première étape, en **(a)** sur la figure 13, les lipides (DLPC ou DLPC:SA [70:30]), dissous dans l'hexane:éthanol (9:1), sont étalés goutte à goutte à l'interface, à l'aide d'une seringue Hamilton™. Après évaporation du solvant, la monocouche est comprimée puis décomprimée à une vitesse de 50 mm²/seconde. Nous obtenons ainsi l'isotherme du lipide seul.

Dans une deuxième étape, en **(b)** sur la figure 13, l'actine est injectée en sous-phase puis agitée durant 15 minutes. Après la période d'homogénéisation, un deuxième isotherme est tracé, dans les mêmes conditions que pour le lipide seul.

La même procédure est répétée en ajoutant des quantités croissantes d'actine en sous-phase pour obtenir des concentrations finales d'actine de 0.088, 0.27, 0.547 et 1.1 µg/ml. Toutes les expériences ont été faites dans le tampon G soit en absence de

MgCl₂, c'est-à-dire dans des conditions où l'actine est monomérique, soit en présence de 3 mM de MgCl₂, c'est-à-dire dans des conditions où l'actine est polymérisée. Chaque expérience a été faite au moins trois fois.

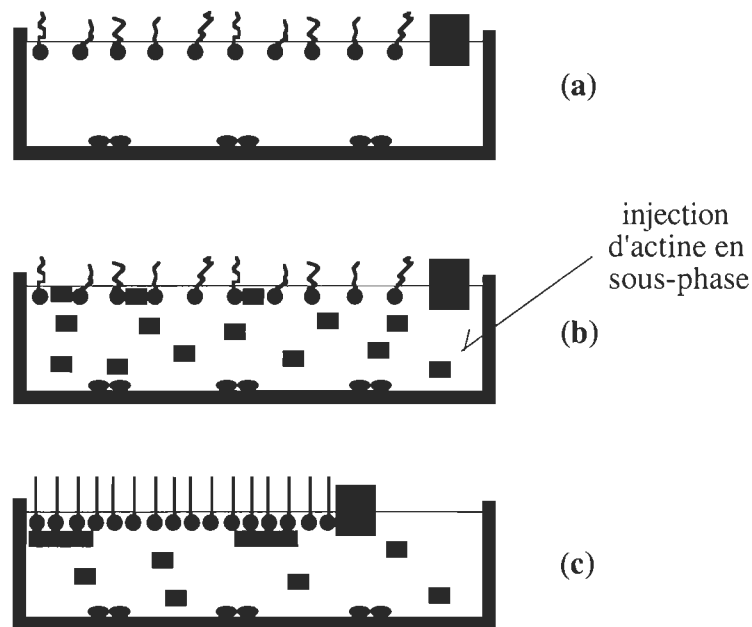


Figure 13.

Schéma montrant le protocole suivi pour l'étude de l'interaction actine-lipides en monocouches. (a) Étalement des lipides à l'interface. En (b), injection de l'actine en sous-phase et homogénéisation. En (c), compression de la monocouche par la barrière mobile. La sous-phase est constituée de tampon G.

2.2.2. Observation des monocouches en microscopie électronique

Ce protocole est schématisé à la figure 14. Une monocouche de lipides est étalée sur du tampon G dans un bain à aire fixe. Plusieurs compositions de lipides ont été utilisées et sont indiquées dans les résultats. L'actine dont la concentration finale varie de 1,1 à 200 µg/ml selon les expériences, est injectée en sous-phase, sous un

film de lipides, à l'aide d'une seringue. L'injection de l'actine se fait par un trou situé sur le bord du bain pour ne pas briser le film de lipides formé à l'interface. Une série d'expériences a été faite en absence de $MgCl_2$, c'est-à-dire où l'actine est monomérique et une deuxième série d'expérience en présence de 3 mM de $MgCl_2$, c'est-à-dire dans des conditions où l'actine est polymérisée.

Une grille de microscopie électronique recouverte de FormvarTM-carbone est ensuite déposée sur la monocouche de lipides. Après attente entre deux et dix minutes, la grille est retirée et colorée à l'acétate d'uranium 1% en solution aqueuse. Pour chaque expérience, trois grilles ont été colorées et observées en microscopie électronique. Trois expériences ont été faites pour chaque condition.

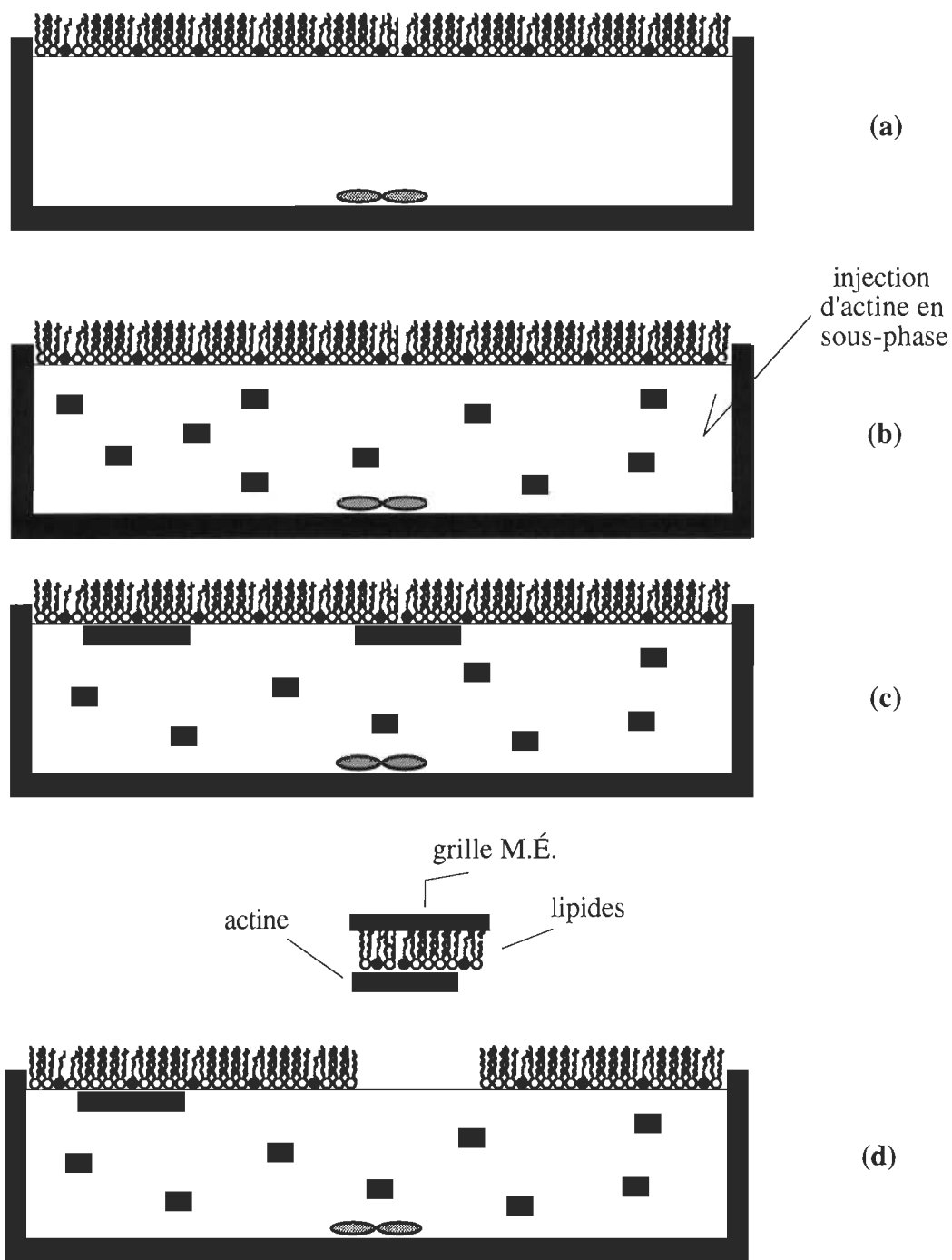


Figure 14.

Schéma montrant le protocole suivi pour la préparation des échantillons pour la microscopie électronique de l'actine à l'interface. En (a), étalement des lipides à la surface du tampon. En (b), injection de l'actine en sous-phase et homogénéisation. En (c), incubation de l'actine avec les lipides et actine fixée sur ces lipides. (d) On récupère sur une grille hydrophobe, le film de lipides et l'actine qui est collée à leur surface.

2.2.3. Les films de Langmuir-Blodgett

2.2.3.1. Le transfert sur support solide

Une monocouche de molécules amphiphiles étalées à la surface du tampon peut être transférée sur un support solide. Pour nos expériences, ce support solide est une grille de microscope électronique recouverte de Formvar™-carbone. Les molécules qui ont une plus grande affinité pour le support que pour la sous-phase vont se coller à la grille. La pression de surface à laquelle on effectue le transfert est de quelques mN/m avant le collapse. La qualité du transfert dépend de trois paramètres: la nature des molécules à transférer, la composition de la sous-phase et le type de support (Uzgoris 1986; Kubalek *et al.* 1991; Chen *et al.* 1992; Glaeser 1992; Petty 1992; Asturias & Kornberg 1995; Eriksson 1997; Puu & Gustafson 1997).

2.2.3.2. Les différents types de transfert

Il existe plusieurs types de transfert des monocouches étalées à l'interface vers les supports solides. Ces types de transfert dépendent de la nature (hydrophile ou hydrophobe) des supports et de la méthode utilisée. La figure 15 illustre les trois types de transfert.

Dans la figure 15 on peut voir que, lorsque nous utilisons un support hydrophile, les lipides vont se fixer, les têtes polaires dirigées vers le substrat (types-Z et -Y). Au contraire, avec un support hydrophobe, ce sont les chaînes aliphatiques des lipides

qui se fixeront au support probablement par des interactions de type Van der Waals (type-X).

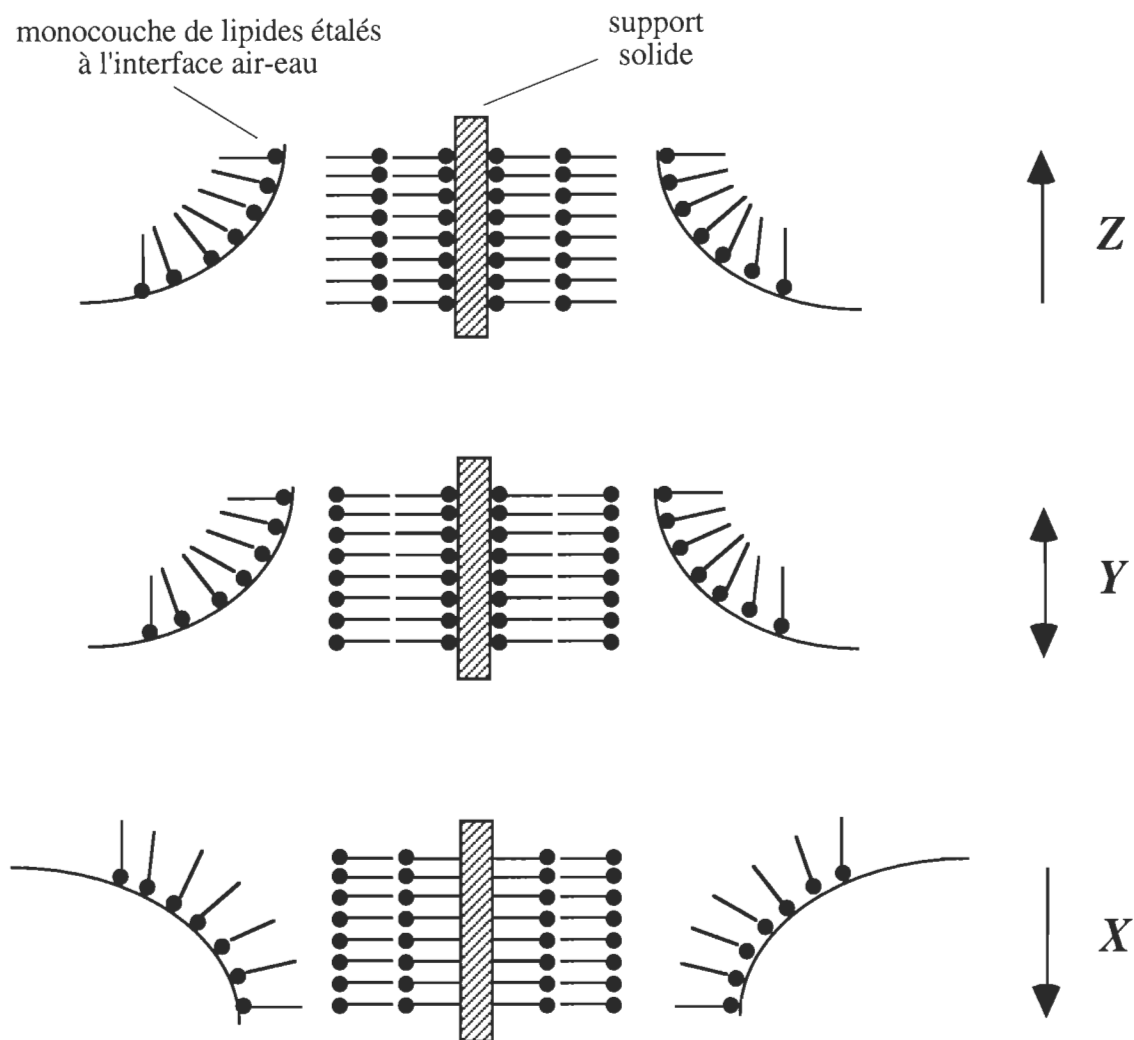


Figure 15.

Différents types de transfert (X, Y et Z) utilisés pour la déposition de monocouches sur les supports solides (tiré de Tazi 1996, modifié).

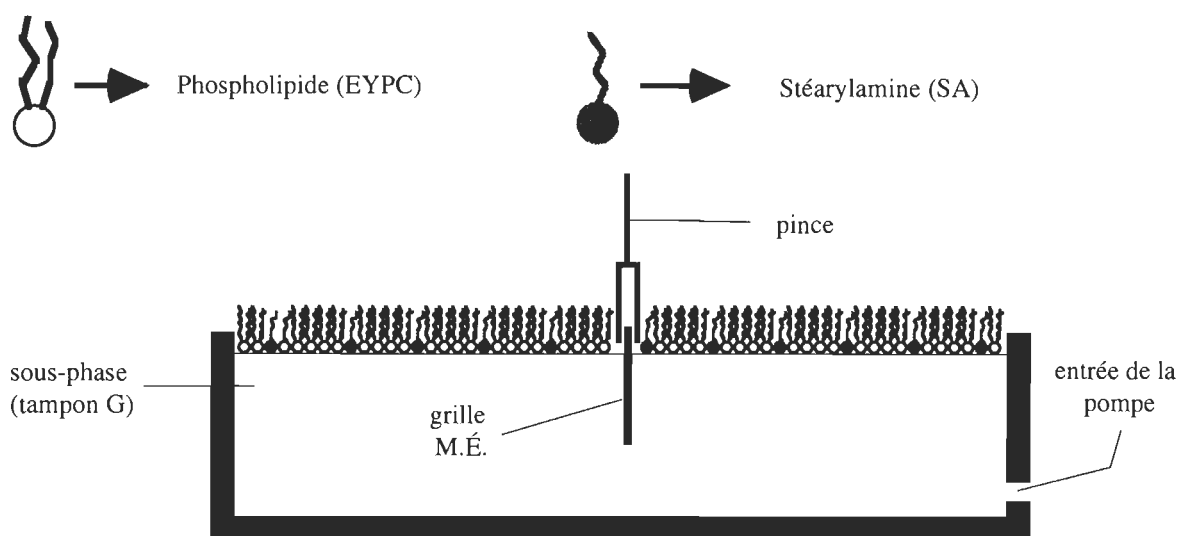
Indépendamment de l'indice d'hydrophobicité du support, la juxtaposition de couches supplémentaires se fait selon le sens et l'ordre avec lequel le support plonge et remonte à travers la monocouche.

2.2.3.3. Technique d'Uzgiris

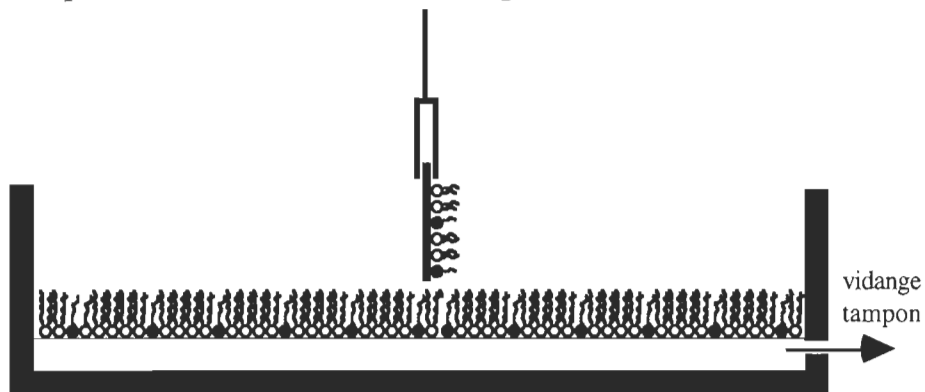
La technique développée par Uzgiris (1986) illustrée à la figure 16 consiste à rendre hydrophile une grille de microscopie électronique recouverte de Formvar™. L'exposition du Formvar™ à une radiation U.V. intense ionise la surface qui devient hydrophile. Par la suite, une bicouche de lipides est transférée sur la grille (type -Y) de façon à ce que les têtes polaires des lipides soient exposées vers l'extérieur.

Après le transfert de la bicouche sur la grille de microscopie électronique, celle-ci est déposée et incubée deux heures sur une goutte de 50 μl de solution d'actine. La grille est ensuite retirée et colorée par l'acétate d'uranium 1% en solution aqueuse.

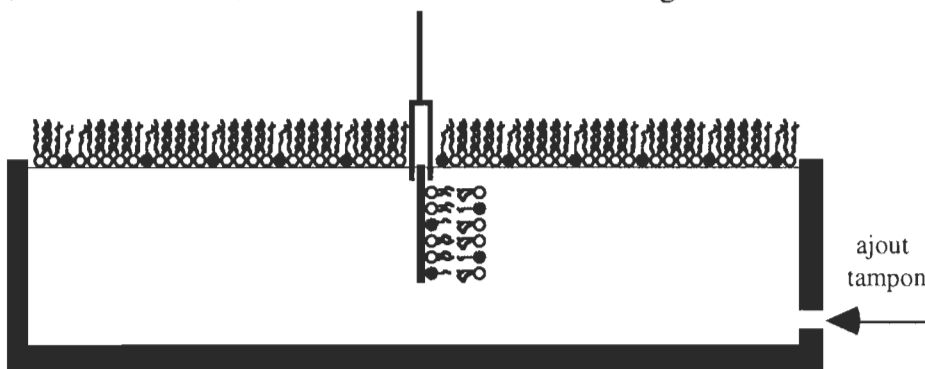
1. Le mélange de lipides (EYPC:SA [75:25]) est étalé sur un bain circulaire à aire fixe, contenant du tampon G, à une aire de 51 \AA^2 par molécule.



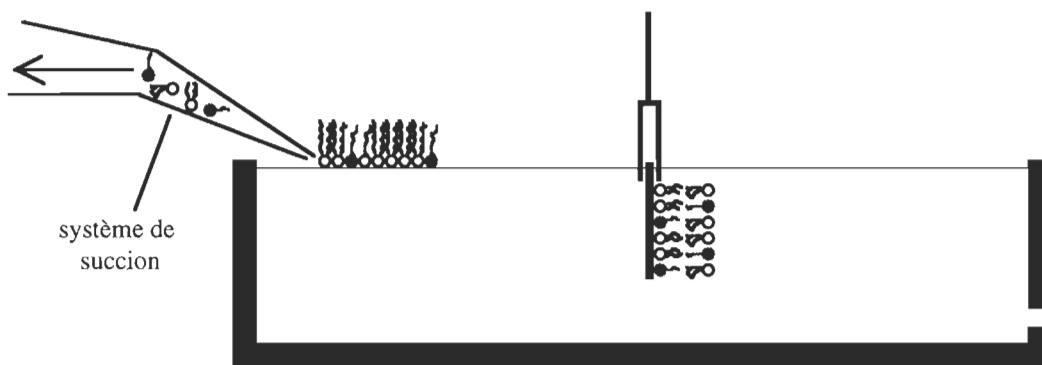
2. Le niveau de la sous phase est abaissé en vidant le tampon à l'aide d'une pompe péristaltique, à une vitesse régulière de 0,11 mm/seconde; la première monocouche de lipides est alors transférée sur la grille.



3. Le niveau de la sous-phase est élevé en ajoutant du tampon à une vitesse régulière de 0,11 mm/seconde; une bicouche se forme sur la grille.



4. Les phospholipides restant à l'interface air-eau sont enlevés par un système de succion.



5. La grille de microscopie électronique, avec sa bicouche de lipides, est déposée sur une goutte contenant une solution d'actine.

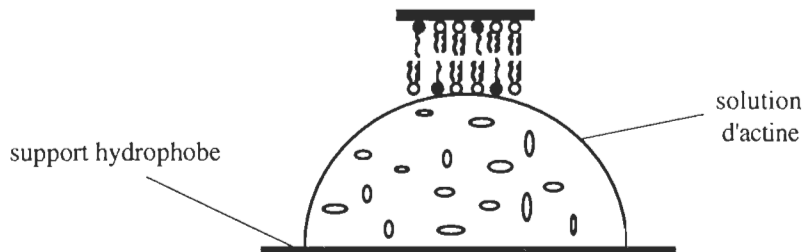


Figure 16.

Schéma montrant le transfert de films monomoléculaires (type-Y) de l'interface air-eau à un support hydrophile par la technique de Langmuir-Blodgett modifiée par Uzgiris.

Les concentrations d'actine étudiées étaient de 0 à 200 $\mu\text{g/ml}$. Une série d'expériences a été faite en absence de MgCl_2 , c'est-à-dire dans des conditions où l'actine est monomérique et une autre série d'expériences en présence de 3 mM de MgCl_2 , c'est-à-dire où l'actine est polymérisée. Nous avons fait varier le temps de contact de la grille avec la goutte de spécimen de 0 à 20 heures. Chaque expérience a été répétée trois à cinq fois.

CHAPITRE III: RÉSULTATS

3.1. Étude de l'interaction actine-lipides à l'interface air-eau

Le but de cette première partie est de déterminer dans quelles conditions il y a de fortes interactions entre l'actine et les lipides membranaires. Nous utilisons pour cela la technique des monocouches avec une cuve de Langmuir munie d'une barrière mobile. Lorsque les molécules d'actine sont fortement attirées par les lipides, elles vont se concentrer à l'interface, ce qui va favoriser le contact entre les monomères d'actine, condition nécessaire pour la formation de cristaux bidimensionnels d'actine. Cependant, le fait que l'actine se concentre à l'interface ne signifie pas qu'elle va forcément cristalliser. Les monomères peuvent être concentrés à l'interface sans former de filaments et/ou de cristaux bidimensionnels d'actine.

3.1.1. Interactions actine-lipides en monocouche

La figure 17 représente des isothermes, d'actine seule, de lipides seuls et de lipides étalés sur une sous-phase contenant de l'actine. Les isothermes sont obtenus à l'aide de la cuve de Langmuir munie d'une barrière mobile.

