

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA TRANSFORMATION G-ACTINE — F-ACTINE

par

M. DUBUISSON

Laboratoire de Biologie générale, Faculté des Sciences, Université de Liège (Belgique)

Au cours des études que nous avons faites sur la composition protidique d'extraits musculaires préparés au moyen de solutions d'extraction de diverses compositions salines, déterminée par l'analyse électrophorétique, notre attention avait été attirée par la présence, dans les extraits préparés avec KI 0.5 *m*, de certaines protéines ne figurant pas dans les extraits préparés au moyen d'autres électrolytes. Comme on sait, d'autre part, l'influence dépolymérisante du KI sur la F-actine que STRAUB¹ a réussi à isoler du stroma du muscle, la question se posait de savoir si l'une ou l'autre de nos nouvelles protéines ne correspondait pas à la F-actine dépolymérisée. Le problème ne pouvait se résoudre que par une étude préalable des propriétés électrocinétiques de l'actine, sous ses deux formes connues: la G-actine et son polymère: la F-actine. Cette étude nous a permis de constater que le monomère et le polymère de cette protéine possèdent des vitesses électrocinétiques différentes et que cette différence doit être attribuée à une modification dans la distribution de certains groupements ionogènes lors du phénomène de polymérisation, modifications qu'il est possible de démontrer directement par la mesure des changements de p_H qui accompagnent la polymérisation de cette protéine.

TECHNIQUE

Extraction de l'actine

L'extraction de cette protéine, découverte par STRAUB¹, en 1942, repose sur le principe suivant: l'actine existe dans le muscle, *in situ*, vraisemblablement sous la forme de F-actine combinée à la myosine pour former l'actomyosine. Il faut tout d'abord éliminer la myosine (au moyen d'une solution saline concentrée); ce qu'il en reste doit être dénaturé *in situ* (par l'acétone) et l'actine F ainsi libérée doit maintenant être dépolymérisée (par OH^- en l'absence de sels); on peut ensuite l'extraire par de l'eau sans CO_2 .

Les diverses méthodes de préparation qui ont été données (STRAUB^{1, 2, 3}) conduisent à des résultats assez variables d'un muscle à l'autre. Après beaucoup de tâtonnements, nous nous sommes rallié à la méthode préconisée par STRAUB³ en portant toutefois à 4% la solution de bicarbonate utilisée pour le lavage de la pulpe après extraction de la myosine. En partant de 1 g de pulpe déshydratée par l'acétone et séchée, on obtient environ 12 ml d'une solution de G-actine contenant de 0.7 à 1.3 mg N/ml et de p_H env. 8.5–9.0.

Bibliographie p. 432.

Préparation des divers échantillons d'actine destinés aux mesures électrophorétiques et aux mesures de p_H

Les p_H acides, les sels non dénaturants même à faible concentration, transforment, à la température ordinaire, la G-actine en F-actine. Celle-ci donne des solutions fort visqueuses, biréfringentes par orientation (positive) et thixotropes.

La forte thixotropie rend très difficile l'étude électrophorétique de la F-actine, qui prend en gel dans la cellule d'électrophorèse et dont les limites de séparation d'avec la solution tampon deviennent de ce fait pratiquement indéplaçables et ne peuvent être amenées dans le champ optique sans considérables déformations. Nous n'avons réussi à effectuer semblable étude que sur des solutions très pauvres en F-actine et possédant par conséquent une thixotropie peu gênante.

D'autre part, étant donné que la présence de sels, même en très faible quantité, entraîne une polymérisation rapide de la G-actine et qu'il n'est pas possible d'effectuer une électrophorèse en l'absence d'électrolytes, l'étude des propriétés électrocinétiques de la G-actine ne peut être effectuée que sur des solutions irréversiblement dépolymérisées ou rendues impolymérisables.

Une dépolymérisation irréversible est produite par NaI (STRAUB³). Partant d'une solution de G-actine fraîchement préparée et dissoute dans l'eau, on polymérise la protéine par addition de KCl (concentration finale 0.1 m). Au bout de 20 min, à la température ordinaire, la solution est devenue visqueuse et fortement biréfringente par agitation (présence de F-actine). On ajoute ensuite NaI (conc. finale 0.5 m). La dépolymérisation peut être suivie en observant la solution, mise en mouvement, entre nicols croisés. Au bout de 30 min, à la température ordinaire, toute biréfringence a disparu: la protéine est irréversiblement dépolymérisée et soumise, après dialyse, à l'analyse électrophorétique.

