

ORSAY
n° d'ordre :

UNIVERSITE DE PARIS-SUD
CENTRE D'ORSAY

THESE

présentée

Pour obtenir

Le grade de DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

PAR

Régina PESSOA-PUREUR

SUJET : Une nouvelle catégorie de filaments de 3-4 nm du cytosquelette
de l'oeuf et du muscle lisse d'échinodermes.
Biochimie, immunocytochimie et ultrastructure.

soutenue le 28 juin 1985 devant la Commission d'examen

MM. ROSSIGNOL Bernard Président

BORNENS Michel

ADOUTTE André

SANDOZ Daniel

Mme SOYER-GOBILLARD Marie-Odile

M. PUDLES Julio

ORSAY
n° d'ordre :

UNIVERSITE DE PARIS-SUD
CENTRE D'ORSAY

THESE

présentée

Pour obtenir

Le grade de DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

PAR

Régina PESSOA-PUREUR

SUJET : Une nouvelle catégorie de filaments de 3-4 nm du cytosquelette de l'oeuf et du muscle lisse d'échinodermes.
Biochimie, immunocytochimie et ultrastructure.

soutenue le 28 juin 1985 devant la Commission d'examen

MM. ROSSIGNOL Bernard Président

BORNENS Michel

ADOUTTE André

SANDOZ Daniel

Mme SOYER-GOBILLARD Marie-Odile

M. PUDLES Julio

à Paulo

REMERCIEMENTS

Je remercie tout particulièrement Monsieur Julio Pudles qui m'a accueillie dans son Laboratoire de Structure et Réactivité des Protéines à l'Université Paris Sud, Orsay, qui m'a proposé ce travail et guidée avec beaucoup de dévouement au cours de sa réalisation.

Que ce remerciement personnel soit aussi l'expression de ma gratitude envers ceux qui, dans son équipe, ont contribué à la concrétisation de cette thèse.

Une partie de ce travail a été développée au Laboratoire Arago, Banyuls-sur-Mer, dont l'accueil chaleureux de son personnel m'est très cher.

Je remercie également la Laboratoire de Biologie Cellulaire, Orsay, pour la mise à disposition de son équipement qui m'a permis de réaliser une partie des techniques de microscopie électronique et des travaux photographiques. J'ai beaucoup apprécié l'ambiance amicale de ce laboratoire. Je remercie tout spécialement Annie Charrier pour son aide dans la confection des figures.

Mes remerciements s'adressent également au Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Brésil, qui m'a accordé une bourse d'études grâce à laquelle j'ai pu mener à bien ce projet.

Je suis aussi très reconnaissante au Departamento de Bioquímica da VFRGS de Porto Alegre, Brésil, de m'avoir toujours soutenue moralement et matériellement pendant la durée de ce travail.

ABSTRACT

This work reports the characterization of some of the cytoskeletal proteins from two echinoderms (Paracentrotus lividus and Holothuria tubulosa) smooth muscle cells, as well as from the non fertilized P. lividus egg cytomatrix.

Biochemical, immunocytochemical and ultrastructural studies show that 10 nm filaments are absent in these cytoskeletons. However, in these structures, evidences are presented showing the presence of a novel type of network made of 3-4 nm filaments.

Immunogold electron microscopy reveals that two cytoskeletal proteins of 54 and 56 Kd are constituents of these filaments in the Paracentrotus lividus smooth muscle and in the egg cytomatrix. These filaments were named echinonematin filaments.

The proteins constituents of the 3-4 nm filaments from Holothuria tubulosa smooth muscle do not cross react with the anti-serum prepared against the two proteins from sea urchin.

We propose that these 3-4 nm filaments might play the role of intermediate filaments in the organization and fonction of the cytoskeleton of these two echinoderms smooth muscles.

KEY WORDS : Paracentrotus lividus - Holothuria tubulosa - Smooth muscle - Egg - 3-4 nm filaments.