L'actine étant une protéine très hydrophile, seule une faible proportion de molécules vont à l'interface. On ne peut pas calculer l'aire moléculaire de l'actine en divisant

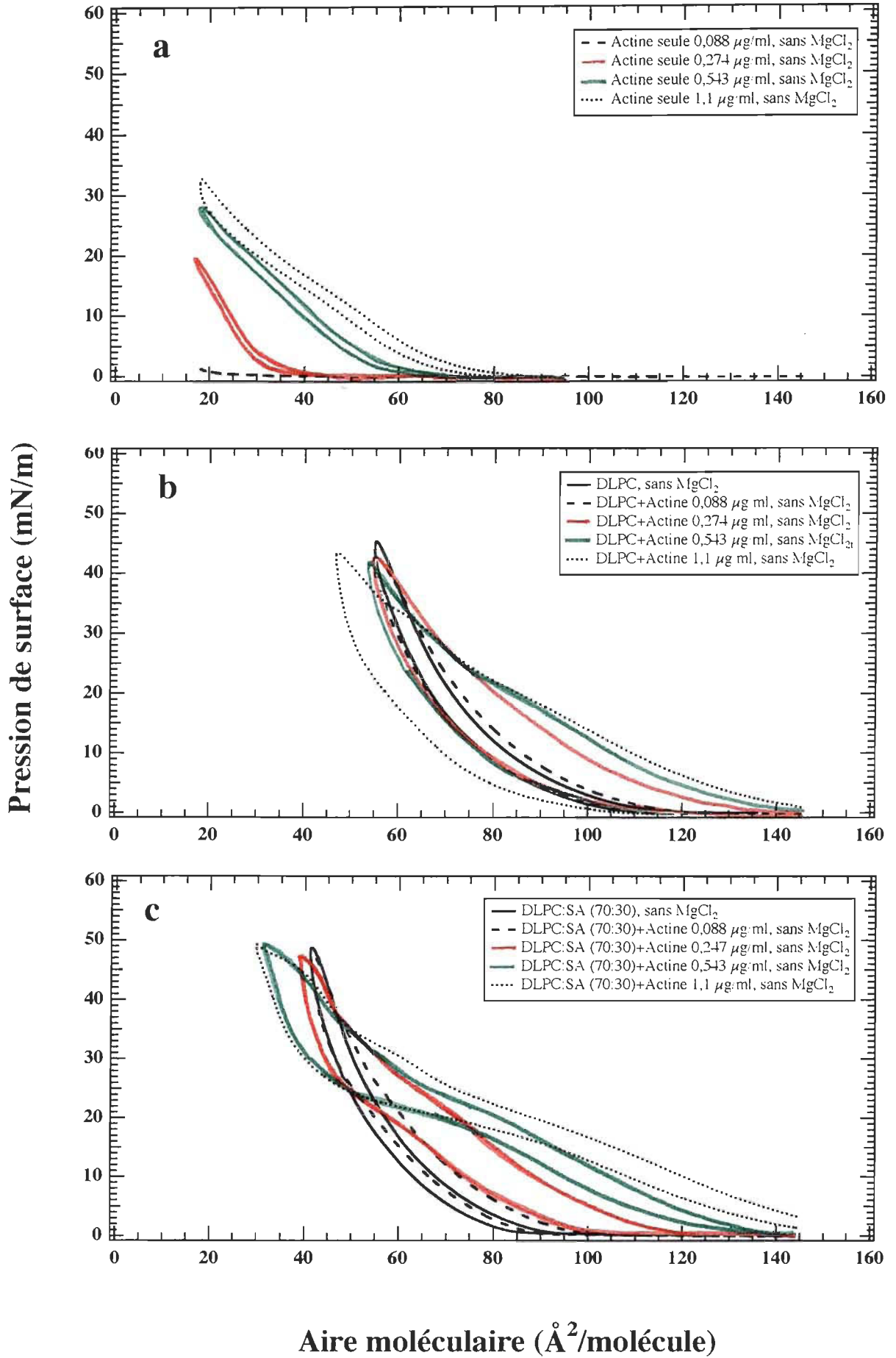
l'aire du bain par le nombre de molécules d'actine puisque cette valeur n'aurait aucune signification.

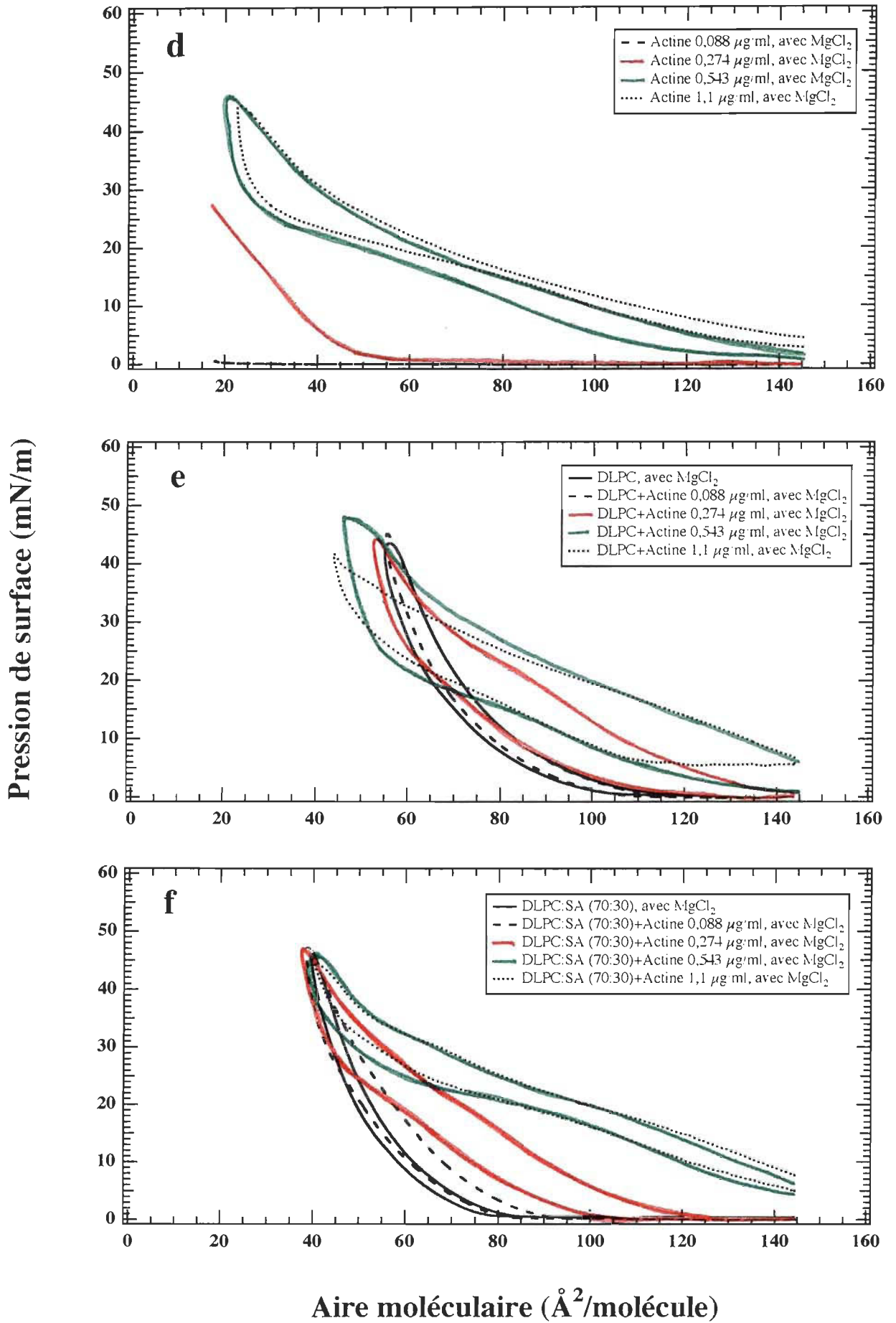
Afin de comparer les isothermes de l'actine seule et de l'actine en présence de lipides, nous avons porté sur l'axe des x des graphiques des figures 17a et 17b, la valeur obtenue en divisant l'aire du bain par le nombre de molécules de lipides utilisés au cours d'une expérience équivalente.

Cette représentation permet de comparer les isothermes d'une même expérience, mais la valeur portée sur l'axe des x n'est pas l'aire moléculaire de l'actine.

Figure 17.

(Pages suivantes) Isothermes de concentrations croissantes d'actine seule injectée en sous-phase, en absence (a) et en présence de $MgCl_2$ (d). Isothermes de DLPC étalé sur des concentrations croissantes d'actine en absence (b) et en présence de $MgCl_2$ (e). Isothermes de DLPC:SA (70:30) étalé sur des concentrations croissantes d'actine en absence (c) et en présence de $MgCl_2$ (f). Les concentrations croissantes d'actine sont 0.088 (- - -), 0.257 (—), 0.543 (—) et 1.1 μ g/ml (• • •). Pour toutes les courbes, les isothermes de décompression sont en dessous de l'isotherme de compression





La figure 17a montre les isothermes d'actine seule, sans lipide, pour des concentrations croissantes d'actine de 0,088 à 1,1 $\mu\text{g/ml}$, en absence de MgCl_2 en sous-phase, c'est-à-dire dans des conditions où l'actine n'est pas polymérisée. La figure 17d montre des isothermes d'actine seule, sans lipide, pour les mêmes concentrations d'actine de 0,088 à 1,1 $\mu\text{g/ml}$, mais en présence de 3 mM de MgCl_2 , conditions où l'actine est polymérisée. Sur ces figures, on constate que l'actine modifie la tension de surface à partir d'une très faible concentration (0,088 $\mu\text{g/ml}$). Pour de plus hautes concentrations d'actine, les isothermes se déplacent à droite, c'est-à-dire vers de plus hautes aires moléculaires. L'actine injectée en sous-phase remonte donc à l'interface air-eau. Plus la concentration d'actine en sous-phase est grande, plus il y a de molécules d'actine qui remontent.

La figure 17b montre les isothermes d'un lipide neutre, le DLPC, étalé sur une sous-phase qui contient de l'actine à des concentrations croissantes de 0,088 $\mu\text{g/ml}$ à 1,1 $\mu\text{g/ml}$, en absence de MgCl_2 , condition où l'actine n'est pas polymérisée. La figure 17e montre les isothermes d'expériences semblables, mais faites en présence de 3 mM de MgCl_2 , condition où l'actine est polymérisée.

La figure 17c montre les isothermes de mélanges de lipides chargés positivement (DLPC:SA [70:30]) étalés sur une sous-phase qui contient de l'actine à des concentrations de 0,088 à 1,1 $\mu\text{g/ml}$, en absence de MgCl_2 . La figure 17f montre les isothermes d'expériences semblables mais faites en présence de 3 mM de MgCl_2 .

Les figures 17b, 17c, 17e et 17f montrent que pour de faibles pression de surface, lorsqu'on augmente la concentration d'actine, les isothermes sont déplacés vers la droite, c'est-à-dire vers de plus hautes aires moléculaires. Ceci suggère que, pour de

faibles pressions de surface, l'actine remonte à l'interface et se met entre les molécules de lipides. Plus la concentration d'actine est grande et plus le nombre de molécules d'actine qui remontent à l'interface est élevé.

De plus, sur les mêmes figures, on constate, que pour de hautes pressions de surface, les isothermes des lipides sont généralement déplacés à gauche en présence d'actine. Les molécules d'actine qui se sont intercalées entre les molécules de lipides à faibles pressions, sont expulsées en sous-phase et la diminution de l'aire moléculaire peut être interprétée comme l'entraînement, par les molécules d'actine, d'un certain nombre de molécules de lipides en sous-phase.

Enfin, on note que l'augmentation de l'aire moléculaire en fonction de la concentration d'actine est plus importante en présence de MgCl_2 en sous-phase, c'est-à-dire en présence d'actine polymérisée (figures 17d, 17e et 17f). Les plus grandes augmentations d'aires moléculaires indiquent que l'actine polymérisée occupe plus de place entre les lipides, ce qui résulte probablement de la polymérisation de l'actine par le MgCl_2 , polymérisation en filaments qui forment un réseau à la surface ou parce que l'actine polymérisée est plus hydrophobe que l'actine monomérique, ce qui facilite sa remontée à l'interface.

Les concentrations d'actine utilisées dans ces expériences sont faibles (quelques $\mu\text{g/ml}$) et sont inférieures aux concentrations critiques d'actine, même en présence de 3mM de MgCl_2 . Nous pensons que comme les lipides attirent l'actine, la concentration d'actine à l'interface est plus élevée que la concentration en sous-phase et devient supérieure à la concentration critique.

La figure 17 montre que les isothermes de lipides sont modifiés par la présence d'actine en sous-phase donc que l'actine remonte à l'interface. Afin de mieux caractériser l'effet de l'actine sur les isothermes, nous avons tracé le graphique qui représente, pour une pression donnée de $\pi = 10$ mN/m, l'aire moléculaire du mélange actine-lipides moins l'aire moléculaire du lipide seul et ce, en fonction de la concentration d'actine. Le graphique de la figure 18 nous donne en quelque sorte la contribution de l'actine à la monocouche.

Ici nous devons tout d'abord préciser la notion d'aire moléculaire. Pour un film constitué de lipides seuls, l'aire moléculaire est égale à l'aire du bain divisé par le nombre de molécules de lipides. L'aire moléculaire représente donc dans ce cas l'aire occupée par molécule de lipides. En présence d'actine, seule une faible proportion de molécules de protéine remonte en surface, et on ne connaît pas cette proportion. On ignore donc l'aire occupée par la protéine dans un film mixte de lipides et de protéines.

L'aire moléculaire calculée est obtenue en retranchant l'aire du film mixte de lipides et de protéines par le nombre de molécules de lipides seuls. Il s'agit donc d'une aire moléculaire apparente de l'actine.

Pour l'actine seule, sans lipide, on note à la figure 18 que, pour une pression de surface de 10 mN/m, l'aire moléculaire apparente de l'actine augmente en fonction de la concentration d'actine injectée en sous-phase. Ce résultat s'explique par le fait que, plus la concentration d'actine est élevée en sous-phase, plus de molécules d'actine remontent à la surface. À partir d'une concentration d'actine de 0,5 $\mu\text{g/ml}$,

les courbes présentent un plateau, ce qui signifie qu'au delà de cette concentration la surface est saturée par des molécules d'actine comme illustré à la figure 19.

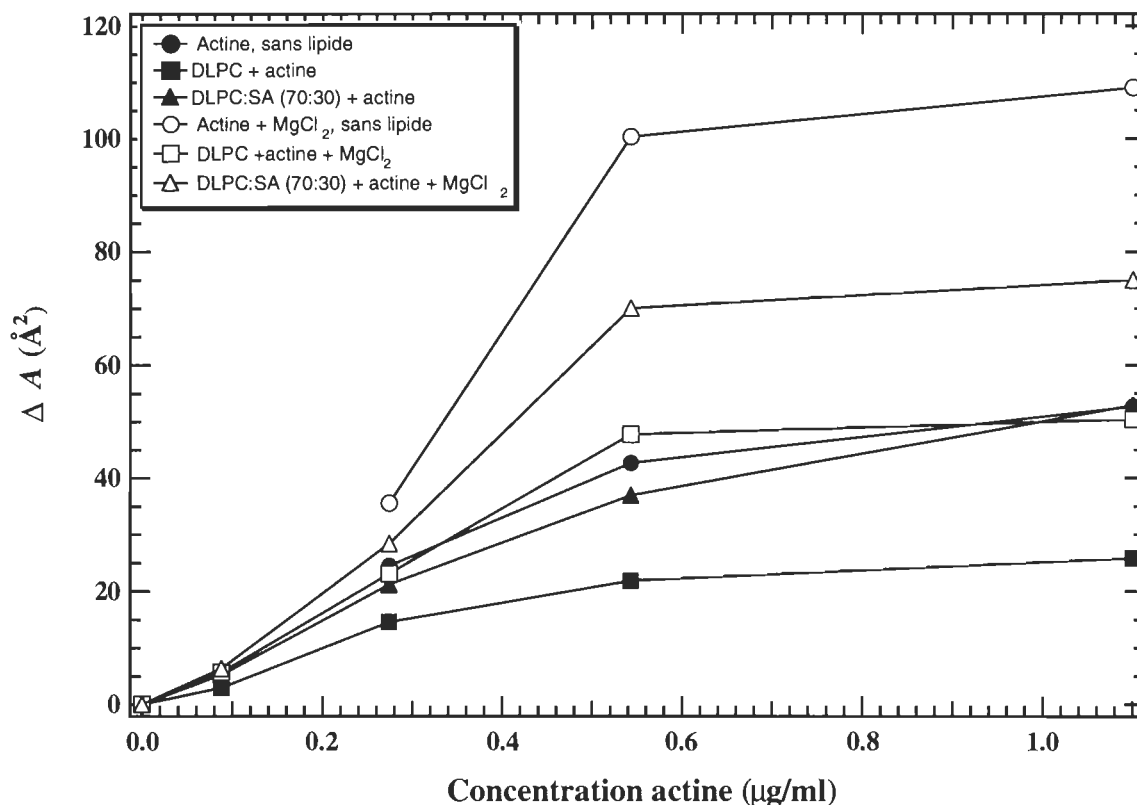


Figure 18.

Différence d'aire moléculaire (ΔA) des films actine-lipides à $\pi = 10$ mN/m en fonction de la concentration d'actine, moins l'aire moléculaire des lipides seuls à la même pression de surface. Pour l'actine seule, comme il n'y a pas de lipides, on considère l'aire moléculaire des lipides égale à 0.

En présence de lipides, l'aire moléculaire apparente de l'actine varie beaucoup moins que pour l'actine seule. Nous expliquons cela par le fait que les lipides occupent une partie de la surface, donc empêchent l'actine de remonter à l'interface air-eau, ce que nous avons schématisé à la figure 20.

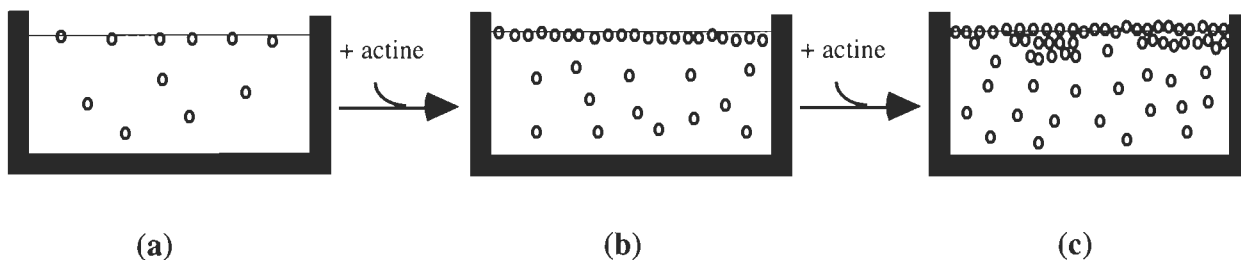


Figure 19.

Schéma montrant notre interprétation de l'effet de la concentration d'actine s'adsorbant à l'interface. (a) pour une faible concentration d'actine, seuls quelques monomères sont en surface. Lors d'une augmentation de la concentration, on arrive à un point où l'interface est saturée (b). Enfin, à de grandes concentrations, l'ajout d'actine n'a plus d'effet sur l'interface (c).



Figure 20.

Schéma expliquant la différence de ΔA de l'actine pour une même concentration à $\pi = 10 \text{ mN/m}$, lorsqu'il y a absence (a) ou présence de lipides (b).

De plus, nous constatons sur le graphique 18 que les lipides chargés positivement sont moins efficaces que les lipides neutres pour empêcher l'actine de remonter à l'interface air-eau, ce que l'on peut expliquer par le fait que les lipides chargés positivement attirent aussi l'actine par attraction électrostatique.

En présence de MgCl_2 les variations d'aires moléculaires en fonction de la concentration en actine sont plus importantes qu'en son absence ce qui indique que l'actine polymérisée occupe plus de place à l'interface, ou que l'actine polymérisée est plus hydrophobe, donc remonte plus facilement à l'interface.

3.1.2. Effet de l'actine sur le travail de compression (W_c) d'un film

À partir des isothermes π - A des figures 17, nous avons calculé le travail pour comprimer un film à l'interface air-eau (W_c). Le graphique montrant le travail de compression en fonction de la concentration d'actine est présenté à la figure 21.

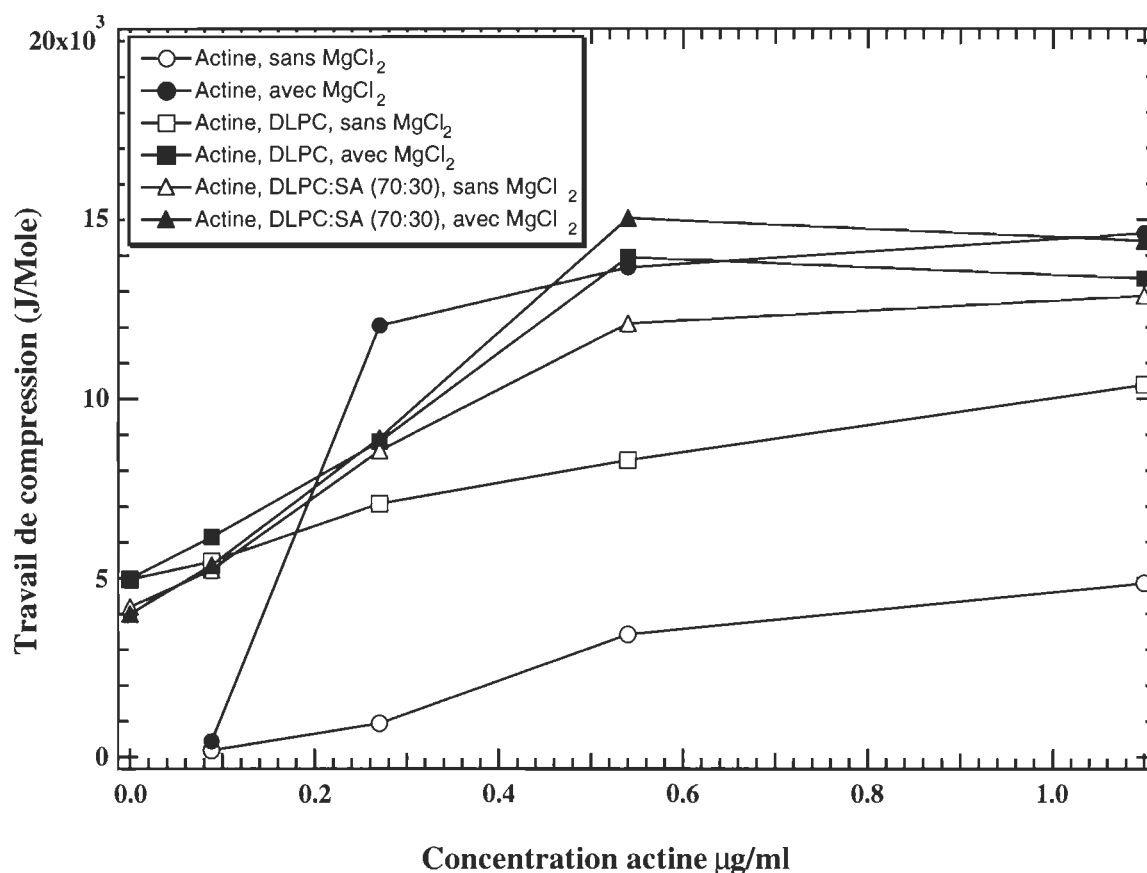


Figure 21

Graphique qui représente le travail de compression (W_c) en fonction de la concentration d'actine, pour des films de DLPC et de DLPC:SA étalés sur des solutions d'actine à concentration croissante. Les symboles blancs indiquent des expériences faites en absence de MgCl₂ et les symboles noirs, des expériences faites en présence de 3 mM de MgCl₂.