Une solution de G-actine en grande partie impolymérisable peut être obtenue en dialysant une solution de G-actine fraîchement préparée, pendant trois jours, contre de l'eau distillée contenant NaHCO_3 0.001 m. D'après STRAUB³, cette opération enlève des préparations d'actine une substance encore indéterminée et qui est indispensable pour permettre la polymérisation de cette protéine.

Technique d'électrophorèse

Nous avons utilisé l'appareillage du type TISELIUS-LONGSWORTH (DUBUISSON ET JACOB⁴).

Mesure des variations de p_H

Elles sont effectuées au moyen d'une électrode de verre du type MACINNES et de l'électromètre à lampes de DUBUISSON ET DEBOT⁵.

RÉSULTATS

ETUDES ÉLECTROPHORÉTIQUES

En soumettant à l'électrophorèse une solution diluée (0.24 mgr N/ml) de F-actine, préparée par addition de KCl à une solution de G-actine, dialysée préalablement pendant 48 heures contre une solution contenant Na_2HPO_4 0.048 m, NaH_2PO_4 0.006 m et NaCl 0.25 m*, et de $p_H \sim 7.40$, on observe, dans les compartiments ascendant et descendant,

* La force ionique utilisée ici est de 0.40, ces expériences ayant été primitivement destinées à l'interprétation de certains gradients trouvés dans les extraits musculaires totaux de μ 0.40 (voir Introduction).

une frontière unique, même après 24 h d'électrophorèse à 0.8 v/cm. Sa vitesse est:

asc.: $-6.3 \cdot 10^{-5}$ cm/v/sec.

desc.: $-6.7 \cdot 10^{-5}$ cm/v/sec.

Si l'on étudie de la même manière une solution de *F-actine dépolymérisée* par NaI, puis dialysée contre le même tampon que ci-dessus, on trouve également un gradient unique, dans les deux compartiments, mais dont les vitesses sont:

asc.: $-4.6 \cdot 10^{-5}$ cm/v/sec.

desc.: $-4.7 \cdot 10^{-5}$ cm/v/sec.

Au p_H 7.60 et à μ 0.15, les vitesses sont respectivement:

asc.: -9.3

desc.: -9.1 pour l'actine polymérisée

et asc.: -6.4

desc.: -6.1 pour l'actine dépolymérisée.

Si la solution de F-actine est mise en dialyse bien avant que la dépolymérisation par NaI ait eu le temps d'être complète, les mesures électrophorétiques indiquent la présence de deux gradients dont les vitesses correspondent exactement à celles données ci-dessus pour la F-actine et la F-actine dépolymérisée.

Ces résultats montrent donc que la F-actine dépolymérisée chemine moins rapidement dans le champ électrique que la F-actine, ce qui suggère, pour cette dernière, un p.i. situé plus bas dans l'échelle des p_H .

Si, au lieu de s'adresser à la F-actine irréversiblement dépolymérisée par NaI, on utilise de la G-actine, rendue en grande partie impolymérisable par une dialyse d'au moins trois jours contre de l'eau distillée contenant 0.001 *m* NaHCO_3 (cfr STRAUB³), puis dialysée contre la solution phosphatique signalée ci-dessus, on observe également deux gradients dont les vitesses sont les mêmes que celles de la F-actine et de la F-actine dépolymérisée par NaI. Il en résulte que, du point de vue électrocinétique (p_H 7.4), rien ne permet de distinguer l'actine dépolymérisée par NaI ou celle rendue impolymérisable par une dialyse prolongée.

Les faits signalés ci-dessus suggèrent que d'importantes modifications dans la distribution des groupes ionogènes semblent accompagner la transformation G-actine \rightarrow F-actine et l'intérêt que pouvait présenter ce problème nous a incité à vérifier ce fait par d'autres méthodes.