SOMMAIRE

INTRODUCTION AU TRAVAIL	1
<u>CHAPITRE I. INTRODUCTION GENERALE</u>	
Le cytosquelette des cellules eucaryotes	3
1. HISTORIQUE	4
2. LES MICROFILAMENTS, LES MICROTUBULES ET LES FILAMENTS INTERMEDIAIRES	5
3. ROLE DES MICROFILAMENTS DANS LE CYTOSQUELETTE DES CELLULES EUCARYOTES	10
4. ROLE DES MICROTUBULES DANS LE CYTOSQUELETTE DES CELLULES EUCARYOTES	12
5. ROLE DES FILAMENTS INTERMEDIAIRES DANS LES CELLULES EUCARYOTES	13
6. LE RESEAU MICROTRABECULAIRE	17
7. LE CYTOSQUELETTE DE L'OEUF D'OURSIN	21
8. LE CYTOSQUELETTE DES CELLULES MUSCULAIRES	
8.1 Les protéines contractiles	23
8.2 Le muscle lisse	24
8.3 Le muscle strié	26
<u>CHAPITRE II. MATERIELS ET METHODES</u>	28
1. DOSAGE DES PROTEINES	30

2. ANALYSE DES PROTEINES PAR ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE EN MILIEU DENATURANT (SDS-PAGE)	30
3. TECHNIQUES DE FOCALISATION ISOELECTRIQUE	31
3.1 Focalisation isoélectrique à l'équilibre (IEF)	31
3.2 Focalisation isoélectrique dans des conditions de non-équilibre (NEPHGE)	32
4. OBTENTION DU MATERIEL BIOLOGIQUE	32
4.1 Les animaux	32
4.2 Tissus et cellules	33
4.3 Préparation de la cytomatrice résistante au traitement hexylène glycol-Triton X-100 à partir de l'oeuf d'oursin	33
4.4 Elimination des cellules épithéliales et préparation des tissus riches en cellules de muscle lisse	34
4.5 Fractionnement des protéines contractiles à faible et haute force ionique	35
4.5.A Muscle lisse de rat	35
4.5.B Muscle lisse d'oursin	36
4.6 Fractionnement des protéines directement à haute force ionique, à partir des cellules de muscle lisse d'oursin, d'holothurie et de rat	40
4.7 Fractionnement de la cytomatrice résistante à l'hexylène glycol-Triton X-100 à partir de l'oeuf d'oursin	40
5. ISOLEMENT DES PROTEINES PAR ELECTROPHORESE PREPARATIVE	41

6. ESSAI DE POLYMERISATION <u>IN VITRO</u> DES PROTEINES ISOLEES PAR ELECTROPHORESE PREPARATIVE	43
7. TECHNIQUES IMMUNOCYTOCHIMIQUES	44
7.1 Préparation de l'antisérum contre la protéine de 54000-55000 daltons du muscle lisse d'oursin	44
7.2 Détermination de la spécificité de l'anticorps	45
7.2.A Electrotransfert	45
7.2.B Transfert par diffusion	45
7.2.C Réaction immunologique	46
7.3 Immunofluorescence	47
7.3.A Préparation des échantillons	47
7.3.B Procédé expérimental d'immunofluorescence	48
7.4 Immunocytochimie à l'or colloïdal	49
8. IDENTIFICATION DES FILAMENTS D'ACTINE PAR LA CHAINE LOURDE DE LA MEROMYOSINE (HMM)	50
9. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	51
9.1 Tissus musculaires	51
9.2 Cytomatrices des oeufs non fécondés	51
<u>CHAPITRE III. ETUDE BIOCHIMIQUE COMPARATIVE DES MUSCLES LISSES D'INTESTIN DE RAT ET D'OURSIN. ULTRASTRUCTURE DU MUSCLE LISSE D'OURSIN</u>	52
1. L'INTESTIN D'OURSIN	55
1.1 Description générale	55

1.2 Histologie	55
2. ETUDE COMPARATIVE DES PROFILS ELECTROPHORETIQUES DES PROTEINES DES MUSCLES LISSES DE RAT ET D'OURSIN	57
3. ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES PROTEINES DE 54000-56000 DALTONS DU MUSCLE LISSE DE RAT	64
4. ETUDE DES PROTEINES DE 54000-56000 DALTONS DES CELLULES DU MUSCLE LISSE DE L'INTESTIN D'OURSIN	69
4.1 Extraction et isolement des protéines de 54000-56000 daltons à partir de la fraction insoluble dans du KCl 1M, sédimentable à 100000 g	74
4.2 Identification immunologique des protéines de 54000-56000 daltons	75
4.3 Focalisation isoélectrique des protéines de 54000-56000 daltons	77
4.4 Essai de polymérisation <u>in vitro</u> des protéines de 54000-56000 daltons	77
4.5 Localisation des protéines de 54000-56000 daltons dans le muscle lisse d'oursin par des méthodes immunocytochimiques	79
5. DISCUSSION	87
<u>CHAPITRE IV.</u> LE CYTOSQUELETTE DE L'OEUF D'OURSIN NON FECONDE	90
1. OBTENTION DE LA CYTOMATRICE DE L'OEUF D'OURSIN NON FECONDE ET FRACTIONNEMENT DES PROTEINES A HAUTE FORCE IONIQUE	92
2. IDENTIFICATION IMMUNOLOGIQUE DES PROTEINES DE 54000-56000 DALTONS DE LA CYTOMATRICE DE L'OEUF NON FECONDE	94