3.1.2.1. Travail de compression de l'actine seule

On constate à la figure 21 que, plus la concentration d'actine augmente, plus le travail de compression augmente jusqu'à un plateau qui est atteint pour une concentration d'actine de 0,5 $\mu\text{g/ml}$. En présence de MgCl_2 , ce plateau est atteint pour une concentration d'actine moindre, c'est-à-dire d'environ 0,27 $\mu\text{g/ml}$.

En présence de MgCl_2 , le travail nécessaire pour comprimer un film d'actine est environ trois fois plus élevé que le travail pour comprimer un film d'actine en absence de MgCl_2 . Ceci peut être expliqué par la formation de réseaux de filaments d'actine F nécessitant plus d'énergie pour être comprimés.

3.1.2.2. Travail de compression de films mixtes de lipides et d'actine

On remarque sur le graphique de la figure 21 que le travail nécessaire pour comprimer un film de lipide en absence d'actine est de $5 \times 10^3 \text{ J/mole}$. Cette valeur ne varie pas de manière significative quelle que soit la composition du film en lipide. De plus, le MgCl_2 ne modifie pas non plus le travail nécessaire pour comprimer un film de lipide seul.

On peut constater sur le graphique de la figure 21 qu'en absence de MgCl_2 , c'est-à-dire avec l'actine non polymérisée, le travail de compression d'un film de DLPC en présence d'actine est égal à la somme du travail du lipide seul et de l'actine seule. Il n'y a donc pas d'évidence d'interaction actine-lipides dans ces conditions. Par contre, en présence de MgCl_2 , le travail de compression d'un film de DLPC en

présence d'actine est inférieur à la somme du travail du lipide seul et de l'actine seule. Le lipide semble donc faciliter la compression de l'actine dans ces conditions. Ce phénomène suggère qu'en présence de $MgCl_2$, il y a interaction entre l'actine et le DLPC.

Si le film est composé d'un mélange de DLPC et de SA, en absence de $MgCl_2$, le travail nécessaire pour comprimer le film en présence d'actine est supérieur à la somme du travail de compression de l'actine seule et des lipides seuls. Par contre, en présence de $MgCl_2$, le travail de compression du mélange est inférieur au travail de compression de chacun des constituants pris séparément. Avec les lipides chargés positivement, il y a donc interaction entre l'actine et les lipides aussi bien en présence qu'en absence de $MgCl_2$.

3.1.3. Conclusions sur les interactions actine-lipides en monocouches

Les expériences effectuées en monocouche nous ont permis d'établir qu'il y a une interaction actine-lipides dans les conditions suivantes: avec le DLPC en présence de $MgCl_2$ et avec le DLPC:SA (70:30) en présence, mais aussi en absence de $MgCl_2$. Par contre, il n'y a aucune évidence d'interaction avec le DLPC en absence de $MgCl_2$.

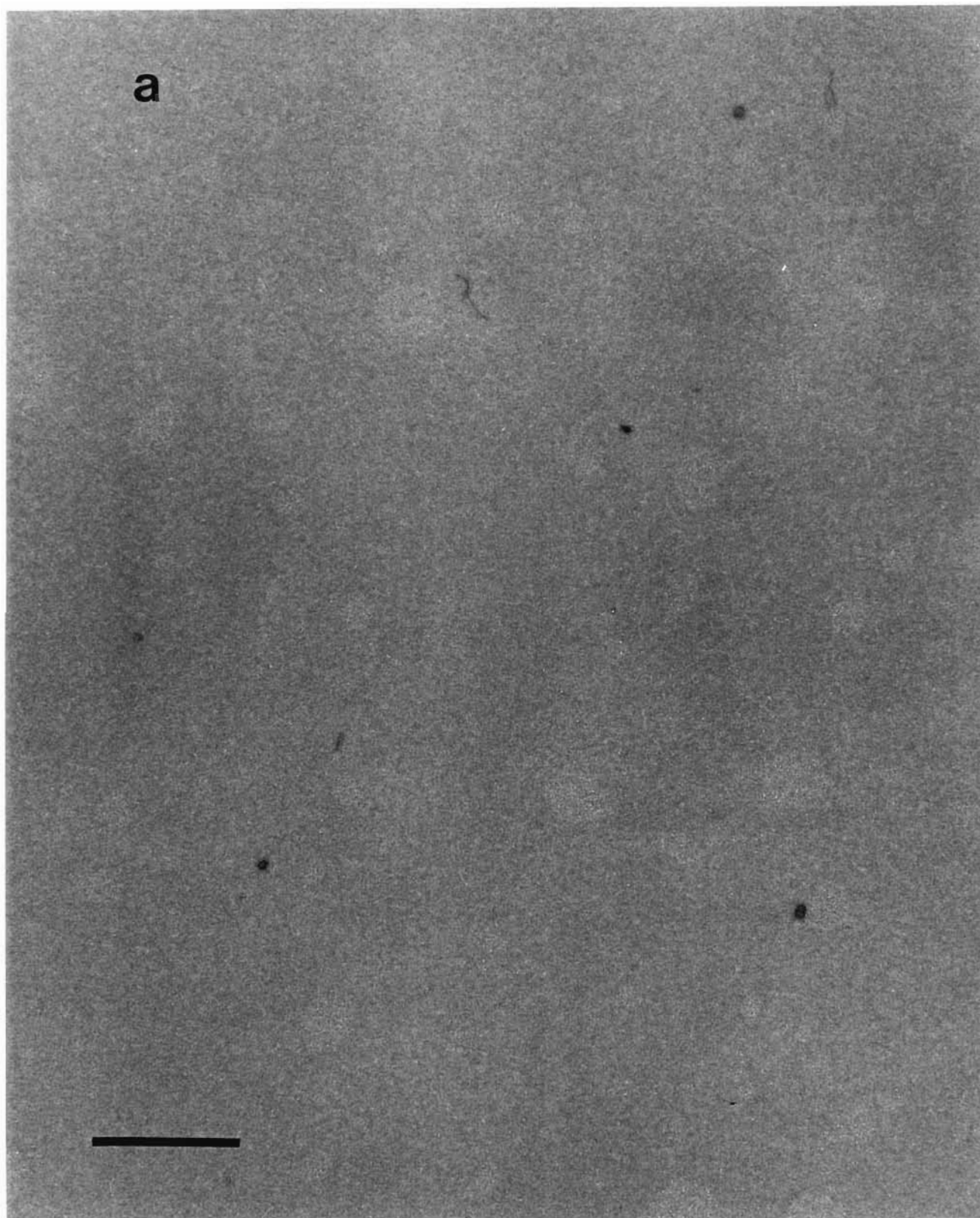
Nous allons donc utiliser les conditions qui favorisent l'interaction actine-lipides pour former des cristaux bidimensionnels d'actine, c'est-à-dire un film constitué de DLPC:SA (70:30) étalé sur une sous-phase contenant 3 mM de $MgCl_2$ et 1,1, $\mu g/ml$ d'actine.

3.2. Observation par microscopie électronique des films actine-lipides

Les expériences faites en monocouche ont montré dans quelles conditions il y a de fortes interactions actine-lipides. Cependant, il ne se forme pas nécessairement des cristaux dans ces conditions. La microscopie électronique permet de voir s'il se forme des filaments et/ou des cristaux bidimensionnels d'actine dans les préparations.

Figure 22.

(Pages suivantes) Micrographie d'un film de DLPC:SA (70:30) à une aire moléculaire de 38 \AA^2 étalé sur une sous-phase contenant 3 mM de MgCl_2 en absence **(a)** et en présence de $1,1 \mu\text{g/ml}$ d'actine **(b)**. Barre = 500 nm



b



Les figures 22a et 22b représentent un film composé de DLPC:SA (70:30) étalé sur une sous-phase de tampon qui contient 3 mM de $MgCl_2$, en absence (figure 22a) et en présence de 1,1 $\mu g/ml$ d'actine (figure 22b). La quantité de lipides étalés à l'interface correspond à une aire moléculaire de 38 \AA^2 pour le lipide, c'est-à-dire que les molécules de lipides forment une monocouche en phase solide et que nous sommes tout juste avant le collapse.

En comparant les photos 22a et 22b, on peut constater que le film de lipides seuls, sans actine, apparaît comme une couche uniforme qui a une granulation fine (10,6 nm). En présence d'actine en sous-phase, la couche a aussi un aspect uniforme et granuleux, mais les granulations sont plus grosses (23 nm). Ces granulations sont probablement des associations de monomères ou des courts polymères d'actine qui sont remontés à la surface.

Par contre, il est surprenant de constater que ces préparations ne contiennent pas de filaments ou de cristaux bidimensionnels d'actine. En effet, en présence de 3 mM de $MgCl_2$, l'actine devrait être polymérisée en filaments. De plus, il a déjà été montré que l'actine polymérise à la surface de liposomes qui contiennent de la stéarylamine.

Nous reviendrons sur ce point au cours de la discussion.

De cette première observation en microscopie électronique, on peut conclure qu'il se forme un film mixte actine-lipides. On voit des modifications de la granulation du film de lipides lorsque celui-ci est mis en présence d'actine. Ces granulations sont

constituées de courts polymères d'actine ou de complexe actine-lipides ayant une conformation particulière. Cependant, il ne se forme pas de cristaux bidimensionnels alors que nous sommes dans des conditions qui favorisent la formation de tels cristaux. On peut donc conclure qu'une interaction actine-lipides ne signifie pas nécessairement formation de cristaux bidimensionnels d'actine.

3.3. Recherche de conditions optimales pour l'obtention de cristaux bidimensionnels d'actine par microscopie électronique

La microscopie électronique n'a pas permis l'observation de cristaux bidimensionnels d'actine dans les conditions où la technique des monocouches a montré une évidence d'interaction actine-lipides. Cela est un résultat inattendu. En effet, de nombreux travaux publiés par l'équipe de Gicquaud ont montré que l'actine forme des cristaux bidimensionnels à la surface de liposomes constitués dans ces conditions.

St-Onge & Gicquaud ont montré aussi que ces cristaux bidimensionnels se forment sur des liposomes composés de lipides neutres, mais en présence de cations divalents. Enfin, les équipes de Ward et de Taylor & Taylor ont montré que des cristaux bidimensionnels d'actine sont présents sous un film de lipides chargés positivement.

Pour quelles raisons n'avons nous pas obtenu de telles structures dans des conditions où il existe des interactions actine-lipides? C'est ce que nous allons essayer d'éclaircir dans la troisième partie de ce travail.

Les études antérieures de Ward *et al.* (1990) et Taylor & Taylor (1992) nous laissent présumer que deux facteurs clefs influencent la formation des cristaux bidimensionnels d'actine: la quantité de lipides et la présence de cations divalents. Nous allons donc étudier systématiquement l'effet de ces deux facteurs sur la formation de cristaux bidimensionnels d'actine.

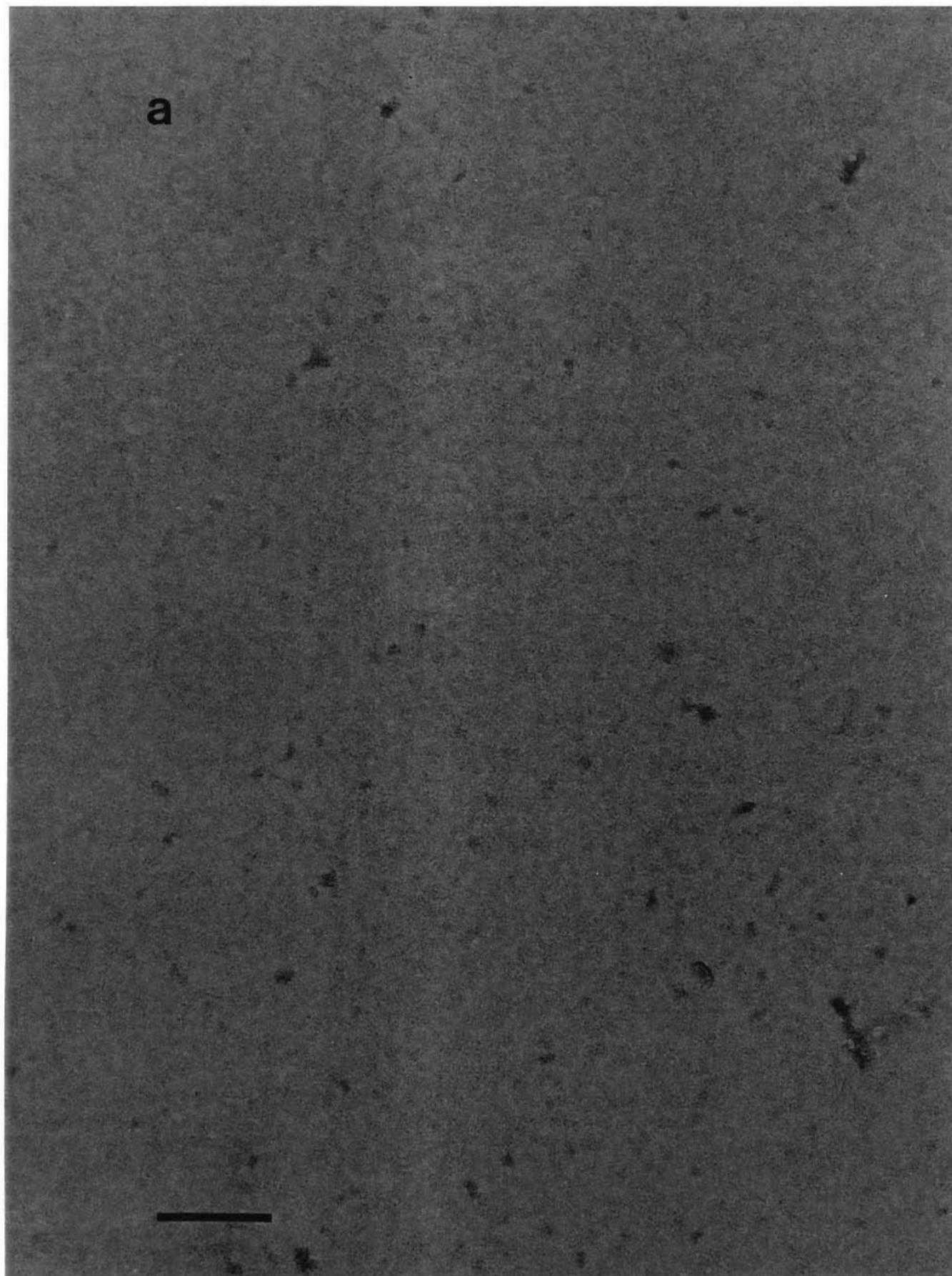
3.3.1. Effet d'un excès de lipides sur la polymérisation de l'actine

L'étude de l'effet de la concentration de lipides a été faite dans des cuves rectangulaires à aires fixes dans lesquelles on étale des quantités croissantes de lipides. Selon la quantité de lipides ajoutés, on peut obtenir soit un film monomoléculaire de lipides à l'interface air-eau, soit des multicouches, ou des micelles en sous-phase s'il y a excès de lipides.

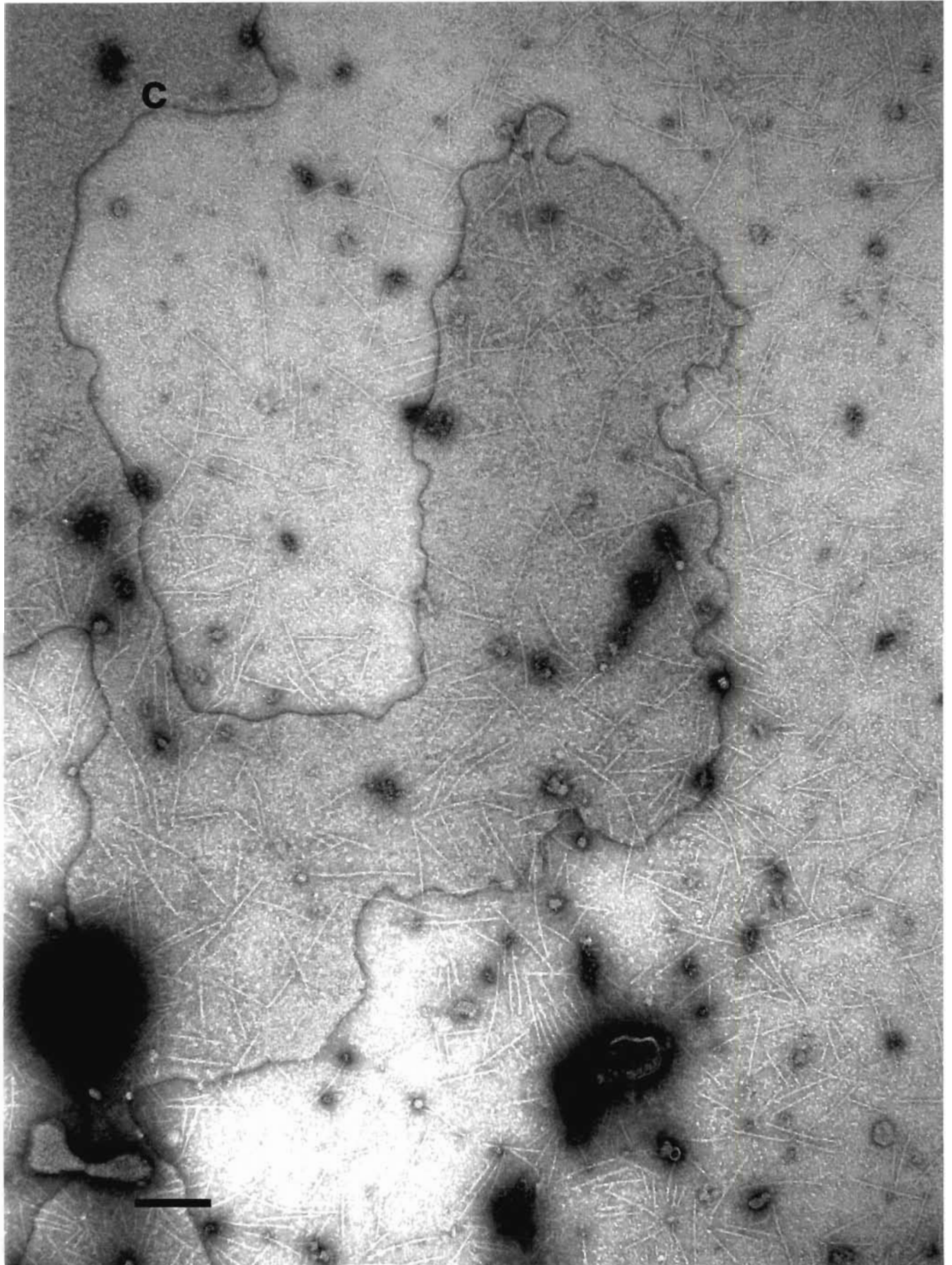
Nous avons fait deux séries d'expériences où nous avons fait varier la quantité de lipides (DLPC:SA [70:30]) étalés en surface. La première avec une sous-phase qui ne contient pas de $MgCl_2$, et la deuxième avec une sous-phase qui contient 3 mM de $MgCl_2$. Dans les deux expériences la concentration d'actine était de 10 $\mu g/ml$ et le temps d'incubation de 2,5 heures.

Figure 23.

(Pages suivantes) Structures formées par l'actine (10 $\mu g/ml$), à l'interface, en fonction de la quantité de DLPC:SA (70:30) étalé sur du tampon G, sans $MgCl_2$. (a) La quantité de lipides est calculée selon l'aire moléculaire du collapse du mélange de lipides seuls soit 41 $\text{\AA}^2/molécule$. (b), correspond à un excès de lipides de facteur 2. En (c), à un excès de lipides d'un facteur 4. Barre = 250 nm







À la figure 23, on voit des films de lipides formés de quantités croissantes de lipides (DLPC:SA [70:30]) et étalés sur une sous-phase qui contient 10 $\mu\text{g/ml}$ d'actine, en absence de MgCl_2 .

Lorsque le film est formé avec la quantité de lipides nécessaire pour former juste une monocouche, soit 41 \AA^2 /molécule de lipides, on observe quelques agrégats qui ne sont ni des filaments, ni des cristaux bidimensionnels d'actine. Ce sont des petits agrégats non structurés d'actine (figure 23a).

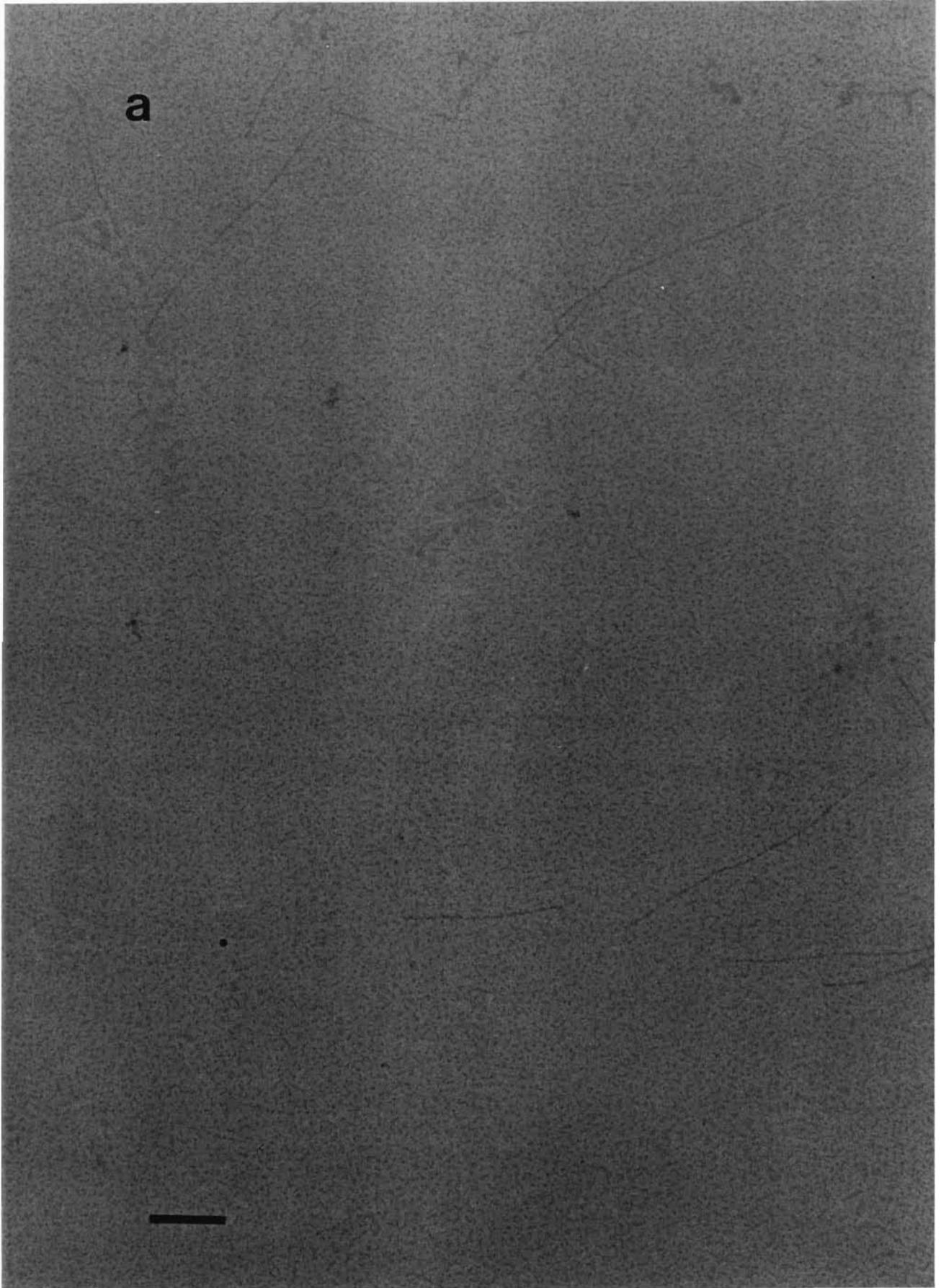
Lorsque le film est formé avec un excès de lipides (DLPC:SA [70:30]) correspondant à un facteur 2, les lipides en excès vont former des micelles et/ou de petits liposomes en sous-phase. Dans ce cas, nous notons la présence de filaments d'actine sur ces petits liposomes (figure 23b). Pour un excès de lipides d'un facteur 4, nous notons, en plus des micelles et des liposomes, la présence de plaques de lipides. Dans ces préparations, on observe de nombreux filaments d'actine courts ayant un diamètre moyen d'environ 8 nm et une longueur de l'ordre de 200 nm (figure 23c).