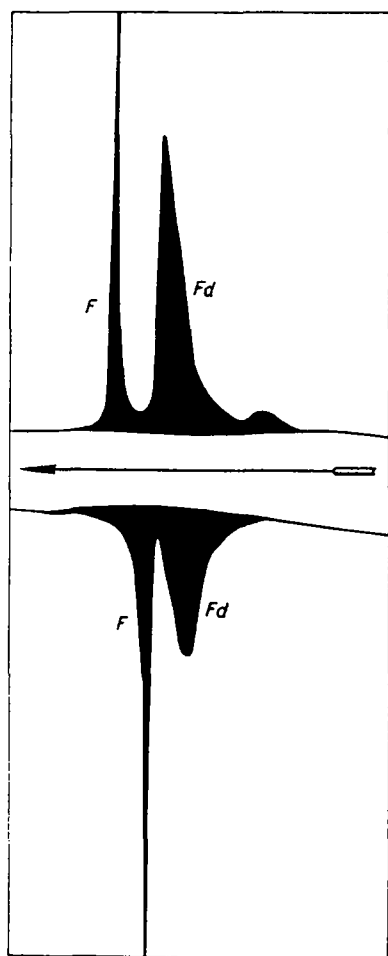


Fig. 1. Tracés électrophorétiques (technique de TISELIUS-LONGSWORTH) d'une solution à 1.1% de F-actine en grande partie dépolymérisée par NaI.

F: F-actine

Fd: F-actine dépolymérisée

36 420 secondes d'électrophorèse à 1.6 volts/cm, μ : 0.40, p_H : 7.44.

au dessus, frontières ascendantes
en dessous, frontières descendantes.

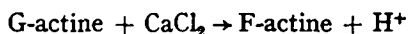
Bibliographie p. 432.

MESURES DE p_H

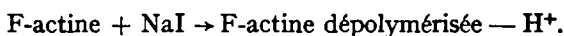
Si la transformation G-actine \rightarrow F-actine s'accompagne réellement d'une importante modification du p.i., comme le suggèrent les mesures électrocinétiques, il doit être possible de déceler une modification dans la $[H^+]$ d'une solution de G-actine se transformant en F-actine. Nous avons utilisé deux méthodes de contrôle: *a.* la mesure directe du p_H de la solution par l'électrode de verre et *b.* la mesure du CO_2 dégagé ou absorbé par une solution de bicarbonate, contenant de l'actine, dans l'appareil de WARBURG.

a. Si l'on ajoute, à la température du laboratoire, à une solution de G-actine contenant environ 0.6% d'actine et de p_H 8.00, du KCl en poudre de telle sorte que la concentration saline soit 0.1 *m*, le p_H de la solution s'abaisse progressivement jusqu'à ~ 7.20 , au fur et à mesure que la solution se polymérise et devient plus visqueuse et plus biréfringente. L'abaissement de p_H est plus considérable (6.8) et pratiquement instantané si l'on utilise du $CaCl_2$ à une concentration finale de 0.02 *m*.

Si, au contraire, partant d'une solution de F-actine, préparée par addition de KCl (0.1 *m*) à une solution de G-actine, on dépolymérise irréversiblement la substance par addition de NaI (conc. finale 0.5 *m*), le p_H de la solution s'élève, mais il n'atteint jamais le niveau de la solution initiale de G-actine. Tout se passe comme si les changements dans la répartition des groupes ionogènes de la solution étaient plus considérables au cours de la transformation



que dans



L'intérêt de ces observations dépassait encore celui des mesures électrocinétiques et afin de permettre une mesure quantitative de ces phénomènes, nous avons eu recours à l'appareil de WARBURG.

b. Les solutions de G-actine utilisées pour ces mesures contiennent au départ environ 0.005 à 0.007 *m* de $NaHCO_3$, provenant du lavage de la pulpe musculaire par $NaHCO_3$ lors de la préparation de l'actine.

Dans une atmosphère contenant 5% CO_2 et 95% N_2 , à 24° C, l'addition de $CaCl_2$ (0.2 ml d'une solution 0.5 *m*) à 2 ml d'une solution d'actine (contenant 0.005 à 0.007 *m* $NaHCO_3$ et de 8 à 19 mg d'actine) provoque une libération de CO_2 . Rapporté à 1 g d'actine, ce dégagement de CO_2 , dans 10 essais effectués sur des échantillons d'actine provenant de 7 lapins différents, correspond à une moyenne de $45 \cdot 10^{-5}$ équivalents (37-43.5-53-48-50-41-46-30-43-62). Les manomètres témoins contenaient 2 ml d'une solution 0.005 à 0.007 *m* $NaHCO_3$ auxquels on ajoutait, en même temps dans tous les manomètres, 0.2 ml d'une solution de $CaCl_2$ 0.5 *m*).