3. ETUDE COMPARATIVE ENTRE LES PROTEINES DE 54000-56000 DALTONS DE L'OEUF ET CELLES DU MUSCLE LISSE D'OURSIN	96
4. IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE AU COURS DU CYCLE MITOTIQUE	98
5. ULTRASTRUCTURE ET IMMUNOCYTOCHIMIE A L'OR COLLOIDAL	101
6. DISCUSSION	107
<u>CHAPITRE V. ULTRASTRUCTURE DU MUSCLE LISSE D'HOLOTHURIE</u>	111
1. LE SYSTEME DIGESTIF	113
2. L'HISTOLOGIE DE L'INTESTIN	114
3. FRACTIONNEMENT DES PROTEINES DU MUSCLE LISSE D'HOLOTHURIE. ETUDE BIOCHIMIQUE ET IMMUNOCYTOCHIMIQUE DE LA PROTEINE DE 56000 DALTONS	114
4. ETUDE STRUCTURALE DES CELLULES DU MUSCLE LISSE D'HOLOTHURIE	119
4.1 Microscopie optique	119
4.2 Microscopie électronique	122
5. DISCUSSION	122
<u>CHAPITRE VI. DISCUSSION GENERALE</u>	125
Introduction et synthèse des résultats	126
Etude comparative entre des protéines du cytosquelette du muscle lisse de rat et d'échinodermes	127
L'ultrastructure des muscles lisses d'échinodermes	128
Identification des protéines constituant les filaments de 3-4 nm du muscle lisse d'oursin	130

Le cytosquelette de l'oeuf d'oursin non fécondé	130
Les filaments de 2-4 nm des cellules eucaryotes	131
Conclusion	133
REFERENCES	135

INTRODUCTION AU TRAVAIL

Dans cette thèse nous présentons une étude physico-chimique, immunocytochimique et ultrastructurale de protéines appartenant au cytosquelette des cellules de muscle lisse de deux échinodermes, Paracentrotus lividus et Holothuria tubulosa. Nous avons également isolé la cytomatrice de l'oeuf non fécondé de P. lividus, sur laquelle nous avons mené une étude analogue.

Si de nombreux travaux ont bien décrit et caractérisé, chez les vertébrés, les constituants du cytosquelette des cellules de muscle lisse, il n'existe à l'heure actuelle que peu de données concernant les propriétés physico-chimiques et l'organisation ultrastructurale du cytosquelette des cellules de muscle lisse d'invertébrés marins. Pour réaliser cette étude, nous avons choisi le muscle lisse de l'intestin car son abondance relative chez ces échinodermes rendait possible une étude biochimique. De plus, ce choix nous permettait d'établir une étude comparative avec un tissu ayant une fonction analogue chez les vertébrés.

Nous avons cherché la présence de protéines de type filament intermédiaire dans le muscle lisse d'échinodermes, dans le but de comparer leurs propriétés physico-chimiques et immunologiques avec celles des filaments intermédiaires de muscles lisses de vertébrés, en particulier du muscle lisse d'intestin de rat.

Nos études sur le muscle lisse de P. lividus ont révélé la présence de protéines de 54000-56000 daltons se comportant dans un milieu de haute force ionique de façon analogue à celle des protéines de type filament intermédiaire. Cependant, nous n'avons pas identifié l'existence de filaments de 10 nm dans ce tissu. Nous démontrons par contre que les protéines de 54000-56000 daltons sont associées à une nouvelle catégorie de filaments de 3-4 nm que nous avons appelé échinonématique.