De ces observations, on peut conclure qu'en absence de MgCl_2 , lorsqu'il n'y a pas d'excès de lipides chargés positivement, c'est-à-dire lorsque nous avons une monocouche, l'actine ne polymérise pas. Par contre, en présence d'un excès de lipides chargés positivement, il se forme des filaments d'actine même en absence de MgCl_2 , c'est-à-dire même dans des conditions de tampon qui ne favorisent pas la polymérisation de l'actine. L'excès de lipides chargés positivement induit donc la polymérisation de l'actine.

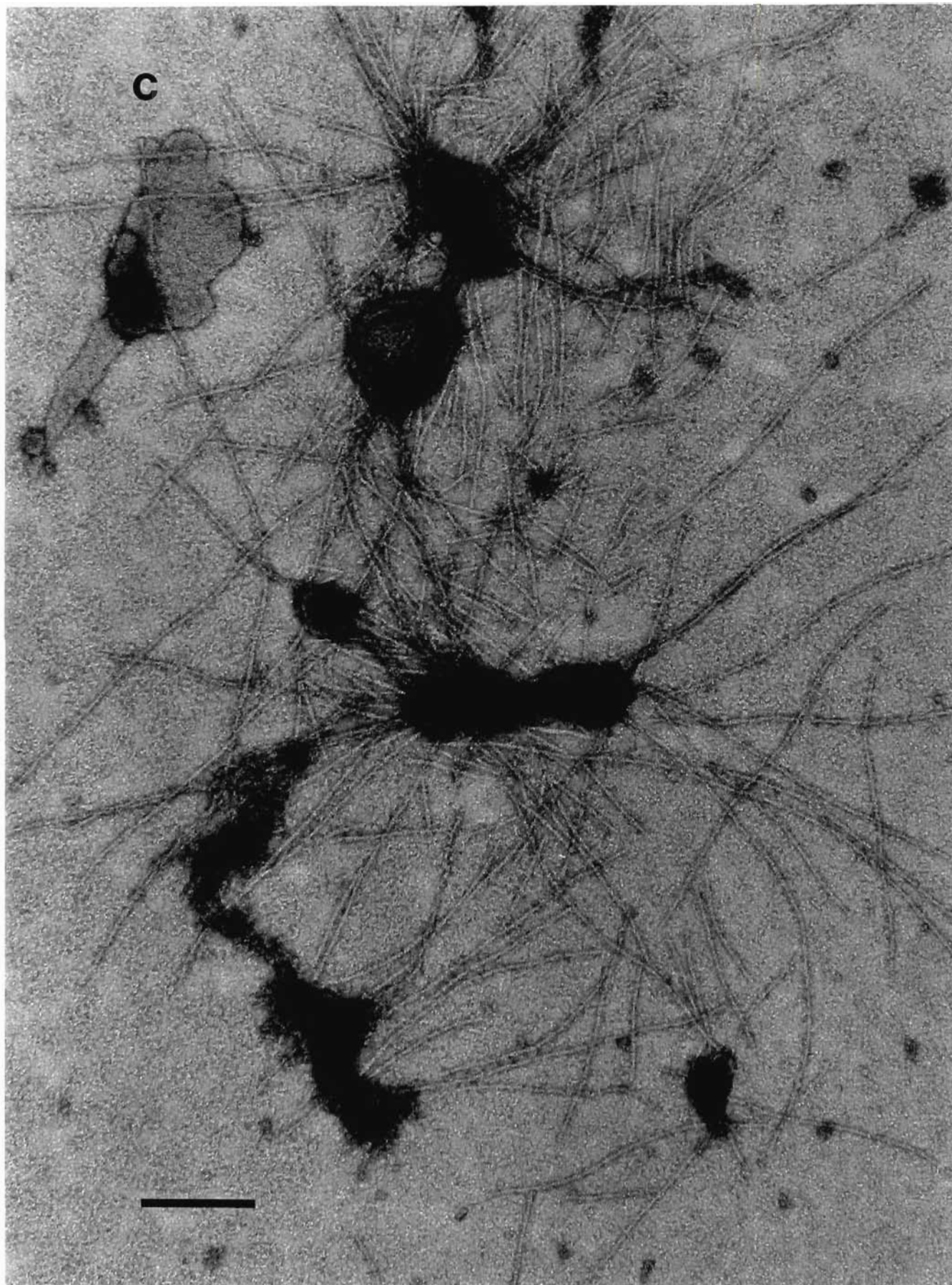
Figure 24.

(Pages suivantes) Structures formées par l'actine (10 μ g/ml) à l'interface en fonction de la quantité de DLPC:SA (70:30) étalé sur un tampon G, contenant 3 mM de MgCl₂. **(a)** La quantité de lipides est celle qui donne une monocouche, c'est-à-dire 38 Å²/molécule de lipides. **(b)**, un excès de lipides de facteur 2. En **(c)**, l'excès en lipides d'un facteur 4. Barre = 250 nm

a







À la figure 24, on voit des films de lipides (DLPC:SA [70:30]) préparés avec des quantités croissantes de lipides étalés sur une sous-phase qui contient 3 mM de MgCl_2 et 10 $\mu\text{g/ml}$ d'actine.

Pour la quantité de lipides qui forme juste une monocouche, soit $38 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$, on voit que l'actine est sous forme de filaments courts (figure 24a). Ces filaments ont un diamètre d'environ 11 nm et une longueur de l'ordre de 100 nm. Nous notons aussi la présence de quelques petits agrégats non structurés d'actine.

La figure 24b montre une préparation où la quantité de lipides est en excès d'un facteur 2. On relève la présence de cristaux bidimensionnels d'actine qui sont composés de filaments parallèles, disposés en phase et qui ont un diamètre moyen d'environ 8 nm. La périodicité latérale des cristaux correspond au pas de l'hélice du filament d'actine qui est d'environ 37 nm. La distance qui sépare les filaments est d'environ 4,8 nm. L'aire de ce cristal est de $9,8 \times 10^5 \text{ nm}^2$. Il est à souligner que ces cristaux originent tous de liposomes et d'imperfections du film de lipides. Les cristaux bidimensionnels d'actine semblent se former à partir d'imperfections qui jouent donc le rôle de germe de cristallisation. Sur cette micrographie, on observe la présence d'une autre population de filaments. Ce sont de longs filaments flexibles et qui n'ont pas d'organisation particulière. Ils proviennent probablement de l'actine qui s'est polymérisée en sous-phase et qui s'est collée à la grille lors de la récupération du spécimen. Ces filaments ont un diamètre moyen de 11 nm.

La figure 24c montre une préparation où la quantité de lipides est d'un facteur 4, Nous notons la présence de filaments d'actine dont le diamètre moyen est de 10 nm.

Là aussi, nous notons que ces filaments originent de liposomes et d'imperfections dans le film de lipides.

Pour les figures 24**b** et 24**c**, il est à noter que nous n'observons que de très rares agrégats non structurés d'actine. Ce sont donc les charges positives, soit de la stéarylamine, soit du MgCl_2 , qui permettent à l'actine de polymériser en filaments ou en cristaux bidimensionnels plutôt que de s'associer en agrégats non structurés.

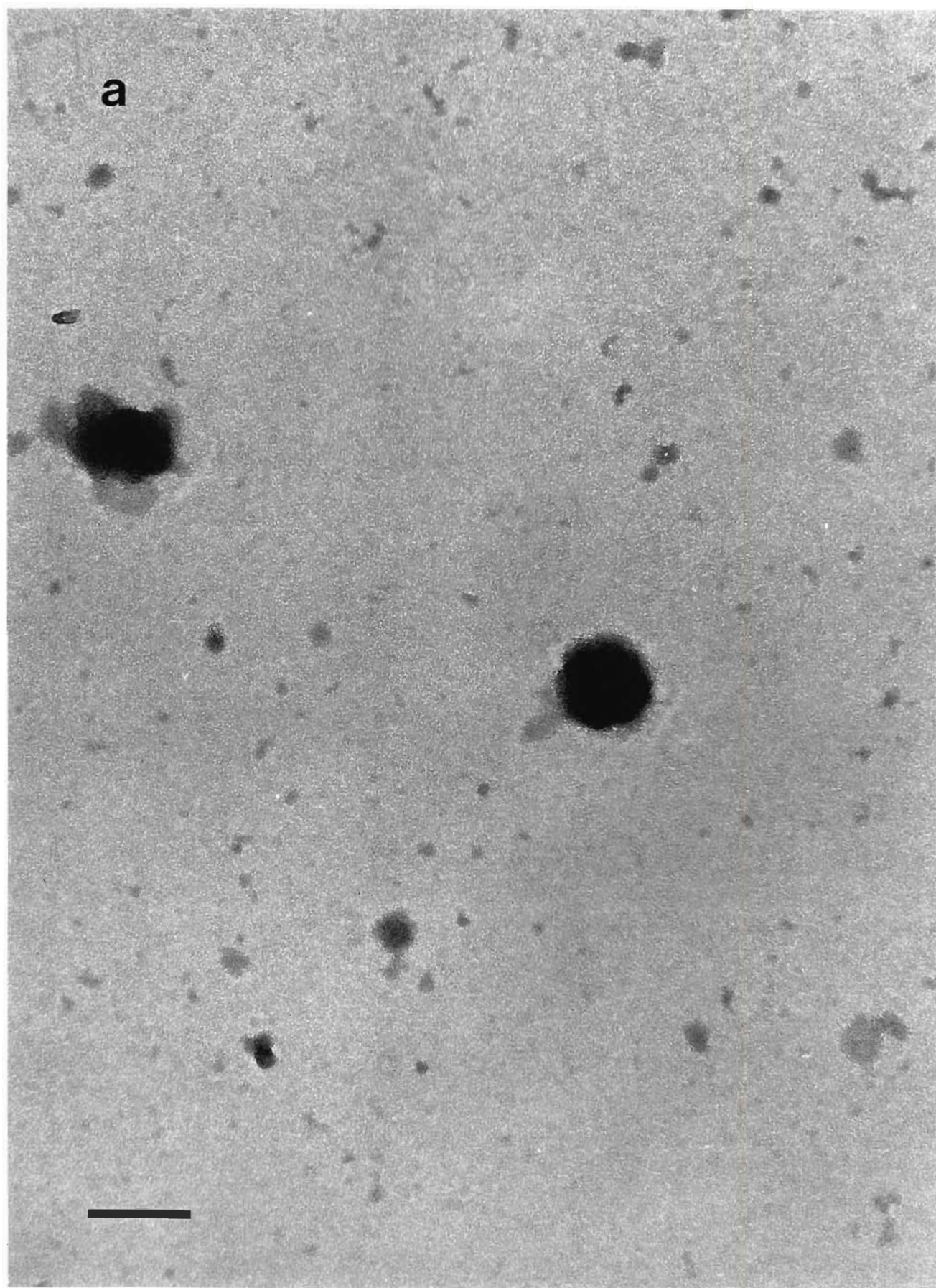
3.3.2. Effet du MgCl_2 sur l'organisation de l'actine en présence d'un excès de lipides

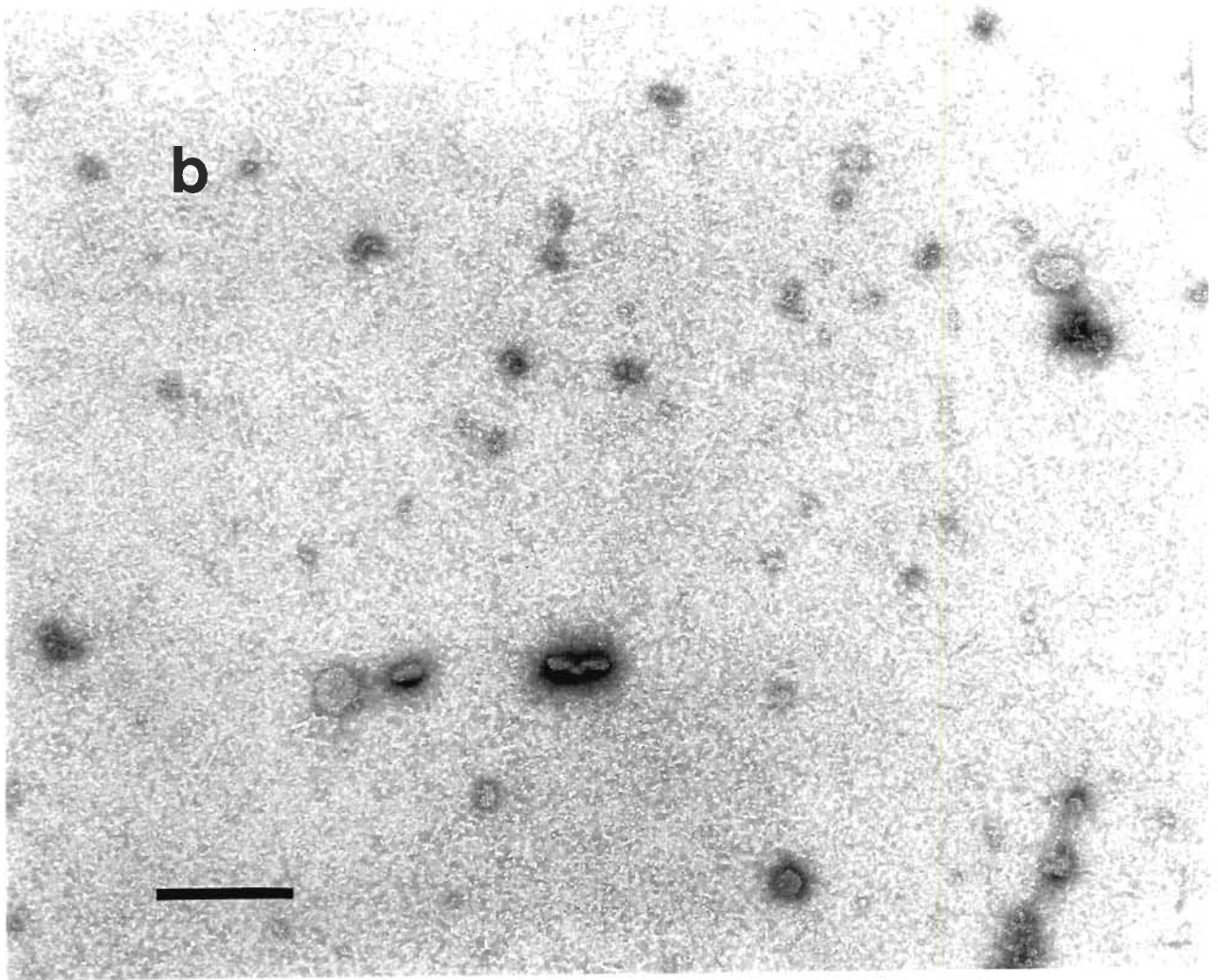
Les cations divalents tel que le MgCl_2 induisent la polymérisation de l'actine. Cependant, les résultats de la section précédente montrent qu'il est possible d'obtenir des filaments d'actine même en absence de MgCl_2 lorsque l'actine est en contact avec un excès de lipides de charge globale positive (DLPC:SA [70:30]). Dans ce cas, nous avons noté que les filaments sont moins nombreux et plus petits que dans une préparation semblable faite en présence du MgCl_2 .

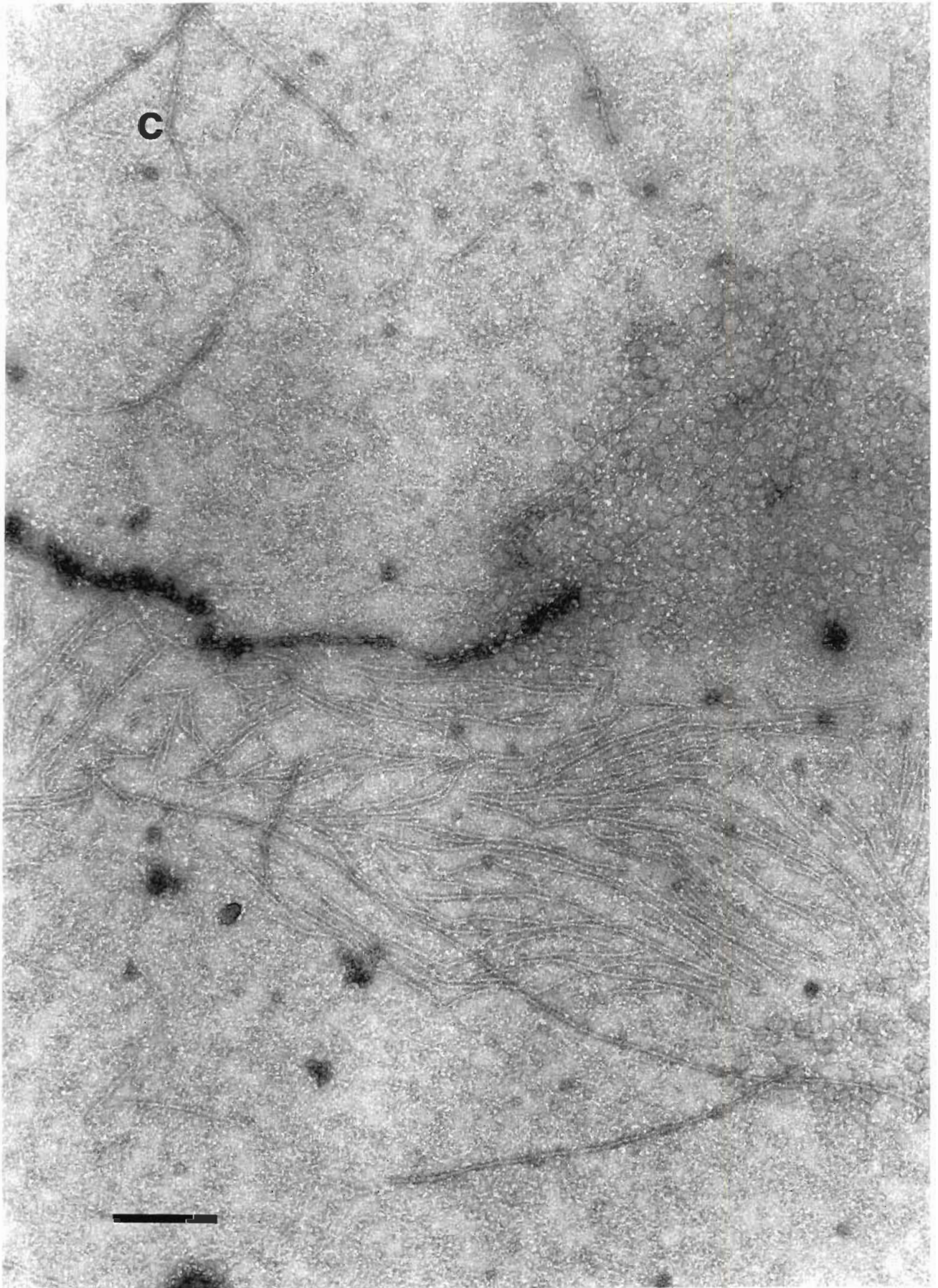
Dans cette section, nous avons étudié l'effet de la concentration de MgCl_2 sur la polymérisation de l'actine à l'interface. Pour ce faire, nous avons utilisé une série de bains remplis de tampon G qui contiennent des concentrations croissantes de MgCl_2 (0, 0,5, 1,0 et 3,0 mM). Sur ces tampons, nous avons étalé des lipides chargés positivement (DLPC:SA [70:30]) avec un excès de facteur 2, puis nous avons ajouté de l'actine en sous-phase à une concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$. La figure 25 montre les résultats obtenus.

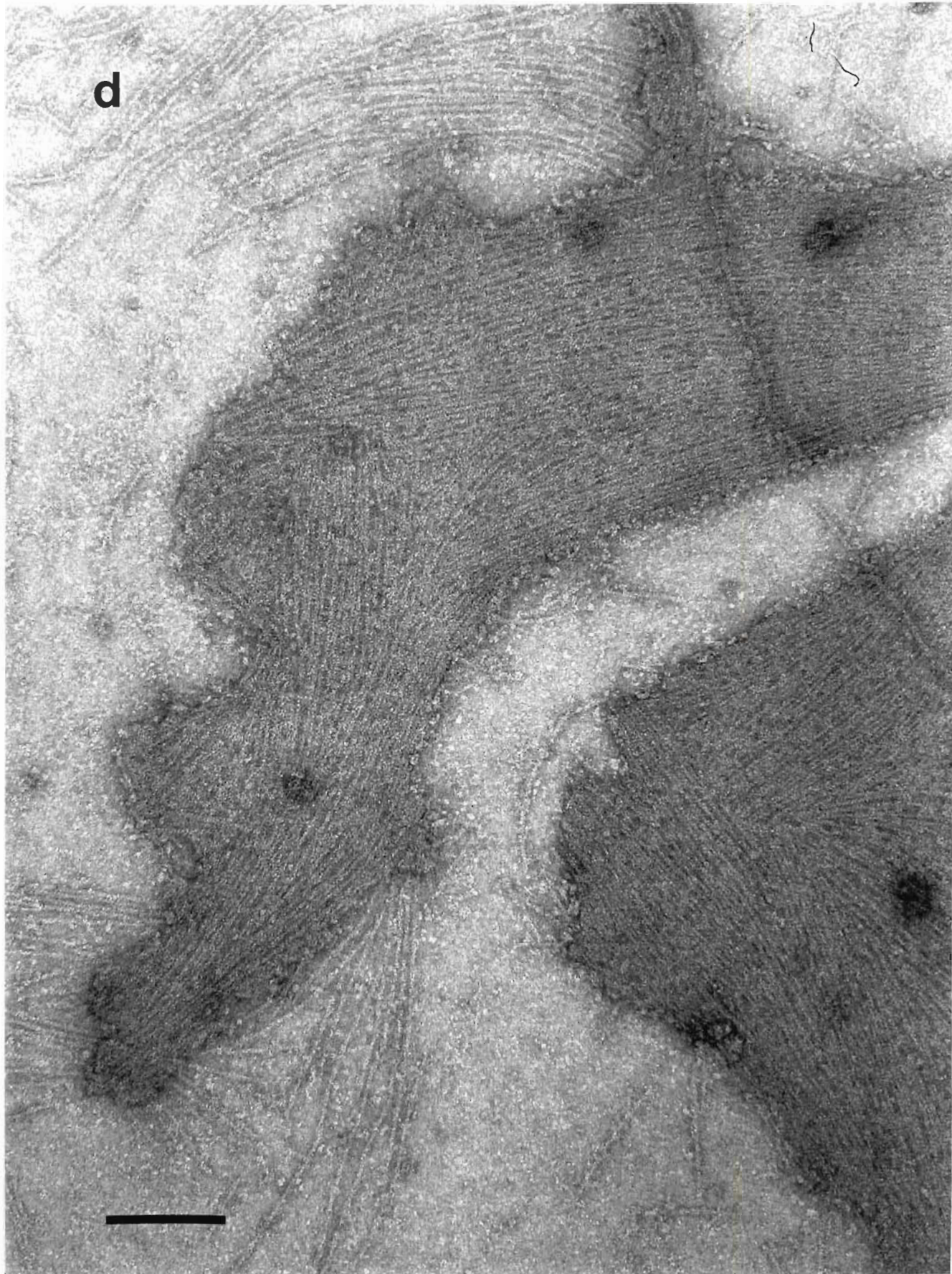
Figure 25.