Si la polymérisation est effectuée par KCl (concentration finale entre 0.1 *m* et 1 *m*), le dégagement de CO_2 mesuré est plus inconstant et toujours beaucoup moins considérable qu'avec $CaCl_2$. La moyenne de 6 mesures a été de $3.5 \cdot 10^{-5}$ équivalents (2.5-4.6-1.2-1.9-5.2-4.7), soit 13 fois moins d'équivalents acides libérés que lorsque la polymérisation est effectuée par $CaCl_2$.

Ceci confirme ce que nous avons déjà constaté lors des mesures de p_H par l'électrode de verre à savoir que l'augmentation de $[H^+]$ est plus forte si l'on utilise $CaCl_2$. STRAUB³ avait déjà signalé d'ailleurs que la polymérisation est beaucoup plus rapide par $CaCl_2$ que par KCl.

Enfin, si la polymérisation est provoquée par KCl (0.5 *m*) + CaCl_2 (0.05 *m*) ou par KCl (0.5 *m*) + MgCl_2 (0.05 *m*), 1 g d'actine libre $29 \cdot 10^{-5}$ équiv. H^+ ; par MgCl_2 0.5 *m*: $38 \cdot 10^{-5}$ équiv. H^+ .

Nous avons également étudié à l'appareil de WARBURG les échanges de CO_2 qui accompagnent la dépolymérisation irréversible par NaI de la F-actine préparée soit par CaCl_2 + G-actine, soit par KCl + G-actine.

La dépolymérisation par NaI s'accompagne toujours d'une absorption de CO_2 . Lorsque la F-actine est préparée avec CaCl_2 , l'addition de NaI (0.2 ml NaI 5 *m* dans 2 ml de F-actine contenant 0.007 *m* NaHCO_3 + 0.05 *m* CaCl_2) s'accompagne d'une absorption de $\sim 10 \cdot 10^{-5}$ équiv. de CO_2 , soit 4 à 5 fois moins qu'il ne s'en était dégagé au moment de la formation de cette même F-actine. La dépolymérisation irréversible par NaI n'est donc pas quantitativement, du point de vue des échanges d'ions H^+ , l'inverse de la polymérisation par CaCl_2 . De même, la dépolymérisation, dans les mêmes conditions, de la F-actine préparée par KCl 0.5 *m* s'accompagne d'une moindre absorption de CO_2 qu'il ne s'en dégage au moment de la polymérisation des mêmes échantillons de G-actine par KCl ($2.8 \cdot 10^{-5}$ équiv. par g d'actine).

On peut en somme résumer ceci par le schéma suivant:

G-actine + KCl (0.5 *m*) \rightarrow F-actine (KCl) + $3.5 \cdot 10^{-5}$ éq. CO_2/g actine

F-actine (KCl) + NaI (0.5 *m*) \rightarrow F-actine dép. — $2.8 \cdot 10^{-5}$ éq. CO_2/g actine

G-actine + CaCl_2 (0.05 *m*) \rightarrow F-actine (CaCl_2) + $45 \cdot 10^{-5}$ éq. CO_2/g actine

F-actine (CaCl_2) + NaI (0.5 *m*) \rightarrow F-actine dép. — $10 \cdot 10^{-5}$ éq. CO_2/g actine

DISCUSSION

Peu de choses sont connues à l'heure actuelle sur le mécanisme grâce auquel une solution de G-actine peut se transformer en F-actine (voir STRAUB³). Cette polymérisation peut être provoquée par les électrolytes les plus divers, à des concentrations fort variables selon la nature des sels utilisés. Le Mg^{++} paraît indispensable dans tous les cas. Très lente à 0° C, elle est beaucoup plus rapide à la température du laboratoire. La solution de G-actine de viscosité très faible et de biréfringence d'orientation nulle se transforme ainsi en une solution visqueuse, instantanément thixotrope avec CaCl_2 , douée de propriétés vectorielles vis-à-vis de la lumière polarisée, extrêmement intense avec CaCl_2 . Il ne semble point douteux que la polymérisation de la G-actine constitue un phénomène comprenant plusieurs réactions successives (STRAUB³).

L'étude, au microscope électronique, de la transformation G-actine \rightarrow F-actine (avec les réserves qu'appellent les conditions particulières dans lesquelles de semblables études doivent nécessairement être effectuées) révèle une différence de forme très grande entre les deux protéines, la F-actine semblant être constituée de très longs filaments formés par la juxtaposition bout à bout d'un grand nombre de corpuscules plus ou moins sphériques de G-actine (JAKUS ET HALL⁶, ASTBURY, PERRY, ET REED^{7, 8}, ROZSA ET STAUDINGER⁹).

Pour STRAUB³, la polymérisation de la G-actine nécessiterait certains groupements prosthétiques qui peuvent être presque complètement éliminés par une longue dialyse de la solution de G-actine contre l'eau distillée. Rien n'est connu encore quant à la nature de ces groupements. D'autre part, pour le même auteur, la polymérisation appelle l'intervention de groupes aisément oxydables; c'est ainsi que KMnO_4 dépolymérise réversiblement la F-actine.

Enfin, une mention particulière doit être faite pour KI qui, comme tous les autres électrolytes, polymérise la G-actine, mais seulement à de faibles concentrations; au delà cet électrolyte dépolymérise irréversiblement la F-actine.

Les faits relatés dans ce travail sont-ils de nature à jeter quelque lumière sur ces phénomènes?

En ne tenant compte que des mesures électrocinétiques, on pourrait être tenté d'imaginer que les différences de vitesse entre G-actine (rendue impolymérisable par dialyse ou par NaI) et F-actine soient dues à la forme différente des particules plus ou moins orientées dans le champ électrique; encore éprouverait-on certaines difficultés pour expliquer précisément que c'est la forme la plus asymétrique et la plus visqueuse (polymère) qui chemine le plus rapidement. Mais les mesures de p_H et celles effectuées à l'appareil de WARBURG nous dispensent de semblables explications puisqu'elles nous montrent que des échanges d' H^+ accompagnent la transformation G-actine \rightarrow F-actine et que par conséquent les charges portées par ces deux sortes de molécules sont nécessairement différentes, ce qui implique également des différences dans les vitesses électrocinétiques. Et celles-ci sont bien dues à celles-là, car à toute libération d' H^+ doit correspondre une diminution du p.i. et par conséquent une vitesse accrue dans un champ électrique.

Tout se résume donc en ceci: quel est le mécanisme qui est la cause de ces changements dans le p.i. de la protéine? Celui-ci étant essentiellement conditionné par le nombre et le p_K des charges électriques portées par la molécule et le nombre pouvant ici très vraisemblablement être considéré comme constant, on est ainsi amené à penser que la transformation est accompagnée de changements dans la constante de dissociation de certains groupements ionogènes de la molécule. Les mesures électrophorétiques nous indiquent que la molécule polymérisée porte—toutes autres conditions étant les mêmes—plus de charges positives (ou moins de charges négatives) que la forme globulaire, mais il est difficile d'aller plus loin. Si nous n'avions à considérer que la molécule protidique elle-même et les ions utilisés pour la transformation, nous pourrions sans doute formuler des suggestions, comme par exemple la formation de protéinate de Ca peu dissociable et la libération concomitante d' H^+ dans les phénomènes de polymérisation par Ca^{++} . Mais si cette polymérisation nécessite également la présence d'un couple prosthétique et la mise en jeu de radicaux aisément oxydables, comme semblent bien le montrer les travaux de STRAUB³, l'ignorance même dans laquelle nous nous trouvons quant à la nature de ces groupements rend a priori caduques toutes les hypothèses que nous pourrions formuler. Il existe d'ailleurs vraisemblablement plusieurs degrés possibles de polymérisation et de dépolymérisation, ce qui expliquerait que nos mesures à l'appareil de WARBURG ne donnent pas les mêmes résultats avec KCl qu'avec $CaCl_2$ et que la dépolymérisation par NaI n'est pas quantitativement l'inverse de la polymérisation.