(Pages suivantes) Effet de concentrations croissantes de MgCl_2 sur la polymérisation de l'actine ($10 \mu\text{g/ml}$) au contact d'un film de lipides constitué de DLPC:SA (70:30) en excès d'un facteur 2 incubé 2,5 heures. Les concentrations de MgCl_2 sont de 0 (a), 0,5 (b), 1,0 (c), et 3 mM (d). Barre = 250 nm









La figure 25 montre des films de lipides (DLPC:SA [70:30]) en excès d'un facteur 2, étalés sur une sous-phase contenant une concentration croissante de MgCl_2 (0, 0,5, 1,0 et 3,0 mM), et contenant 10 $\mu\text{g/ml}$ d'actine. La figure 25a montre une expérience où il n'y a pas de MgCl_2 en sous-phase. On note la présence de quelques rares filaments et agrégats non structurés d'actine.

La figure 25b montre une expérience semblable mais où le tampon contient 0,5 mM de MgCl_2 . Dans cette expérience, on note qu'il y a quelques petits filaments d'actine dont le diamètre moyen est de 11 nm et la longueur moyenne de l'ordre de 120 nm. Dans ce cas, il y a moins d'agrégats d'actine. Les figures 25c et 25d montrent des préparations semblables où les tampons contiennent 1 et 3 mM de MgCl_2 . Plus la concentration de MgCl_2 augmente, plus les filaments sont longs. Ainsi, pour une concentration de MgCl_2 de 1,0 mM les filaments ont une longueur moyenne d'environ 500 nm et pour une concentration de 3,0 mM en MgCl_2 , les filaments ont une longueur moyenne d'environ 800 nm, et dans ces conditions, les agrégats non structurés d'actine sont rares. De plus, à la figure 25d, on note la présence d'un cristal bidimensionnel d'actine. Ce cristal a la même morphologie que ceux décrits à la figure 24b.

3.3.3. Effet de la fluidité des lipides sur la formation de cristaux bidimensionnels d'actine

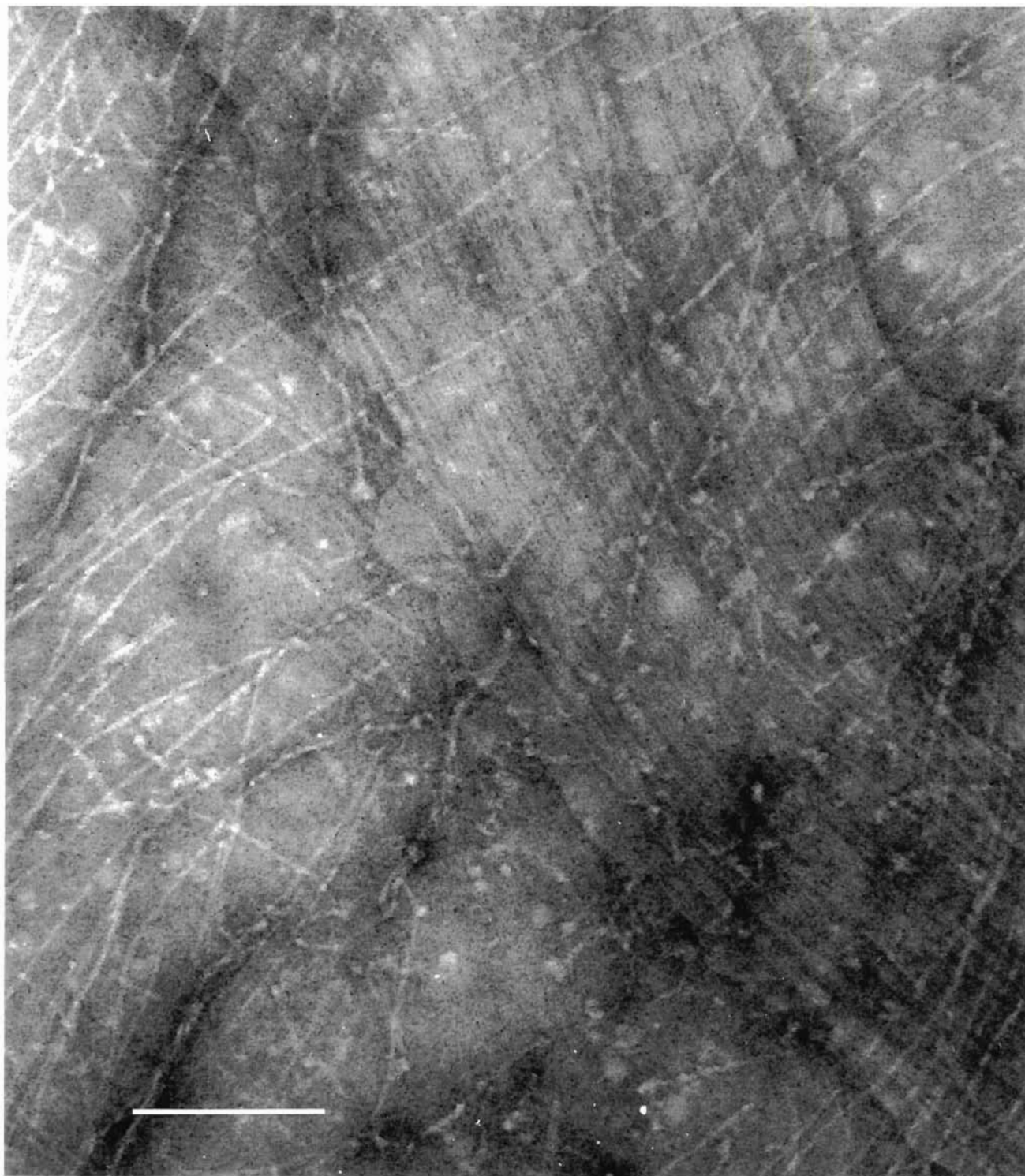
Nos expériences ont pour but de trouver quelles sont les conditions optimales pour former des cristaux bidimensionnels d'actine. Les meilleurs résultats obtenus jusque là avec 10 $\mu\text{g/ml}$ d'actine dans un tampon contenant 3 mM de MgCl_2 et sur lequel nous avons étalé un mélange de lipides qui contenait outre la stéarylamine, du

DLPC, un lipide qui a des chaînes aliphatiques saturées. Cependant, ce lipide n'a pas une grande fluidité, condition importante pour la cristallisation bidimensionnelle des protéines sous les lipides (section 1.5.1.1.2.).

Nous avons donc essayé la cristallisation bidimensionnelle de l'actine à partir des conditions optimales que nous avons trouvées: 10 $\mu\text{g/ml}$ d'actine injectée dans une sous-phase contenant 3 mM de MgCl_2 et sur lequel est étalé un excès de lipides (DLPC:SA 70:30) de facteur 2 . Cependant, nous avons utilisé le mélange EYPC:SA (75:25) car le EYPC est plus fluide que le DLPC, ce qui en principe, doit favoriser la formation des cristaux. Le résultat de cette expérience est présenté à la figure 26.

Figure 26.

(Page suivante) Cristal bidimensionnel d'actine obtenu sous une couche de EYPC:SA (75:25) un excès de lipides d'un facteur 2, 3 mM de MgCl_2 et 10 $\mu\text{g/ml}$ d'actine. Barre = 250 nm



La figure 26 montre le résultat de cette expérience. Sur cette figure on voit la présence d'un faisceau d'actine bien organisé, formé par des filaments parallèles. Ces filaments ont 7 nm de diamètre et sont séparés par une distance de 1,1 à 2,3 nm. Ce cristal est nettement plus gros que ceux obtenus avec le DLPC:SA et les filaments qui le composent sont plus compacts.

On note aussi la présence d'une autre population de filaments d'actine dont l'aspect est différent. Ils sont flexibles et n'ont pas d'orientation particulière. Il s'agit sans doute des filaments d'actine qui se sont formés dans la sous-phase et qui se sont collés à la grille lors de la récupération du spécimen.

De cette expérience, on peut conclure que la fluidité de la membrane est un facteur important pour la cristallisation bidimensionnelle de l'actine. On obtient des cristaux bidimensionnels d'actine plus gros et mieux formés avec les lipides fluides ce qui est logique car les lipides fluides permettent un meilleur déplacement latéral des monomères d'actine fixés aux lipides, déplacement qui facilite la juxtaposition des monomères lors de la cristallisation. Ceci est en accord avec les observations de plusieurs auteurs cités à la section 1.5.1.1.2.

3.3.4. Conclusions de ces expériences faites en microscopie électronique

Après avoir étudié l'effet de la concentration d'actine, de $MgCl_2$ et de lipides, nous pouvons conclure que les cristaux bidimensionnels d'actine se forment dans les conditions suivantes: 10 $\mu g/ml$ d'actine injectée dans une sous-phase contenant

3 mM de $MgCl_2$ et sur lequel est étalé un excès de lipides chargés positivement d'un facteur 2. L'excès de lipides est nécessaire puisqu'il crée des imperfections dans le film. Ces imperfections agissent comme germes de cristallisation et induisent la formation de cristaux bidimensionnels d'actine.

De plus, nous avons montré que la fluidité des films est un facteur important pour la cristallisation bidimensionnelle de l'actine. L'utilisation du EYPC nous a permis d'obtenir des cristaux bidimensionnels d'actine qui sont plus gros et plus compacts que ceux obtenus avec les mélanges de lipides qui contiennent du DLPC.

3.4. Étude de la formation de cristaux bidimensionnels d'actine sur un support solide

Le but de cette deuxième partie est de mettre au point les conditions de cristallisation bidimensionnelle de l'actine directement sur un support solide en s'inspirant de la technique de Langmuir-Blodgett modifiée par Uzgiris. Uzgiris (1986) a montré la possibilité d'obtenir des cristaux bidimensionnels de protéines directement sur une grille de microscopie électronique. L'utilisation de cette méthode donne pour certaines protéines des résultats supérieurs à la méthode de cristallisation sous un film de lipides étalé à l'interface air-eau. Nous allons appliquer cette méthode à l'actine.

3.4.1. Isothermes de EYPC seul et de mélanges EYPC:SA étalés à l'interface air-eau

Pour mettre au point la technique de Langmuir-Blodgett modifiée par Uzgiris, il est essentiel de déterminer l'aire moléculaire à laquelle se produit le collapse des films de lipides à l'interface air-eau. Les lipides sont étalés sur une phase aqueuse de faible force ionique (tampon G) puis comprimés avec la barrière mobile. On note la pression de surface (π) en fonction de l'aire moléculaire (A).

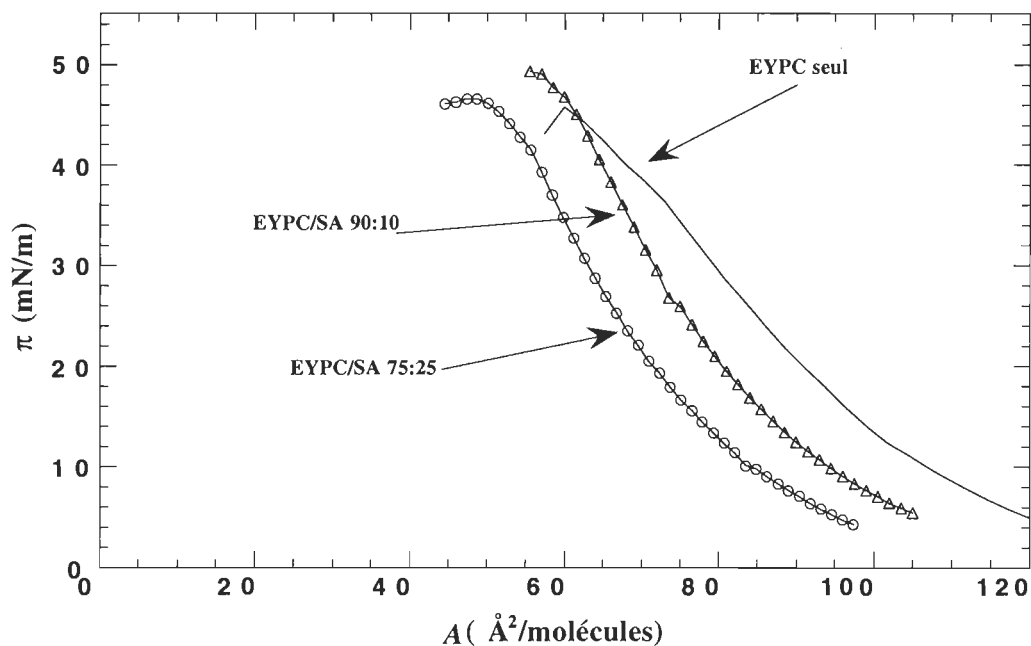


Figure 27

Graphique π - A de différents mélanges EYPC:SA. — représente l'isotherme de EYPC 100%. Δ montre l'isotherme d'un mélange EYPC:SA (90:10) et \circ , l'isotherme d'un mélange EYPC:SA (75:25).

Le graphique présenté à la figure 27 montre qu'à une pression donnée, l'aire moléculaire (A) moyenne des mélanges de lipides diminue en fonction de la quantité

de stéarylamine (SA). Ainsi, si nous prenons par exemple l'aire moléculaire de EYPC et des mélanges EYPC:SA (90:10) et EYPC:SA (75:25) à une pression de surface égale à 20 mN/m, elles sont respectivement de 91, 81 et 72 Å²/molécule.

Ceci s'explique par le fait que la SA est un lipide qui n'a qu'une seule chaîne acyle et par conséquent, a une aire moléculaire plus petite que les lipides contenus dans EYPC. Ainsi, plus le nombre de molécules de SA présentes dans les mélanges de lipides est élevé, plus l'aire moléculaire moyenne diminue.

Enfin, dans le même ordre d'idée, on note que l'aire moléculaire au collapse du mélange EYPC:SA (75:25) est de 51 Å²/molécule. Pour EYPC seul et EYPC:SA (90:10), les aires moléculaires au collapse se situent à 60 Å²/molécule.

Ces valeurs sont importantes car lors du transfert des films sur la grille de microscopie électronique, il faut que le film ait une cohésion maximale et qu'il n'y ait pas d'excès de lipides. Nous avons choisi d'utiliser des films constitués de EYPC:SA (75:25). Nous étalerons donc le film de lipides sur le bain en considérant que chaque lipide occupe une aire par molécule de 51 Å².

3.4.2. Recherche des conditions optimales pour l'obtention de filaments et de cristaux bidimensionnels d'actine par la technique de Langmuir-Blodgett modifiée par Uzgiris

3.4.2.1. Effet de la concentration d'actine sur la formation de filaments à la surface des lipides

La première condition étudiée est la concentration d'actine. Des grilles de microscopie électronique recouvertes d'une bicouche de lipides (EYPC:SA [75:25])

de type-Y sont incubées pour une période d'une heure avec des concentrations croissantes d'actine de 0 à 200 $\mu\text{g/ml}$ en présence de 3 mM de MgCl_2 . Nous avons noté la quantité de filaments d'actine présents dans chaque préparation.

Tableau 3.

Quantité de filaments observés en microscopie électronique en fonction de la concentration d'actine, incubée durant une heure sur une grille supportant une bicouche de lipides (EYPC:SA [75:25]) de type-Y, en présence de 3 mM de MgCl_2 .

	Concentration actine ($\mu\text{g/ml}$)				
	0	25	50	75	>100
Filaments	0	+	++	++	◇
Filaments superposés provenant de la sous-phase	0	0	+	+ / ++	+++

- 0 signifie une absence de filament;
 + signifie une quantité de filaments < 50 par champ;
 ++ signifie une quantité de filaments > 50 et < 200 par champ;
 +++ signifie une quantité de filaments > 200 par champ;
 ◇ signifie qu'il y a une très grande quantité de filaments. On ne peut plus les compter.

À des concentrations d'actine inférieures à 20 $\mu\text{g/ml}$, on observe peu de filaments sur la grille. À partir d'environ 25 $\mu\text{g/ml}$, la quantité de filaments augmente et au-delà de 75 $\mu\text{g/ml}$, la quantité de filaments est tellement élevée qu'on ne distingue plus les filaments les uns des autres car ils sont superposés. Cette superposition de filaments est due au fait que les filaments formés en sous-phase viennent s'adsorber sur le support. Ces filaments qui viennent de la sous-phase, sont longs et flexibles. Les filaments qui polymérisent sur la membrane sont rigides et ont un diamètre plus petit.

On peut conclure de cette expérience que la concentration optimale pour l'observation de filaments d'actine formés à la surface des lipides se situe entre 40 et 80 $\mu\text{g/ml}$. À ces concentrations, il y a de nombreux filaments qui se forment à la surface de la membrane. D'autre part, la quantité de filaments formés en sous-phase est faible, ce qui ne nuit pas à l'observation des filaments formés à la surface des lipides.

3.4.2.2. Effet du temps et de la température d'incubation de l'actine avec les lipides sur la formation de filaments

Les autres paramètres étudiés sont le temps et la température d'incubation de l'actine avec les lipides. Le tableau 4 représente la quantité de filaments observés en microscopie électronique sur le support en fonction du temps et de la température d'incubation. La concentration d'actine en sous-phase est de 100 $\mu\text{g/ml}$.

Pour une concentration de 100 $\mu\text{g/ml}$, on note une augmentation de filaments à partir de 30 minutes. À partir de 40 minutes et de 60 minutes pour des températures de 22 et 4°C respectivement, il y a présence de filaments superposés. La vitesse de formation et d'adsorption dépend donc de la température du milieu.

On peut conclure de cette expérience que la formation de filaments d'actine à la surface des lipides est plus rapide à une température de 22°C. À cette température, l'observation de filaments d'actine formés à la surface des lipides est optimale entre 30 et 60 minutes d'incubation.

Tableau 4.

Quantité de filaments observés en microscopie électronique en fonction du temps et de la température d'incubation de l'actine, sur une grille supportant une bicouche de lipides (EYPC:SA [75:25]) de type-Y en présence de 3 mM de $MgCl_2$ et pour une concentration d'actine de 100 $\mu g/ml$.

	Temps d'incubation (heure)				
	0	0,5	1	2	>5
Filaments (22°C)	0	+	++	+++	◇
Filaments superposés (22°C) provenant de la sous-phase	0	0	+	++	+++
Filaments (4°C)	0	0	+	++	+++
Filaments superposés (4°C) provenant de la sous-phase	0	0	0	+	++

- 0 signifie une absence de filament;
 + signifie une quantité de filaments < 50 par champ;
 ++ signifie une quantité de filaments > 50 et <200 par champ;
 +++ signifie une quantité de filaments >200 par champ;
 ◇ signifie qu'il y a une très grande quantité de filaments. On ne peut plus les compter.

3.4.2.3. Effet de la concentration en $MgCl_2$ sur la formation de filaments d'actine à la surface des lipides

Pour caractériser l'interaction actine-lipides sur support solide, nous avons évalué l'effet de différentes concentrations de $MgCl_2$ (0 à 3mM) sur la formation de filaments. La concentration d'actine est de 80 $\mu g/ml$ et le temps d'incubation est de 60 minutes à une température de 22°C. Le tableau 5 montre les résultats obtenus.

Les résultats présentés au tableau 5 montrent qu'à partir d'une concentration d'un peu moins de 0,75 mM de $MgCl_2$, il est possible d'observer des filaments d'actine. Par ailleurs, le tableau montre qu'à partir de 1,0 mM de $MgCl_2$, le nombre de filaments observés augmente rapidement jusqu'à 3 mM. À des concentrations supérieures à 3 mM de $MgCl_2$, nous n'observons pas plus de filaments (résultats non montrés).

Tableau 5.

Quantité de filaments observés en microscopie électronique en fonction de la concentration de $MgCl_2$ lorsqu'en présence de 80 $\mu g/mL$ d'actine incubée 60 minutes à 22°C.

	Concentration $MgCl_2$ (mM)				
	0	0,5	0,75	1	3
Filaments	0	0/+	+	++	+++
Filaments superposés provenant de la sous-phase	0	0	0	0/+	+

- 0 signifie une absence de filament;
- + signifie une quantité de filaments < 50 par champ;
- ++ signifie une quantité de filaments > 50 et <200 par champ;
- +++ signifie une quantité de filaments >200 par champ;

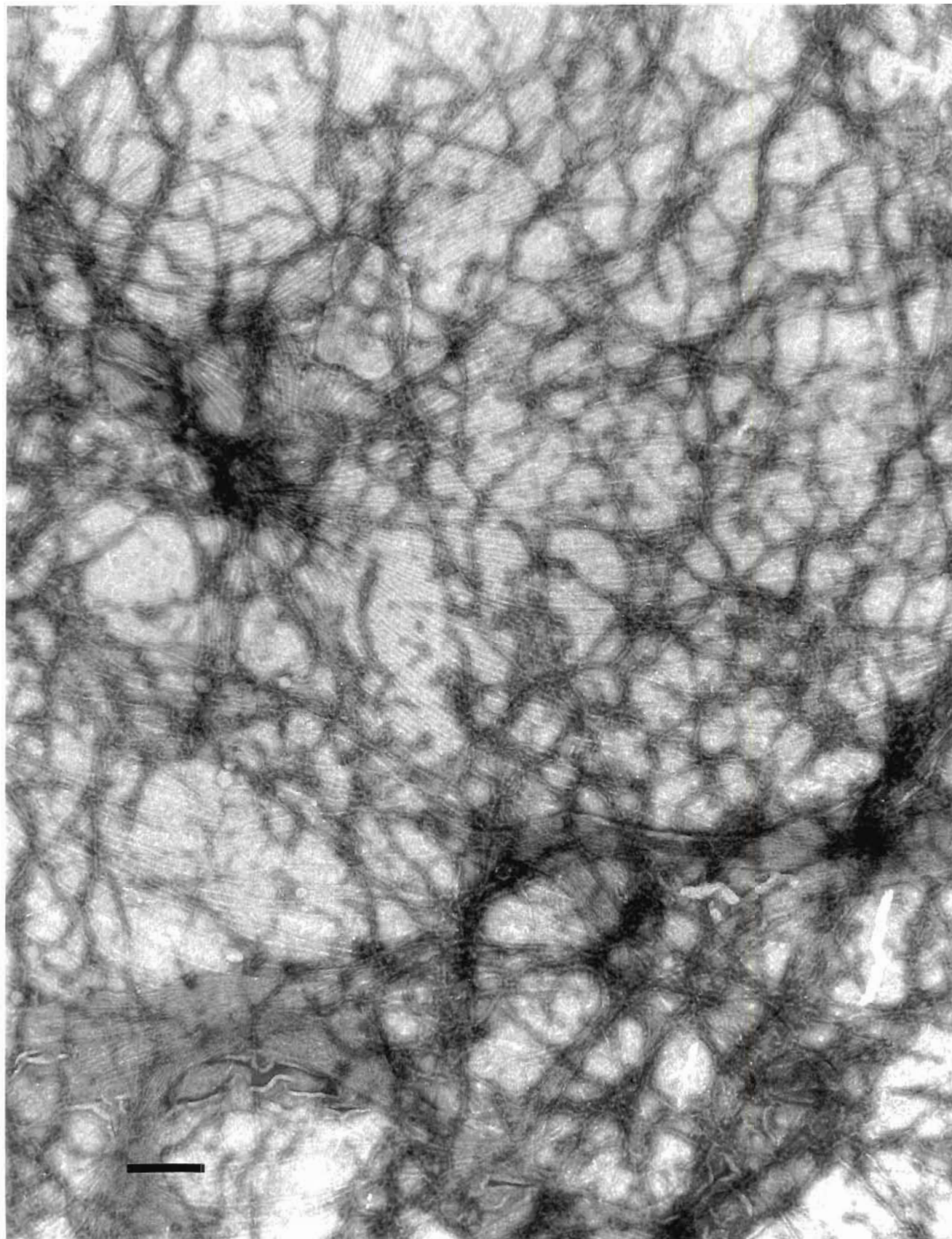
On peut conclure de cette expérience que la formation de filaments d'actine à la surface des lipides est liée à la présence de $MgCl_2$ en sous-phase.