Du point de vue physiologique (malgré l'incertitude dans laquelle nous sommes quant au rôle que peut jouer, dans les phénomènes de contraction et d'élasticité musculaires, cette actine extraite du muscle par des procédés si exceptionnellement drastiques que l'on est en droit de se demander si elle existe comme telle dans le myone), le fait que le passage de la forme polymère à la forme monomère ou réciproquement, de certaines protéines musculaires, peut s'accompagner d'échanges somme toute considérables dans la $[H^+]$ mérite une attention spéciale. Il n'est en effet pas exclu, a priori, que certaines déformations mécaniques du muscle (par exemple son élongation) ne puissent rompre l'équilibre de systèmes polymérisés en les transformant en systèmes de moindre

polymérisation (avec—dans le cas de l'actine—absorption d' H^+) capables de retrouver leur complexité primitive lorsque cesse la cause de la déformation. Peut-être trouverions-nous enfin, dans un système de ce genre, l'origine de l'alcalinisation qui accompagne tout étirement d'un muscle et que nous avons d'ailleurs, à l'époque, rapporté à un changement dans le p.i. de l'une ou de l'autre protéine intervenant dans l'édifice contractile et élastique du muscle (DUBUISSON¹⁰).

RÉSUMÉ

La vitesse électrocinétique de la F-actine est plus grande que celle de la G-actine aux pH 7.4-7.6. La transformation G-actine \rightarrow F-actine, sous l'influence de $MgCl_2$, $CaCl_2$, KCl , est accompagnée d'une libération d' H^+ : $45 \cdot 10^{-8}$ équiv. (Ca^{++}), $3,5 \cdot 10^{-8}$ équiv. (K^+) par gramme d'actine.

La dépolymérisation de la F-actine par NaI s'accompagne d'une absorption d' H^+ .

Il est supposé que ces phénomènes sont dus à une modification dans la distribution de certains groupements ionogènes lors du phénomène de polymérisation.

SUMMARY

The electrophoretic velocity of F-actin is greater than that of G-actin at a pH of 7.4-7.6. The transformation of G-actin into F-actin under the influence of $MgCl_2$, $CaCl_2$, KCl , is accompanied by a liberation of H^+ ions: $45 \cdot 10^{-8}$ aequiv. (Ca^{++}), $3,5 \cdot 10^{-8}$ aequiv. (K^+) per g of actin.

The depolymerization of F-actin by NaI is accompanied by an absorption of H^+ -ions.

The suggestion is put forward that these phenomena are due to a change in the distribution of certain ionogenic groups during polymerization.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Geschwindigkeit von F-Aktin bei der Elektrophorese ist bei pH 7.4-7.6 grösser als die von G-Aktin. Bei Umwandlung G-Aktin \rightarrow F-Aktin unter dem Einfluss von $MgCl_2$, $CaCl_2$, KCl werden H^+ -Ionen frei, und zwar $45 \cdot 10^{-8}$ Equiv. (Ca^{++}), $3,5 \cdot 10^{-8}$ Equiv. (K^+) pro Gramm Aktin.

Die Depolymerisation von F-Aktin durch NaI ist von H^+ -Absorption begleitet.

Es wird angenommen, dass diese Vorgänge durch eine Veränderung in der Verteilung gewisser ionogener Gruppen bei der Polymerisation bewirkt werden.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ F. B. STRAUB, *Studies Inst. Med. Chem. Univ. Szeged*, 2 (1942) 3.
- ² F. B. STRAUB, *Studies Inst. Med. Chem. Univ. Szeged*, 3 (1943) 23.
- ³ G. FEUER, F. MOLNAR, E. PETTKO, ET F. B. STRAUB, *Hung. Acta Physiol.*, 1 (1948) 150.
- ⁴ M. DUBUISSON ET J. JACOB, *Bull. soc. roy. sci. Liège*, 14 (1945) 133.
- ⁵ M. DUBUISSON ET A. DEBOT, *Arch. intern. physiol.*, 50 (1940) 54.
- ⁶ M. A. JAKUS ET C. E. HALL, *J. Biol. Chem.*, 167 (1947) 706.
- ⁷ W. T. ASTBURY, S. V. PERRY, R. REED, ET L. C. SPARK, *Biochim. Biophys. Acta*, 1 (1947) 379.
- ⁸ S. V. PERRY ET R. REED, *Biochim. Biophys. Acta*, 1 (1947) 379.
- ⁹ G. ROZSA ET M. STAUDINGER, *Makromolek. Chem.*, 2 (1948) 66.
- ¹⁰ M. DUBUISSON, *Arch. intern. physiol.*, 50 (1940) 203.

Reçu le 11 juillet 1949