3.4.3. Conditions optimales pour l'observation de cristaux bidimensionnels d'actine par la technique de Langmuir-Blodgett modifiée par Uzgiris

La section précédente (3.4.2.) nous a permis de mettre au point la technique de L.-B. modifiée par Uzgiris (1986) pour un système actine-lipides. Les résultats obtenus montrent que les meilleures conditions pour former des filaments d'actine sur la grille de microscopie électronique sont: une bicouche de EYPC:SA (75:25) incubée à 22°C durant une période de 30 à 60 minutes, sur un tampon contenant 2 à 3 mM de MgCl₂, en présence d'une concentration d'actine se situant entre 40 et 80 µg/ml.

Figure 28.

(Page suivante) Réseaux cristallins d'actine obtenus par la méthode de L.-B. modifiée par Uzgiris dans des conditions optimales de formation de filaments: une bicouche de lipides (EYPC:SA [75:25]) de type-Y déposée sur un tampon contenant 2 mM de MgCl₂ et 80 µg/ml d'actine. Le temps d'incubation est de 30 minutes à une température de 22°C. Barre = 250 nm.

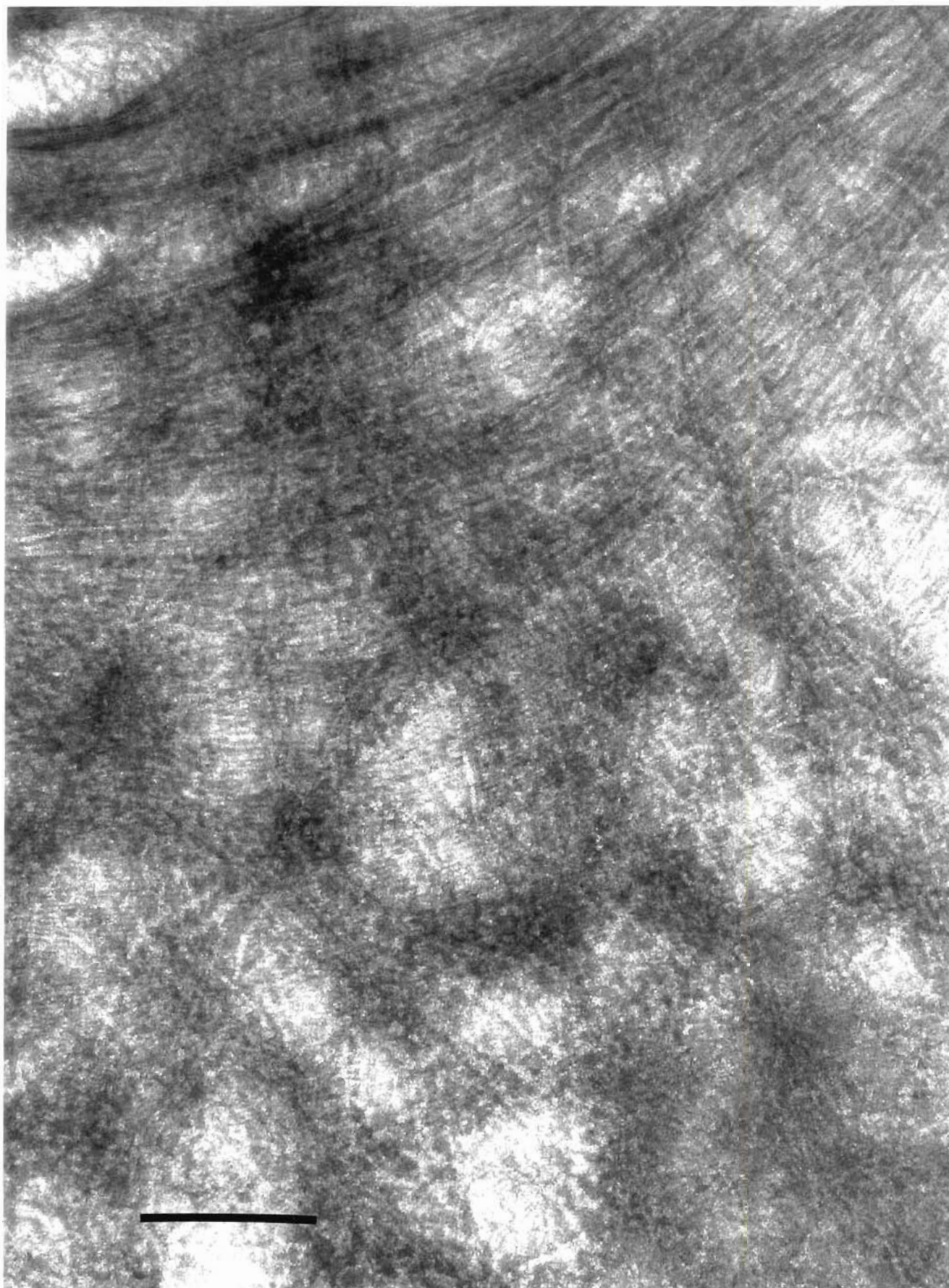


La figure 28 représente une préparation faite dans les conditions optimales: une bicouche de lipides (EYPC:SA [75:25]) de type-Y déposée sur un tampon G contenant 2 mM de $MgCl_2$ et 80 $\mu g/ml$ d'actine. Le temps d'incubation est de 30 minutes à la température de 22°C. Sur cette figure, on voit la présence de deux types de filaments. Le premier type est constitué de filaments rigides parallèles qui vont de part et d'autre du champ de la photo de façon à constituer un réseau cristallin. Ces filaments parallèles sont distants d'environ 15 nm. On doit remarquer que les filaments originent d'une imperfection membranaire constituée souvent de liposomes. Ceci suggère que ces imperfections servent de germe de cristallisation pour ces cristaux bidimensionnels.

Le deuxième type de filaments n'a pas d'organisation particulière. Ces filaments proviennent de la sous-phase et sont restés collés à la grille lors du prélèvement de l'échantillon. Ces filaments ont un diamètre plus large que le premier type de filaments et semblent flexibles.

Figure 29.

(Page suivante) Réseaux cristallins d'actine obtenus par la méthode de L.-B. modifiée par Uzgis dans des conditions optimales: une bicouche de lipides (EYPC:SA [75:25]) de type-Y déposée sur un tampon contenant 2 mM de $MgCl_2$ et 80 $\mu g/ml$ d'actine. Le temps d'incubation est de 30 minutes à la température de 22°C. Barre = 250 nm.



La figure 29 montre une préparation faite dans des conditions qui favorisent la cristallisation: une bicouche de lipides (EYPC:SA [75:25]) de type-Y déposée sur du tampon G contenant 2 mM de $MgCl_2$ et 80 $\mu g/ml$ d'actine. Le temps d'incubation est de 30 minutes à 22°C. Sur cette figure, on note la présence d'un cristal bidimensionnel d'actine constitué de filaments parallèles. Dans ce cas, la distance entre les filaments est faible, de l'ordre de 2,7 nm. Les filaments qui composent ce cristal ont un diamètre moyen de 7,3 nm. Ce cristal se trouve à proximité d'un barreau de la grille de M.É, zone qui n'est pas parfaitement plane, ce qui suggère que le bord de la grille a agi comme un germe de cristallisation.

On note aussi la présence de filaments qui proviennent de la polymérisation de l'actine en sous-phase. Ils ont les mêmes caractéristiques morphologiques que ceux présentés à la figure 28.

Nous avons donc établi que, avec la technique de Langmuir-Blodgett modifiée par Uzgiris, les conditions pour obtenir de beaux cristaux bidimensionnels d'actine sont les suivantes: une bicouche de lipides (EYPC:SA [75:25]) de type-Y déposée sur un tampon G contenant 2 mM de $MgCl_2$ et 80 $\mu g/ml$ d'actine, avec un temps d'incubation de 30 minutes à une température de 22°C.

3.4.4. Conclusions sur l'étude de la formation de cristaux bidimensionnels d'actine sur support solide

La formation de cristaux bidimensionnels d'actine est possible sur un support solide. Les cristaux bidimensionnels d'actine se forment à partir des imperfections de la grille qui servent de germes de cristallisation. Selon le type de germe de

crystallisation, les cristaux ont deux morphologies. Lorsqu'ils prennent naissance à partir de liposomes ou de micelles, les filaments rayonnent à partir du germe de cristallisation et sont alors très espacés les uns des autres. Lorsque le cristal origine d'une imperfection de la membrane comme une dépression de la grille ou un barreau de grille, l'espacement entre les filaments est faible, et les cristaux sont plus compacts.

Les cristaux formés par la technique de Langmuir-Blodgett modifiée par Uzgiris sont plus gros et surtout plus nombreux et que ceux obtenus par la technique des monocouches, c'est-à-dire avec des excès de lipides étalés à l'interface air-eau. La technique de Langmuir-Blodgett modifiée par Uzgiris (1986) donne donc de meilleurs résultats pour la formation de cristaux bidimensionnels d'actine.

Connaître les conditions dans lesquelles l'actine forme des cristaux bidimensionnels sur support solide est une étape importante pour de nouvelles techniques, comme la microscopie à champ proche, la diffraction des rayons X sur support solide, la cryomicroscopie électronique, etc qui permettront d'étudier la structure de l'actine filamenteuse dans des conditions plus proches des conditions qui existent *in vivo*.

CHAPITRE IV: DISCUSSION

4.1. Critique des techniques

4.1.1. Les monocouches

Nous avons utilisé la technique des monocouches pour quantifier les interactions actine-lipides. Cette technique est très sensible à toute contamination externe pouvant affecter les mesures de tension de surface. C'est pourquoi, chaque expérience nécessitait l'utilisation d'un capteur de tension de surface et de bains en Téflon™ qui étaient exempts de toute contamination organique. De plus, tous les solvants utilisés pour étaler les lipides étaient distillés. Ces procédures de nettoyage sont décrites à la section "matériel et méthodes".

L'étude des films actine-lipides requiert l'élaboration de protocoles techniques rigoureux. Toutes les étapes des techniques telles que la température de la sous-phase, l'étalement des lipides et l'injection de l'actine étaient respectées à la lettre. L'utilisation des protocoles décrits à la section "matériel et méthodes" nous donnaient des résultats reproductibles pour des expériences préparées dans les mêmes conditions.

4.1.2. Microscopie électronique

La microscopie électronique a été utilisée pour observer les filaments et/ou les cristaux bidimensionnels dans nos préparations. Bien que notre but n'était pas de

faire une étude microscopique quantitative de l'actine, il n'en demeure pas moins qu'une question fondamentale subsiste: ce que l'on voit en microscopie électronique, est-ce réellement ce qui se retrouve *in situ*? Pour répondre à cette question, nous discuterons de deux facteurs: *la méthode de récupération des films* et *l'effet du colorant sur nos préparations*.

4.1.2.1. La méthode de récupération des films

La méthode de récupération des films est un facteur clef pour l'étude en microscopie des préparations. Nous avons essayé deux méthodes de récupération: la méthode de l'arrachage et la méthode du changement de niveau.

La méthode de l'arrachage consiste à déposer une grille de microscopie électronique hydrophobe directement sur un film de lipides. L'hydrophobicité de la grille permet aux chaînes acyls des lipides d'adhérer à la grille. Cette technique est illustrée à la figure 30.

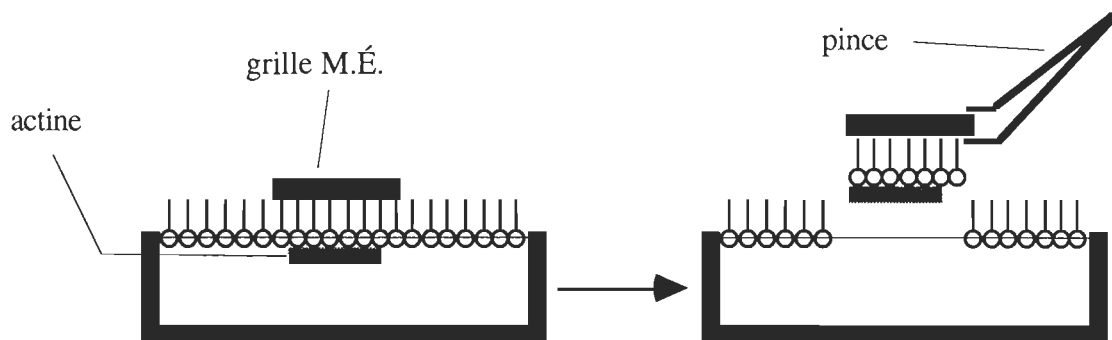


Figure 30.
Schéma illustrant la méthode de l'arrachage.

Par cette technique nous pouvons récupérer les filaments et des cristaux bidimensionnels d'actine présents dans les préparations. Cependant, le choc mécanique causé lors de l'arrachage nous mène à nous poser la question suivante: quel est le pourcentage de récupération des cristaux? En effet, quelle est la proportion du film qui adhère à la grille et d'autre part, quel peut être l'effet de l'arrachage sur la morphologie des cristaux bidimensionnels d'actine.

Afin d'éviter les problèmes causés lors de la méthode de l'arrachage, nous avons développé une autre technique de récupération: la méthode du changement de niveau.

La méthode du changement de niveau consiste à placer une grille hydrophobe sur un petit socle au fond du bain. Par la suite, on abaisse le niveau de la sous-phase jusqu'à ce que le film se dépose sur la grille. Cette technique est illustrée à la figure 31.

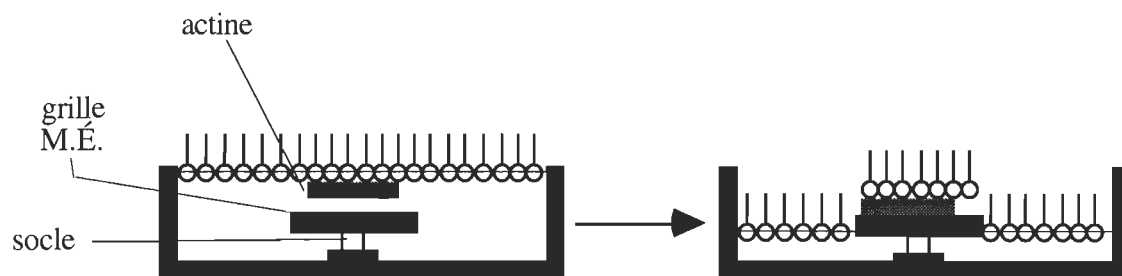


Figure 31.
Schéma illustrant la méthode du changement de niveau.

En utilisant cette technique, rarement nous observons des filaments ou des cristaux bidimensionnels. Ce phénomène s'explique par le fait qu'avec une grille hydrophobe, lorsque le niveau du liquide atteint la grille, il se forme un ménisque

qui balaie la surface de la grille et entraîne la plupart du matériel. D'autre part, lorsque nous utilisons une grille rendue hydrophile par un traitement aux U.V., nous n'observons pas plus de filaments ou de cristaux bidimensionnels d'actine, car le film de lipides empêche le colorant de pénétrer et d'être en contact avec les molécules d'actine qui se trouvent entre la grille et les lipides.

Malgré les chocs mécaniques qui peuvent influencer le pourcentage de récupération, la méthode de l'arrachage est la meilleure et c'est elle que nous avons utilisée pour faire la plupart des expériences. Avec cette méthode, nous avons récupéré, puis observé des filaments et des cristaux bidimensionnels d'actine de façon reproductible.

4.1.2.2. L'effet du colorant sur les préparations

Nos préparations ont été colorées à l'acétate d'uranium, colorant classique en microscopie électronique. L'acétate d'uranium est un sel qui donne une solution très acide. Or le pH et la concentration de sels influencent la polymérisation et la cristallisation de l'actine. On doit donc se demander si le colorant lui-même n'influence pas les préparations. Il est difficile de répondre à cette question. Cependant, comme toutes les préparations ont été faites avec le même colorant, si le colorant a un effet sur les préparations, il sera le même partout et les différences observées entre nos préparations résultent bien du traitement de chacune.

D'autre part, il nous paraît peu probable que le colorant influence nos préparations car le temps de contact entre le colorant et nos préparations est très court, quelques secondes.

De plus, dans un travail publié par Bremer *et al.* (1992), les auteurs ont étudié l'influence de l'acétate d'uranium sur la qualité de différents cristaux de protéines. Ces derniers ont noté que l'acétate d'uranium influence de façon négligeable la morphologie des cristaux. Par ailleurs, il est important de rappeler ici que le but de notre travail était de décrire les conditions de cristallisation bidimensionnelle de l'actine et non de faire une étude structurale du filament. Même si l'acétate d'uranium affecte la qualité des cristaux, elle n'affecte pas les conditions où l'actine forme des cristaux bidimensionnels.

Les filaments et les cristaux bidimensionnels d'actine que nous avons obtenus lors de nos expériences sont présents dans nos préparations. Cependant, les cristaux observés en microscopie électronique ne sont peut-être pas représentatifs de ceux qui sont présents *in situ*. Seules les techniques de diffraction X à l'interface pourraient nous permettre de savoir quelle est la qualité des cristaux bidimensionnels d'actine, c'est-à-dire sur leur niveau de cohésion et la présence ou l'absence d'imperfection..

4.2. Importance de la quantité de lipides sur la formation de filaments et de cristaux bidimensionnels d'actine

La présence de filaments ou de cristaux bidimensionnels d'actine repose en grande partie sur l'existence d'*imperfections* du film lipidique. En effet, rappelons que les auteurs qui pratiquent la cristallisation bidimensionnelle de protéines avec des membranes constituées de lipides utilisent un excès de lipides. Cet excès de lipides

est nécessaire parce qu'il sert, selon ces auteurs, de *gouttes réservoirs*. Ces gouttes remplacent les molécules de lipides perdues qui adhèrent aux bords du bain.

Nos résultats suggèrent que l'interprétation de Mosser *et al.* (1991) de la goutte réservoir est fautive. En effet, nos observations montrent que les imperfections membranaires retrouvées dans nos films de lipides (hémimicelles, micelles et liposomes) servent de germe de nucléation. Plus il y a d'imperfections dans le film, plus nous observons de filaments et de cristaux bidimensionnels. Cette hypothèse est en accord avec les résultats de Saint-Onge & Gicquaud (1990) puisque ceux-ci montrent que l'utilisation de liposomes est très efficace pour cristalliser l'actine. Or, une solution de liposomes est un système où il y a excès de lipides.

Maintenant comment peut-on interpréter le fait que la présence d'imperfections dans le film permet la formation de filaments et de cristaux bidimensionnels d'actine. Selon nous, la présence d'imperfections comme les hémimicelles, les micelles et/ou les liposomes, offre aux monomères la possibilité de s'organiser plus facilement. En d'autres termes, les structures comme les liposomes peuvent se déformer et s'adapter à l'actine. Ce mouvement des lipides facilite l'interaction avec l'actine pour former des filaments, puis des cristaux bidimensionnels.

Dans les systèmes utilisés pour la cristallisation de protéines, la fluidité de la membrane est importante, non pas seulement pour les mouvements latéraux des lipides comme le stipulait Mosser *et al.* (1991), mais aussi pour les mouvements de cisaillement. Ces mouvements permettent aux protéines de mieux s'associer, dans un premier temps, avec les lipides chargés. Dans un deuxième temps, le mouvement latéral des lipides permet aux monomères de s'associer monomère par monomère

pour former une structure cristalline. Ainsi, une bonne déformabilité de la membrane facilite la polymérisation de l'actine à la surface des lipides. Les expériences faites avec des lipides qui ont une plus grande fluidité donnent des cristaux très compacts car des lipides plus mobiles permettent un meilleur déplacement de l'actine à la surface de la membrane.

Nos résultats montrent qu'un excès de lipides est essentiel pour la formation de cristaux bidimensionnels d'actine. Cependant, nous n'observons pas de cristaux lorsque nous avons un excès de lipides d'un facteur 4, ce qui est en contradiction avec notre affirmation précédente. En fait, nous suggérons qu'en présence d'un fort excès de lipides, les cristaux d'actine formés à la surface des lipides ne sont pas récupérés car ils n'adhèrent pas à la grille. Ce phénomène est illustré à la figure 32.

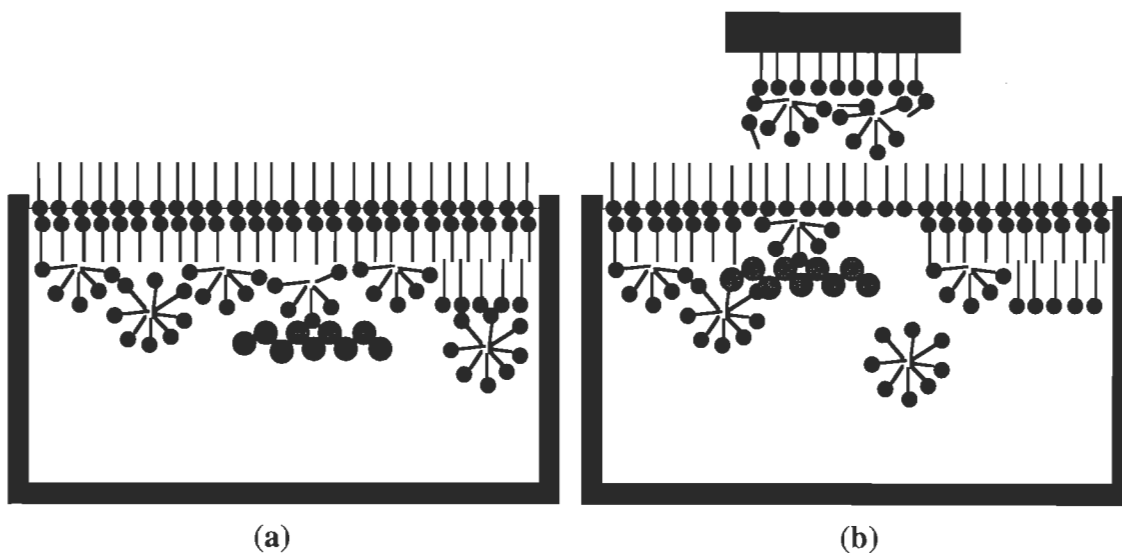


Figure 32.

Schéma montrant l'effet possible des multicouches de lipides sur la récupération des cristaux d'actine sur des grilles de microscopie électronique. En (a), une interface avec un excès de lipides d'un facteur 4. En (b), on voit une grille de M.É. recouverte de lipides. L'excès de lipides empêche l'adhésion des cristaux d'actine à la grille.

4.3. Relation entre imperfections membranaires et la formation de filaments et cristaux bidimensionnels d'actine observés dans la technique de Langmuir-Blodgett modifiée par Uzgiris

Les cristaux bidimensionnels d'actine sont plus abondants lorsqu'il y a des imperfections dans la membrane. Les imperfections membranaires retrouvées dans la technique de L.B. modifiée par Uzgiris sont de deux types:

Le premier type d'imperfections dépend du support utilisé. Bien que la grille de microscopie électronique soit recouverte d'un film de formvar™-carbone, cela n'en fait pas un support parfaitement plan comme l'indique la figure 33.



Figure 33.

Schéma montrant une vue latérale de deux grilles de microscopie électronique recouvertes d'un polymère (Formvar™), d'une couche de carbone et enfin d'une bicouche lipidique. (a) Schéma classique assumant une surface parfaitement plane. En (b), schéma se rapprochant de la réalité. On voit les imperfections causées par les barreaux de la grille de microscopie électronique. La membrane n'est pas plane entre les barreaux.

En effet, une grille de microscopie électronique est constituée d'une série de barreaux, les barreaux. Le film de Formvar™ entre deux barreaux n'est pas tendu, mais a un certain rayon de courbure. Les observations que nous avons faites dans la section 3.4.3, montrent que le rayon de courbure est plus accentué près des bords des barreaux. Cette courbure permet la nucléation puis la polymérisation de l'actine en filaments et en cristaux bidimensionnels.

Le deuxième type d'imperfections est relié à la présence de liposomes et/ou micelles dans les préparations. Ces imperfections membranaires peuvent avoir deux origines:

- premièrement, mentionnons les impondérables de la technique de déposition des films lipidiques lors de leur transfert. En effet, au moindre choc, vibrations ou mouvements brusques, il peut y avoir désorganisation locale des lipides de la membrane et formation d'irrégularités.
- deuxièmement, la présence d'imperfections membranaires dépend de certains composants dont les lipides insaturés des films lipidiques. Chen *et al.* (1992) ont montré que l'utilisation de lipides insaturés dans les techniques de Langmuir-Blodgett conduit à des problèmes de transfert. Dans un ouvrage exhaustif, ce groupe a noté entre autres que plus un film possède de lipides insaturés, plus il se formera d'irrégularités lors du transfert tel qu'illustré à la figure 34.



Figure 34.

Schéma montrant différentes organisations que peut avoir une bicouche de lipides déposée sur un support solide. En (a), un lipide saturé prend une structure régulière. En (b), l'insaturation d'un lipide induit la formation d'une bicouche irrégulière qui peut aller jusqu'à la formation des hémimicelles et des micelles.

Comme nous avons utilisé dans certaines expériences l'EYPC comme constituant principal de nos films et que l'EYPC contient surtout des lipides insaturés, il y a eu probablement formation de nombreuses imperfections dans ces films.

Suite à ces observations, on peut se demander si les imperfections de la membrane expliquent l'observation d'un plus grand nombre et de plus grands cristaux. En effet, nos résultats montrent qu'on observe beaucoup plus de filaments et de cristaux bidimensionnels d'actine lorsqu'il y a des imperfections membranaires. Si nous augmentons le nombre d'imperfections, il se formera plus de filaments et/ou de cristaux. Ainsi, la technique de L.-B. modifiée par Uzgiris donne de meilleurs résultats que la technique des monocouches avec excès de lipides car il y a plus d'imperfections membranaires.

D'autre part, la quantité de lipides présents sur la grille de microscopie électronique est probablement plus importante avec la technique de L.-B. qu'avec la technique des monocouches. Dans la technique d'Uzgiris, la grille est rendue hydrophile par traitement aux U.V. La bicouche que l'on forme sur la grille recouvre toute la surface. Par contre, avec la technique des monocouches, la couche de carbone déposée sur la grille rend la grille hydrophobe, mais l'hydrophobicité de la surface n'est pas uniforme. Il y a donc moins de lipides qui adhèrent à la grille, ce qui explique pourquoi nous observons moins de cristaux d'actine par la technique des monocouches.

4.4. Proposition d'un mécanisme de polymérisation et de cristallisation de l'actine à la surface des lipides

Dans ce travail, nous avons étudié et observé l'interaction actine-lipides à l'interface eau-lipides, ainsi que sur support solide. Nous avons noté plusieurs faits qui nous permettent de proposer un mécanisme de polymérisation et de cristallisation de l'actine à la surface des lipides. Ce mécanisme s'appuie en partie sur le mécanisme

d'interaction actine-lipides proposé par St-Onge & Gicquaud (1990) et illustré à la figure 35.

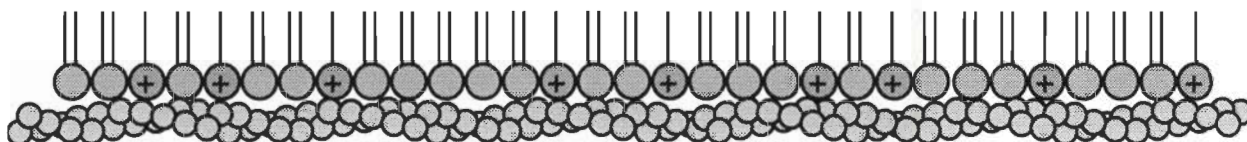


Figure 35.

Schéma montrant le mécanisme d'interaction actine-lipides proposé par St-Onge & Gicquaud (1990).

Comme le montre la figure 35, ce mécanisme est basé sur l'attraction électrostatique entre les charges positives de la membrane et les charges négatives de l'actine. Ce mécanisme montre une interaction et une formation de filaments et/ou de cristaux bidimensionnels à la surface d'une membrane plane.

Le mécanisme de polymérisation et de cristallisation de l'actine que nous proposons met l'accent sur le rôle des imperfections membranaires qui permettent la nucléation, la formation de filaments, puis de cristaux d'actine. Ces mécanismes sont présentés aux figures 36 et 37.

La figure 36 montre un mécanisme que nous proposons pour la polymérisation de l'actine à la surface de lipides chargés positivement, en absence de $MgCl_2$ dans la sous-phase. On note l'absence de filament en sous-phase puisqu'il n'y a pas de $MgCl_2$ qui puisse induire la polymérisation de l'actine en sous-phase. Dans ce mécanisme, nous proposons que la nucléation se produit là où la SA est facilement accessible, c'est-à-dire dans les zones d'imperfections membranaires (hémimicelles et/ou micelles). Les filaments ainsi formés sont courts puisque leur élongation n'est

possible que par l'ajout de monomères qui ont changé de conformation suite à leur interaction avec la SA présente dans la membrane.

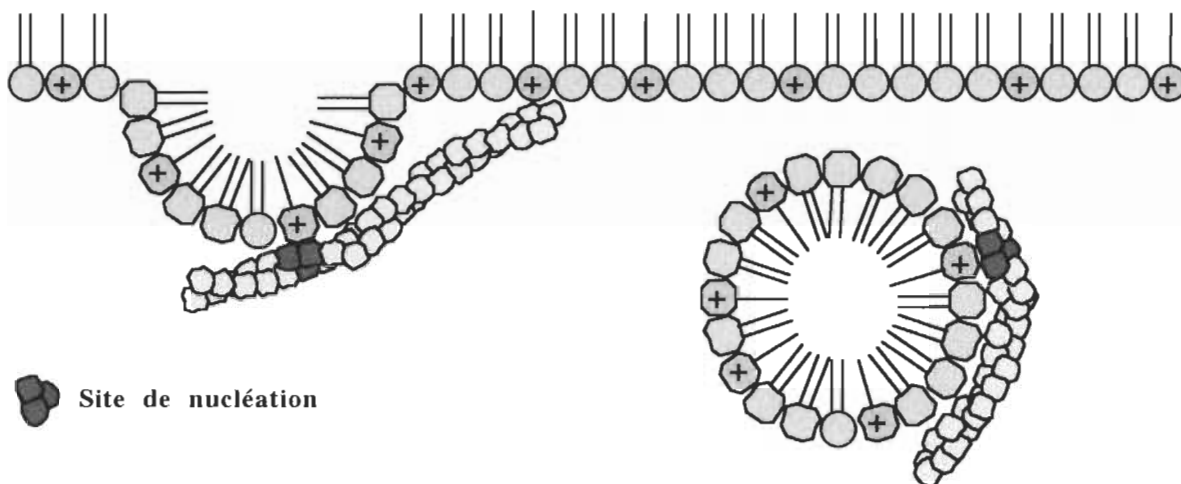


Figure 36.

Schéma d'un mécanisme de polymérisation de l'actine à la surface des lipides, en absence de $MgCl_2$.

La figure 37 montre un mécanisme de cristallisation de l'actine à la surface de lipides chargés positivement, en présence de $MgCl_2$ en sous-phase. Dans ce mécanisme, le $MgCl_2$ présent dans la sous-phase facilite la croissance des filaments et augmente l'affinité latérale des filaments pour former des cristaux bidimensionnels

Selon le mécanisme présenté à la figure 37, l'actine subit une nucléation sur la membrane grâce à la SA mais aussi dans la sous-phase grâce au Mg^{2+} . Dans ce type de préparation, la croissance des filaments ne dépend pas seulement de la SA qui n'est présente que dans la membrane. Pour cette raison, les filaments observés dans les systèmes contenant du $MgCl_2$ sont plus longs et plus nombreux.

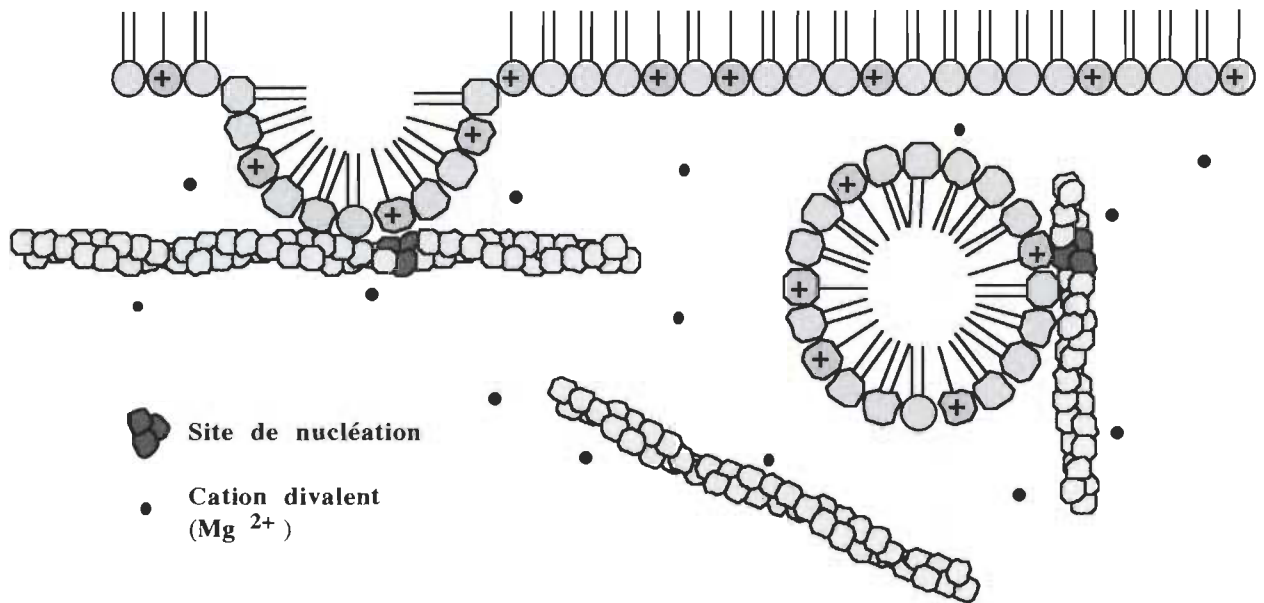


Figure 37.

Schéma montrant un mécanisme proposé pour la cristallisation de l'actine à la surface de lipides, en présence de 2 mM de MgCl₂.

Dans ces préparations, il y a une concentration des charges positives dans la sous-phase près des membranes. En plus de la présence de SA dans la membrane, le Mg²⁺ est attiré par les lipides neutres. Lorsque les monomères d'actine remontent à la surface, ils se fixent à la SA et forment des filaments. Les ions Mg²⁺ présents lient l'actine et augmentent l'affinité latérale des filaments. Les filaments se juxtaposent en phase et forment des cristaux bidimensionnels. Ces cristaux possèdent la même morphologie que les cristaux de Hanson qui se forment en présence d'un excès de charges positives, mais en trois dimensions.

De plus, en présence de MgCl₂, les monomères peuvent former des filaments en sous-phase. Les filaments formés en sous-phase se superposent sur les cristaux bidimensionnels formés sur les membranes. On peut distinguer ces filaments de

ceux formés sur les membranes puisqu'ils sont longs, en forme de vague et qu'ils n'ont pas d'organisation particulière.

4.5. Poursuite des études d'interactions actine-lipides dans les systèmes bidimensionnels

Ce travail jette les bases d'une nouvelle approche pour l'étude des interactions actine-lipides. Dans le passé, ces interactions ont été étudiées par l'équipe de Gicquaud avec des liposomes. Il y avait très peu de travaux faits sur l'actine en monocouche. Compte tenu de l'importance de ce projet dans un contexte de recherche fondamentale, il appert essentiel de poursuivre les travaux sur les interactions actine-lipides en monocouche. Nous suggérons que ces études prennent deux approches: *l'étude des forces en jeu dans les interactions actine-lipides et la poursuite de l'étude de la structure du filament d'actine.*

4.5.1. Étude des forces régissant les interactions actine-lipides

Nous avons montré que l'actine peut modifier le comportement des lipides étalés à l'interface air-eau. Ce phénomène est intéressant puisqu'il suggère la possibilité que l'actine puisse modifier la rigidité des membranes cellulaires. Puisqu'il n'existe pas de lipides chargés positivement dans les cellules, nous suggérons que ce travail se poursuive en mesurant les forces d'interactions avec les lipides que l'on trouve dans les membranes naturelles. Ces expériences peuvent être faites par la technique des monocouches. De plus, puisque l'on peut avec cette technique mesurer les

interactions actine-lipides, il serait intéressant de voir avec quels lipides membranaires l'actine interagit le plus.

Dans un deuxième temps, les mesures d'interactions peuvent être faites en parallèle avec des expériences de rhéométrie interfaciale en utilisant des sondes fluorescentes attachées à des lipides étalés à l'interface air-eau (FRAP). Outre l'affinité de l'actine pour les lipides, on pourra aussi évaluer la rigidité des films en interaction avec l'actine. Cependant, l'utilisation de sondes fluorescentes n'est pas évidente puisque les sondes peuvent influencer le système que l'on étudie. Pour pallier à cet effet, il existe une technique que l'on appelle torsiométrie interfaciale. Cette technique consiste à mesurer la capacité d'un film étalé à l'interface air-eau à résister à des contraintes de torsion. Cette technique a déjà été utilisée avec l'actine pour mesurer son interaction avec la severine (Müller *et al.* 1991). À l'heure actuelle, aucune expérience n'a utilisé cette technique pour mesurer l'interaction actine-lipides.

4.5.2. Étude de la structure du filament d'actine

L'étude structurale de l'actine a toujours fasciné un grand nombre de chercheurs. Compte tenu de la grande difficulté à cristalliser cette protéine, l'analyse structurale de l'actine filamenteuse non co-cristallisée s'est limitée à l'utilisation du microscope électronique (Hanson 1967; Ward *et al.* 1990; Taylor & Taylor 1992), à la cryomicroscopie électronique (Steinmetz *et al.* 1997) et à la technique de mesure du transfert d'énergie de fluorescence ou Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) (Miki *et al.* 1992).

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, les résultats obtenus par ces techniques ont mené à la proposition de différents modèles de l'actine filamenteuse. Cependant, selon les techniques utilisées, on obtient différents modèles de la morphologie du filament. Ces différences morphologiques sont l'objet de grandes controverses entre les auteurs (Grazi 1997; Egelman *et al.* 1997; Schutt *et al.* 1997; Steinmetz *et al.* 1997). La connaissance de la structure de l'actine filamenteuse permettrait une meilleure compréhension de l'actine tant au niveau de la contraction musculaire que de tous les phénomènes reliés à la motilité cellulaire.

Afin de contribuer davantage à l'étude de la structure de l'actine filamenteuse, nous proposons d'explorer deux approches. Tout d'abord, la microscopie des filaments ou des cristaux bidimensionnels pourrait être faite par la microscopie à champ proche (STM et AFM). Cette technique n'a pas encore été utilisée pour l'actine sur des préparations de Langmuir-Blodgett que nous avons mis au point et décrit dans ce travail.

D'autre part, il serait intéressant, pour la microscopie à champ proche de même que pour la microscopie électronique, de mettre au point la technique d'adsorption de protéoliposomes actine-lipides sur support solide plan (Puu & Gustafson 1997). Cette technique consiste à faire adsorber sur un support plan des liposomes en solution. En s'adsorbant, les liposomes prennent l'aspect d'une membrane plane sur le support. Comme nous l'avons mentionné tout au long de ce travail, l'obtention de cristaux bidimensionnels d'actine en monocouche est difficile puisque les cristaux bidimensionnels d'actine se forment à partir d'imperfections de la membrane. De plus, l'utilisation de $MgCl_2$ dans la sous-phase nuit à l'observation des structures

d'actine situées au contact des lipides puisque les filaments situés en sous-phase viennent se superposer.

La préparation des cristaux bidimensionnels d'actine sur des liposomes chargés positivement, en absence de $MgCl_2$, et l'adsorption sur des surfaces planes, rend possible une analyse structurale plus fine du filament d'actine. Cette méthode permettrait de contourner les difficultés inhérentes aux techniques des monocouches, en plus de contourner le principal obstacle des liposomes, leur rayon de courbure.

Pour terminer cette section, comment ne pas mentionner l'utilisation de techniques spectroscopiques pour mettre en évidence les modifications structurales de l'actine au contact des lipides. Dans un travail publié récemment par Bombardier *et al.* (1997), on faisait appel à l'infra-rouge sous haute pression pour mettre en évidence les changements de conformation de l'actine au contact des lipides. Les résultats montrent de légères modifications au niveau de la bande amide de l'actine. Cependant, on peut se demander quel est l'effet des hautes pressions sur la structure originale de la protéine et donc des conclusions indiquant les modifications conformationnelles de l'actine au contact des lipides.

Dhuly *et al.* (1988) ont mis au point une technique d'analyse spectroscopique interfaciale d'infra-rouge par modulation de polarisation (PM-IRRAS). Cette technique permet d'étudier *in situ*, dans des conditions contrôlées, les interactions protéines-lipides à l'interface air-eau (monocouches). Ce qui est intéressant de souligner dans cette technique, c'est que les différents constituants (protéines et lipides) se retrouvent dans des conditions se rapprochant de celles rencontrées

in vivo. De plus, l'utilisation d'un faisceau lumineux polarisé permet d'éviter l'utilisation d'eau deutérée. Par cette technique, il serait intéressant d'étudier les conformations de l'actine lorsqu'elle s'adsorbe à l'interface des lipides avec et en absence de $MgCl_2$ en sous-phase.

CHAPITRE V: CONCLUSIONS

Les résultats présentés dans le cadre de cette étude, nous permettent de conclure que l'actine développe des interactions avec les lipides étalés à l'interface air-eau. L'actine augmente la rigidité du film de lipides étalé à l'interface air-eau et augmente l'énergie nécessaire pour comprimer le film. Ces modifications sont plus grandes lorsque la membrane est chargée positivement, ce qui amène une interaction électrostatique entre l'actine de charge négative et la stéarylamine de charge positive. On note de façon générale que la présence de $MgCl_2$ en sous-phase augmente l'interaction de l'actine avec les lipides.

L'étude en microscopie électronique nous permet de conclure que l'actine polymérise à la surface des membranes chargées positivement, en absence de $MgCl_2$. Il doit y avoir un excès de lipides qui agit comme germe pour permettre l'assemblage des monomères en filaments. Ces derniers sont alors courts. Par contre, la présence de $MgCl_2$ en sous-phase permet la formation sur les membranes de filaments plus longs et plus nombreux. Ces filaments tendent à se juxtaposer en phase de façon à former des cristaux bidimensionnels. Nous avons défini les conditions qui favorisent la formation de ces cristaux bidimensionnels.

Nos résultats montrent qu'il est possible d'obtenir des cristaux par la méthode de Langmuir-Blodgett modifiée par Uzgiris. Après avoir mis au point les conditions nécessaires à la cristallisation de l'actine sur un support solide (grille de microscopie électronique), nous avons obtenu de plus gros cristaux par cette technique que par la technique de cristallisation sous une interface de lipides. La technique L.-B.

modifiée par Uzgis est donc meilleure pour la formation de cristaux bidimensionnels d'actine pour la microscopie électronique.

L'ensemble des résultats nous a permis de proposer un mécanisme de polymérisation et de cristallisation bidimensionnelle de l'actine à la surface des lipides. Selon ce mécanisme, la formation de cristaux bidimensionnels se fait à partir d'imperfections membranaires qui servent de germes de cristallisation.

RÉFÉRENCES

- Ahlers, M., Darst, S.A., Grainger, D.W., Kornberg, R.D., Müller, W., Reichert, A., Ringsdorf, H., Rump, E., & Salesse, C. Interaction of Proteins with Functional Monolayers: Recognition, 2D-Crystallization and Function: In: Proc. XII Int'l. Cong. *Electron Microsc.*, Seattle, WA., 1990, pp. 608-609.
- Alberts, B. *Molecular Biology of the Cell*. 3ième édition, Garland Publication, New-York, 1994, 1294 pages
- Alkire, R.W., & Rotella, F.J. An Incident-Beam Monitor for Use in Protein Crystallography at a Synchrotron Source. *J. Appl. Cryst.*, 1997, **30**, 327-332.
- Asturias, F.J., & Kornberg, R.D. A Novel Method for Transfer of Two-Dimensional Crystals from the Air/Water Interface to Specimen Grids. EM Sample Preparation/Lipid-Layer Crystallization. *J. Struct. Biol.*, 1995, **114**, 60-66.
- Avila-Sakar, A.J., Guan, T.-L., Arad, T., Schmid, M.F., Loke, T.W., Yonath, A., Piefke, J., Franceschi, F., & Chiu, W. Electron Cryomicroscopy of *Bacillus stearothermophilus* 50S Ribosomal Subunits Crystallized on Phospholipids Monolayers. *J. Mol. Biol.*, 1994, **239**, 689-697.
- Avila-Sakar, A.J., & Chiu, W. Visualization of β -Sheets and Side Chain Clusters in Two-Dimensional Periodic Arrays of Streptavidin on Phospholipids by Electron Crystallography. *Biophys. J.*, 1996., **70**, 57-68.
- Barden, J.A., Curmi, P.M.G., & dos Remedios, C.G. Crystalline Actin Tubes. III. The Interaction of Scandium and Yttrium with Skeletal Muscle Actin. *Biochim. Biophys. Acta*, 1981a, **671**, 25-32.
- Barden, J.A., Tulloch, P.A., & dos Remedios, C.G. Crystalline Actin Tubes. IV. Structural Information on Actin Monomers Obtained from Computer-Averaged Lattice Images. *J. Biochem.*, 1981b, **90**, 287-290.
- Bombardier, H., Wong, P., & Gicquaud, C. Effects of Nucleotides on the Denaturation of F-Actin: A Differential Scanning Calorimetry and FTIR Spectroscopy Study. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1997, **236**, 798-803.
- Boyle III, J., & Mautone, A.J. A New Surface Balance for Dynamic Surface Tension Studies. *Colloids and Surfaces*, 1982, **4**, 77-85.
- Bremer, A., Henn, C., Engel, A., Baumeister, W., & Aepli, U. Has Negative Staining Still a Place in Biomacromolecular Electron Microscopy? *Ultramicroscopy*, 1992, **46**, 85-111.

- Brisson, A., Mosser, G., & Huber, R. Structure of Soluble and Membrane-Bound Human Annexin IV. *J. Mol. Biol.*, 1991, **220**, 199-203.
- Cabral-Lilly, D., Sosinsky, G.E., Reed, R.A., McDermott, M.R., & Shipley, G.G. Orientation of Cholera Toxin Bound to Model Membranes. *Biophys. J.*, 1994, **66**, 935-941.
- Celia, H., Hoermann, L., Schultz, P., Lebeau, L., Mallouh, V., Wigley, D.B., Wang, C., Mioskowski, C., & Oudet, P. Three-Dimensional Model of *Escherichia coli* gyrase B Subunit Crystallized in Two-Dimensions on Novobiocin-Linked Phospholipid films. *J. Mol. Biol.*, 1994, **236**, 618-628.
- Chen, H., Hsu, S.L., Tirell, D.A., & Stidham, H.D. A pH Dependant Coil-to-Sheet Transition in a Periodic Artificial Protein Adsorbed at the Air-Water Interface. *Langmuir*, 1997, **3**, 4775-4778.
- Chen, Y.L., Chen, S., Frank, C., & Israelachvili, J. Molecular Mechanisms and Kinetics During the Self-Assembly of Surfactant Layers. *J. Colloid Interface Sci.*, 1992, **153**, 244-265.
- Chiu, W., & Schmid, M.F. Pushing Back the Limits of Electron Cryomicroscopy. *Nature Struct. Biol.*, **4**, 1997, 331-333.
- 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 présenté à l'Université du Québec à Trois-Rivières, 1994, 132 pages.
- Darnell, J.E., Lodish, H.F., & Baltimore, D. *Molecular Cell Biology*. Scientific American Books, New-York, 1986, 1192 pages.
- Darst, S.E., Ribí, H.O., Pierce, D.W., & Kornberg, R.D. Two-Dimensional Crystals of *Escherichia coli* RNA Polymerase Holoenzyme on Positively Charged Lipid Layers. *J. Mol. Biol.*, 1988, **203**, 269-273.
- Darst, S.A., Kubalek, E.W., Kornberg, R.D. Three-Dimensional Structure of *Escherichia coli* RNA Determined by Electron Crystallography. *Nature*, 1989, **340**, 730-732.
- Darst, S.A., Edwards, A.M., Kubalek, E.W., & Kornberg, R.D. Three-Dimensional Structure of Yeast RNA Polymerase II at 16 Å Resolution. *Cell*, 1991a, **66**, 121-128.

- Darst, S.A., Ahlers, M., Meller, P.H., Kubalek, E.W., Blankenberg, R., Ribi, H.O., Ringsdorf, H., & Kornberg, R.D. Two-Dimensional Crystals of Streptavidin on Biotinylated Lipid Layers and Their Interactions with Biotinylated Macromolecules. *Biophys. J.*, 1991b, **59**, 387-396.
- deRosier, D.J., & Klug, A. Reconstruction of Three Dimensional Structures from Electron Micrographs. *Nature*, 1968, **217**, 130-134.
- dos Remedios, C.G., & Dickens, M.J. Actin Microcrystals and Tubes Formed in the Presence of Gadolinium Ions. *Nature*, 1978, **276**, 731-733.
- Dluhy, R.A., Mitchell, M.L., Pettenski, T., & Beers, J. Design and Interfacing of an Automated Langmuir-Type Film Balance to an FT-IR Spectrometer. *Applied Spectroscopy*, 1988, **42**, 1289-1293.
- Durbin, S.D., & Feher, G. Protein Crystallization. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 1996, **47**, 171-204.
- Edwards, A.M., Darst, S.A., Faever, W.J., Thompson, N.E., Burgessand, R.R., & Kornberg, R.D. Purification and Lipid-Layer Crystallization of Yeast RNA Polymerase II. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1990, **87**, 2122-2126.
- Egelman, E.H., & Padròn, R. X-Ray Diffraction Evidence that Actin is a 100 Å Filament. *Nature*, 1984, **307**, 56-58.
- Egelman, E.H., Orlova, A., & McGough, A. Only One F-Actin Model. *Nature Struct. Biol.*, 1997, **4**, 683-684.
- Eriksson, L.G.T. The Effect of Evaporation on Wilhelmy-Type Measurements of Wetting Tension: Is Wetting Equilibrium Reached for Cationic Surfactant Adsorption on Mica? *J. Colloid Interface Sci.*, 1997, **191**, 264-267.
- Feuer, G., Molnar, F., Pettko, E., & Straub, F.B. The Composition and Polymerisation of Actin. *Hung. Acta Physiol.*, 1948, **1**, 150-163.
- Flach, C.R., Brauner, J.W., Taylor, J.W., Baldwin, R.C. & Mendelsohn, R. External Reflection FT-IR of Peptide Monolayer Films In Situ at the A/W Interface: Experimental Design, Spectra-Structure Correlations, and Effects of Hydrogen-Deuterium Exchange. *Biophys. J.*, 1994, **67**, 402-410.
- Flach, C.R., Prendergast, F.G., & Mendelsohn, R. Infrared Reflection-Absorption of Mellitin Interaction with Phospholipid Monolayers at the A/W Interface. *Biophys. J.*, 1996, **70**, 539-546.
- Gaines, G.L. *Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces*. John Wiley and Sons, Interscience, New-York, 1966, 386 pages.

- Gicquaud, C. Does Actin Bind to Membrane Lipids Under Conditions Compatible with those Existing In Vivo?. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1995, **208**, 1154-1158.
- Glaeser, R.M. Specimen Flatness of Thin Crystalline Arrays: Influence of the Substrate. *Ultramicroscopy*, 1992, **46**, 33-43.
- Grazi, E., Schwienbacher, C., & Magri, E. Osmotic Stress is the Main Determinant of the Diameter of the Actin Filament. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993, **197**, 1377-1381.
- Grazi, E., Magri, E., Schwienbacher, C., & Trombetta, G. Actin May Contribute to the Power Stroke in the Binary Actomyosin System. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1994, **200**, 59-64.
- Grazi, E. What is the diameter of the actin filament?. *FEBS Lett.*, 1997, **405**, 249-252.
- Hanson, J. Abstr. 7th. Int. Cong. Biochem. Tokyo, 1976, II-327; *Sym. Biol. Hung.*, **8**: 99 (1967)
- Hénon, S., & Meunier, J. Une seule couche: un microscope à angle de Brewster révèle la constitution de couches monomoléculaires. *Pour la Science*, 1992, **172**, 23-24.
- Holmes, K.C., Popp, D., Gebhard, W., & Kabsch, W. Atomic Model of the Actin Filament. *Nature*, 1990, **347**, 44-49.
- Jap, B.K., Zulauf, M., Scheybani, T., Hefti, A., Baumeister, W., Aebi, U., & Engel, A. 2D Crystallization: From Art to Science. *Ultramicroscopy*, 1992, **46**, 45-84.
- Kabsch, W., Mannherz, H.G., Suck, D., Pai, E.F., & Holmes, K.C. Atomic Structure of the Actin: DNase I Complex. *Nature*, 1990, **347**, 37-44.
- Kawamura, M., Maruyama, K. Polymorphism of F-Actin. I. Three forms of Paracrystals. *J. Biochem.*, 1970, **68**, 885-899.
- Kornberg, R.D., & Darst, S.A. Two-Dimensional crystals of Proteins on Lipid Layers. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1991, **1**, 632-646.
- Kubalek, E.W., Kornberg, R.D., & Darst, S.A. Improved Transfer of Two-Dimensional Crystals from the Air/Water Interface to Specimen Support Grids for High-Resolution Analysis by Electron Microscopy, *Ultramicroscopy*, 1991, **35**, 295-304.

- Kubalek, E.W., LeGrice, S.F., & Brown, P.O. Two-Dimensional Crystallization of Histidine-Tagged HIV-1 Reverse Transcriptase Promoted by a Novel Nickel-Chelating Lipid. *J. Struct. Biol.*, 1994, **113**, 117-123.
- Laliberté, A., & Gicquaud, C. Polymerization of Actin by Positively Charged Liposomes. *J. Cell Biol.*, 1988, **106**, 1221-1227.
- Lebeau, L., Regnier, E., Schultz, P., Wang, J.C., Mioskowski, C., & Oudet, P. Two-Dimensional Crystallization of DNA Gyrase B Subunit on Specifically Designed Lipid Monolayers. *FEBS Lett.*, 1990, **267**, 38-42.
- Lebeau, L., Olland, S., Oudet, P., & Mioskowski, C. Rational Design and Synthesis of Phospholipids for the Two-Dimensional Crystallization of DNA Gyrase, a Key Element in Chromosome Organisation. *Chem. Phys. Lipids*, 1992, **62**, 93-103.
- Lehrer, S.S., & Derwar, G. Intrinsic Fluorescence of Actin. *Biochemistry*, 1972, **11**, 1211-1216.
- Liu, Z., Qin, H., Xiao, C., Wang, S., & Sui, S.F. Specific Binding of Avidin to Biotin Containing Lipid Lamella Surfaces Studied with Monolayers and Liposomes. *European Biophysics Journal*, 1995, **24**, 31-38.
- Lorenz, M., Popp, D., & Holmes, K.C. Refinement of the F-Actin Model against X-Ray Diffraction Data by the Use of a Directed Mutation Algorithm. *J. Mol. Biol.*, 1993, **234**, 826-836.
- Ludwig, D.S., Ribic, H.O., Schoolnik, G.K., & Kornberg, R.D. Two-Dimensional Crystals of Cholera Toxin B-Subunit-Receptor Complexes: Projected Structure at 17 Å Resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1986, **83**, 8585-8588.
- Luna, E.J., Fowler, V.M., Swanson, J., Branton, D., & Lansing Taylor, D.A. Membrane Cytoskeleton from *Dictyostelium discoideum* I. Identification and Partial Characterization of an Actin-Binding Activity. *J. Cell Biol.*, 1981, **88**, 396-409.
- Luna, E.J., Goodloe-Holland, C.M., & Ingalls, H.M. A Membrane Cytoskeleton from *Dictyostelium discoideum* II. Integral Proteins Mediate the Binding of Plasma Membrane to F-Actin Affinity Beads. *J. Cell Biol.*, 1984, **99**, 58-70.
- Maillet, M. *Biologie cellulaire*. 1995, 7ième édition, Masson, Paris, 327 pages.
- Mannherz, H.G. Crystallization of Actin in Complex with Actin-binding Proteins. *J. Biol. Chem.*, 1992, **267**, 11661-11664.

- Mendelsohn, R., Brauner, J.W., & Gericke, A. External Infrared Reflection Absorption Spectrometry of Monolayer Films at the Air-Water Interface. *Ann. Rev. Phys. Chem.*, 1995, **46**, 305-334.
- Miki, M., O'donoghue, S.I., & dos Remedios, C.G. Structure of Actin Observed by Fluorescence Resonance Energy Transfer Spectroscopy. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 1992, **13**, 132-145.
- Mosser, G., & Brisson, G. Conditions of Two-Dimensional Crystallization of Cholera Toxin B-Subunit on Lipid Films Containing Ganglioside GM1. *J. Struct. Biol.*, 1991, **106**, 191-198.
- Mosser, G., Ravanat, C., Freyssinet, J.M., & Brisson, A. Sub-Domain Structure of Lipid-Bound Annexin-V Resolved by Electron Image Analysis. *J. Mol. Biol.*, 1991b, **217**, 241-245.
- Müller, O., Gaub, H.E., Bärmann, M., Sackmann, E. Viscoelastic Moduli of Sterically and Chemically Cross-Linked Actin Networks in the Dilute to Semidilute Regime: Measurements by an Oscillating Disk Rheometer. *Macromol.*, 1991, **24**, 3111-3120.
- Newman, R.H. Two-Dimensional Crystallization of Proteins on Lipid Monolayers. *Electron Microscopy Review*, 1991a, **4**, 197-203.
- Newman, R.H., Leonard, K., & Crumton, M.J. 2D Crystal Forms of Annexin IV on Lipid Monolayers. *FEBS Lett.*, 1991b, **279**, 21-24.
- Nodder, S., & Martin, P. Wound Healing in Embryos: a Review. *Anat. Embryol*, 1997, **195**, 215-218.
- Ohnishi, S., Hara, M., Furuno, T., & Sasabe, H. Imaging Two-Dimensional Crystals of Catalase by Atomic Force Microscopy. *Jpn. J. Appl. Phys.*, 1996, **35**, 6233-6238.
- Olofsson, A., Kavéus, U., Hacksell, M., Thelestam, M., & Herbert, H. Crystalline Layers and Three-Dimensional Structure of *Staphylococcus aureus* α -toxin. *J. Mol. Biol.*, 1990, **214**, 299-306.
- Olofsson, A., Herbert, H., & Thelestam, M. The Structure of *Staphylococcus aureus* α -toxin: Effects of Trypsin Treatment. *J. Struct. Biol.*, 1991, **106**, 199-204.
- Olofsson, A., Mallouh, V., & Brisson, A. Two-Dimensionnal Structure of Membrane-Bound Annexin V at 8 Å Resolution. *J. Struct. Biol.*, 1994, **113**, 199-205.

- Paulsson, M., & Dejmek, P. Surface Film Pressure of β -Lactalbumin and Bovine Serum Albumin at the Air-Water Interface Studied by Wilhelmy Plate and Drop Volume. *J. Colloid Interface Sci.*, 1991, **150**, 394-403.
- Parker, M.W., Buckley, J.T., Postma, J.P.M., Tucker, A.D., Leonard, K., Pattus, F., & Tsernoglou, D. Structure of the *Aeromonas* Toxin Proaerolysin in Its Water-Soluble and Membrane-Channel States. *Nature*, 1994, **367**, 292-295.
- Petty, M.C. Possible Applications for Langmuir-Blodgett Films. *Thin Solid Films*, 1992, **210-211**, 417-426.
- Pigeon, B. *Étude de l'interaction directe entre l'actine et les lipides membranaires (liposomes) par calorimétrie différentielle à balayage et microscopie électronique*. Mémoire présenté à l'Université du Québec à Trois-Rivières, 1992, 130 pages.
- Pollack, G.H. *Muscles & Molecules: Uncovering the Principles of Biological Motion*. 1990, Ebner & Sons Publishers, Seattle, 300 pages.
- Pollard, T.D. Rate Constants for the Reactions of ATP- and ADP-Actin with the Ends of Actin Filaments. *J. Cell Biol.*, 1986, **103**, 2747-2754.
- Pollard, T.D. Actin. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1990, **2**, 33-40.
- Popp, D., Lednev, V.V., & Jahn, W. Methods of Preparing Well-oriented Sols of F-Actin Containing Filaments Suitable for X-Ray Diffraction. *J. Mol. Biol.*, 1987, **197**, 679-684.
- Puu, G., & Gustafson, I. Planar Lipid Bilayers on Solid Supports from Liposomes - Factors of Importance for Kinetics and Stability. *Biochim. Biophys. Acta*, 1997, **1327**, 149-161.
- Reed, R.A., Mattai, J., & Shipley, G.G. Interaction of Cholera Toxin with Ganglioside GM1 Receptors in Supported Lipid Monolayers. *Biochemistry*, 1987, **26**, 824-832.
- Ribi, H.O., Ludwig, D.S., Mercer, K.L., Schoolnik, G.K., & Kornberg, R.D. Three-Dimensional Structure of Cholera Toxin Penetrating a Lipid Membrane. *Science*, 1988, **239**, 1272-1276.
- Roberts, G. 1990. *Langmuir-Blodgett films*. Plenum Press, New-York. 425 pages.
- Robinson, J.P., Schmid, M.F., Morgan, D.G., & Chiu, W. Three-Dimensional Structural Analysis of Tetanus Toxin by Electron Microscopy. *J. Mol. Biol.*, 1988, **200**, 367-375.

- Rosenbaum, D.F., & Zukoski, C.F. Protein Interactions and Crystallization. *Journal of Crystal Growth*, 1996, **169**, 752-758.
- Rioux, L., & Gicquaud, C. Actin Paracrystalline Sheets Formed at the Surface of Positively Charged Liposomes. *J. Ultrastruct. Res.*, 1985, **93**, 42-49.
- Saint-Onge, D., & Gicquaud, C. Evidence of Direct Interaction between Actin and Membrane Lipids. *Biochem. Cell Biol.*, 1989, **67**, 297-300.
- Saint-Onge, D., & Gicquaud, C. Research on the mechanism of Interaction between Actin and Membrane Lipids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1990, **167**, 40-47.
- Schnyder, T., Cyrklaff, M., Fuchs, K., & Wallimann, T. Crystallization of Mitochondrial Creatine Kinase on Negatively Charged Lipid Layers. *J. Struct. Biol.*, 1994, **112**, 136-147.
- Schultz, P., Celia, H., Darst, S.A., Colin, P., Kornberg, R.D., Sentenac, A., & Oudet, P. Structural Study of the Yeast RNA Polymerase A. Electron Microscopy of Lipid-Bound Molecules and Two-Dimensional Crystals. *J. Mol. Biol.*, 1990, **216**, 353-362.
- Schultz, P., Wang, J.C., Mioskowski, C., & Oudet, P. Two-Dimensional Crystallization of DNA Gyrase B Subunit on Specifically Designed Lipid Monolayers. *FEBS Lett.*, 1990, **267**, 38-42
- Schultz, P., Celia, H., Riva, M., Sentenac, A., & Oudet, P. Three-Dimensional Model of Yeast RNA Polymerase I Determined by Electron Microscopy of Two-Dimensional Crystals. *EMBO J.*, 1993, **12**, 2601-2607.
- Schutt, C.E., Lindberg, U., Myslik, C.J., & Strauss, N. Molecular Packing in Profilin: Actin Crystals and Its Implications. *J. Mol. Biol.*, 1989, **209**, 735-746.
- Schutt, C.E., Myslik, C.J., Rozycki, M.D., Goonesekere, N.C.W., & Lindberg, U. The Structure of Crystalline Profilin- β -Actin. *Nature*, 1993, **365**, 810-816.
- Schutt, C.E., Rozycki, M.D., & Lindberg, U. ?. *Curr. Biol.*, 1994, **4**, 185-186.
- Schutt, D.C., Wessels, D., Wagenknecht, K., Chandrasekhar, A., Hitt, A.L., Luna, E.J., & Soll, D.R. Ponticulin Plays a Role in the Positional Stabilization of Pseudopods. *J. Cell Biol.*, 1995a, **6**, 1495-1506.
- Schutt, C.E., Rozycki, M.D., Chik, J.K., & Lindberg, U. Structural Studies on the Ribbon-to-Helix Transition in Profilin: Actin Crystals. *Biophys. J.*, 1995b, **68**, 12s-18s.

- Schutt, C.E., Kreatsoulas, C., Page, R., & Lindberg, U. In Reply. *Nature Struct. Biol.*, 1997, **4**, 684.
- Schwienbacher, C., Magri, E., Trombetta, G., & Grazi, E. Osmotic Properties of the Calcium-Regulated Actin Filament. *Biochemistry.*, 1995, **34**, 1090-1095.
- Spudich, J.A., & Watt, S. The Regulation of Rabbit Skeletal Muscle Contraction. I. Biochemical Studies of the Interaction of the Tropomyosin-Troponin Complex with Actin and the Proteolytic Fragments of Myosin. *J. Biol. Chem.*, 1971, **246**, 4866-4871.
- Steinmetz, M.O., Goldie, K.N., & Aebi, U. Correlative Analysis of Actin Filament Assembly, Structure, and Dynamics. *J. Cell Biol.*, 1997, **3**, 559-574.
- Stossel, T.P. The Machinery of Cell Crawling. *Scientific American*, 1994, 54-63.
- Stoylova, S., Mann, K.G., & Brisson, A. Structure of Membrane-Bound Human Factor Va. *FEBS Lett.*, 1994, **351**, 330-334.
- Taylor, K.A., & Taylor, D.W. Formation of 2-D Paracrystals of F-Actin on Phospholipid Layers Mixed with Quarternary Ammonium Surfactants. *J. Struct. Biol.*, 1992, **108**, 140-147.
- Taylor, K.A., & Taylor, D.W., Projection Image of Smooth Muscle α -actinin from Two-Dimensional Crystals Formed on Positively Charged Lipid Layers. *J. Mol. Biol.*, 1993, **230**, 196-205.
- Tazi, A. *Structure des films Langmuir-Blodgett du cytochrome f, du mélange MGDG/cyt f et DGDG/cyt f par la microscopie à champ proche*. Thèse présentée à l'Université du Québec à Trois-Rivières, 1996, 174 pages.
- Tirion, M.M., ben-Avraham, D., Lorenz, M., Holmes, K.C. Normal Modes as Refinement Parameters for the F-Actin Model. *Biophys. J.*, **68**, 5-12.
- Tronin, A., Dubrovsky, T., & Nicolini, C. Comparative study of Langmuir Monolayers of Immunoglobulines G Formed at the Air-Water Interface and Covalently Immobilized on Solid Supports. *Langmuir*, 1995, **11**, 385-389.
- Tronin, A., Dubrovsky, T., & Nicolini, C. Deposition, Molecular Orientation and Functional Activity of IgG Langmuir Films. *Thin Solid Films*, 1996, **284-285**, 894-897.
- Uzgiris, E.E., & Kornberg, R.D. Two-Dimensional Crystallization Technique for Imaging Macromolecules, with Application to Antigen-Antibody-Complement Complexes. *Nature*, 1983, **301**, 125-129.

- Uzgiris, E.E. Antibody Crystallization on Phospholipid Films: Dynamics and the Effects of Antibody Conformation. *J. Cell. Biochem.*, 1985, **29**, 239-251.
- Uzgiris, E.E. Supported Phospholipid Bilayers for Two-Dimensional Protein Crystallization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1986, **134**, 819-826.
- Uzgiris, E.E. Self-Organization of IgE Immunoglobulins on Phospholipid Films. *Biochem. J.*, 1987, **242**, 293-296.
- Uzgiris, E.E. Antibody Organization on Lipid Films. Influence of pH and Interchain Disulphide Reduction. *Biochem. J.*, 1990, **272**, 45-49.
- Vélez, M., Rubio, G., Valpuesta, J.M., Carrascosa, J.L., & Vieira, S. Topographical Studies of Bacteriophage ϕ 29 Connector Bidimensional Crystals using Scanning Tunneling Microscopy. *Micron*, 1996, **5**, 375-380.
- Verger, R., & Pattus, F. Protein-Lipid Interactions in Monolayers. *Chem. Phys. Lipids*, 1982, **30**, 189-227.
- Voges, D., Berendes, R., Burger, A., Demange, P., Baumeister, W., & Huber, R. Three-Dimensional Structure of Membrane-Bound Annexin V. A Correlative Electron Microscopy-X-Ray Crystallography Study. *J. Mol. Biol.*, 1994, **238**, 199-213.
- Wang, Y., Pan, J., Niu, X., Zhou, Y., Hua, Z., Xu, Q., Wu, S., Han, Q., Li, H., Liu, Y., Teng, M., He, H., Lin, S., & Bi, R. The Second Space Experiment of Protein Crystallization with Domestic Facilities. *Science in China*, 1996, **39**, 458-464.
- Ward, R.J., Menetret, J.-F., Pattus, F., & Leonard, K. Method for Forming Two-Dimensional Paracrystals of Biological Filaments on Lipid Monolayers. *Journal of Electron Microscopy Technique*, 1990, **14**, 335-341.
- Ward, R.J., & Leonard, K. The *Staphylococcus aureus* α -toxin Channel Complex and the Effects of Ca^{2+} Ions on Its Interaction with Lipid Layers. *J. Struct. Biol.*, 1992, **109**, 129-141.
- Wilmsen, H.U., Leonard, K.R., Tichelaar, W., Buckley, J.T., & Pattus, F. The Aerolysin Membrane Channel is Formed by Heptamerization of the Monomer. *EMBO J.*, 1992, **11**, 2457-2463.
- Wolfe, S.L. *Molecular and Cellular Biology*. 1993, Wadsworth Publishing Company, Belmont, 1145 pages.
- Wuestehube, L.J., & Luna, E.J. F-actin Binds to the Cytoplasmic Surface of Ponticulin, a 17-kD Integral Glycoprotein from *Dictyostelium discoideum* Plasma Membranes. *J. Cell Biol.*, 1987, **105**, 1741-1751.