Nous nous sommes intéressés à l'expression de ces protéines au cours du développement embryonnaire. Nous avons isolé pour la première fois la

cytomatrice de l'oeuf d'oursin non fécondé. Cette cytomatrice est constituée d'un réseau cortical de filaments de 3-4 nm. Nos résultats montrent l'existence de protéines de 54000-56000 daltons dans la cytomatrice qui présentent des propriétés physico-chimiques et immunologiques analogues à celles des protéines de même poids moléculaire du muscle d'oursin. Les résultats d'immunocytochimie à l'or colloïdal suggèrent que ces protéines sont associées aux filaments de 3-4 nm qui constituent le cytosquelette de l'oeuf non fécondé.

Dans le muscle lisse de l'intestin de l'H. tubulosa nous avons mis en évidence l'existence d'un réseau de filaments de 3-4 nm semblable à celui du muscle lisse d'oursin. Cependant, l'absence de réaction croisée avec l'anticorps dirigé contre les protéines de 54000-65000 daltons de l'oursin ne nous a pas permis d'identifier les protéines qui les constituent.

Cette thèse est constituée de six chapitres :

Dans le premier, nous présentons une introduction générale sur quelques aspects de la connaissance actuelle des éléments du cytosquelette des cellules eucaryotes, leurs interactions et fonctions probables.

Dans le deuxième, nous présentons les différentes techniques expérimentales utilisées.

Le troisième est consacré à l'étude des protéines du cytosquelette des cellules musculaires de l'intestin d'oursin.

Dans le quatrième, nous étudions la cytomatrice de l'oeuf non fécondé.

Le cinquième contient les résultats concernant le muscle lisse de l'H. tubulosa.

Nous présentons, finalement, dans le sixième et dernier chapitre, la synthèse des résultats et nous discutons le rôle probable de cette nouvelle catégorie de filaments de 3-4 nm.

CHAPITRE I

INTRODUCTION GENERALE

Le cytosquelette des cellules eucaryotes

1. HISTORIQUE
2. LES MICROFILAMENTS, LES MICROTUBULES ET LES FILAMENTS INTERMEDIAIRES
3. ROLE DES MICROFILAMENTS DANS LE CYTOSQUELETTE DES CELLULES EUCARYOTES
4. ROLE DES MICROTUBULES DANS LE CYTOSQUELETTE DES CELLULES EUCARYOTES
5. ROLE DES FILAMENTS INTERMEDIAIRES DANS LES CELLULES EUCARYOTES
6. LE RESEAU MICROTRABECULAIRE
7. LE CYTOSQUELETTE DE L'OEUF D'OURSIN
8. LE CYTOSQUELETTE DES CELLULES MUSCULAIRES
 - 8.1 Les protéines contractiles
 - 8.2 Le muscle lisse
 - 8.3 Le muscle strié

1. HISTORIQUE

Au début du XIX^e siècle, les progrès au niveau des microscopes optiques, des microtomes et la découverte de substances chimiques capables de fixer et de colorer les cellules ont attiré l'attention des biologistes de l'époque sur la nature physique du protoplasme.

Félix Dujardin a publié en 1835 une description du cytoplasme, qu'il appelait sarcode, basée sur des observations microscopiques et sur des essais expérimentaux réalisés sur des cellules végétales (1). Il a remarqué que le sarcode, présent dans toutes les cellules examinées, consistait en une masse globulaire visqueuse, élastique et insoluble dans l'eau. A partir des observations de Dujardin, il a été suggéré que le sarcode devait être une substance organisée de façon très particulière, en contraste avec des systèmes chimiques et physiques ordinaires. Le sarcode a été appelé par la suite hyaloplasme. Afin de définir la nature du hyaloplasme, de nombreuses études expérimentales ont alors été entreprises. Des théories basées sur des observations microscopiques ont été proposées. Mais ces observations étaient faites sur des cellules traitées selon les méthodes rudimentaires connues à l'époque, qui, dans la plupart des cas, provoquaient des artefacts.

Heidenhain (2) a proposé une structure fibrillaire du hyaloplasme ; Butschi (3) a suggéré une structure alvéolaire ressemblant à une éponge, le "spongioplasme". Par contre, Dahlgren (4) a proposé une organisation réticulaire de la substance gélatineuse existant à l'intérieur des cellules. Plus tard, les techniques de micromanipulation développées par Robert Chambers (5), ainsi que l'observation de l'effet provoqué par l'introduction de gouttelettes d'huile dans le cytoplasme des cellules, ont été largement utilisées par les biologistes pour mettre en évidence l'élasticité du cytoplasme. Scarth (6) a démontré les propriétés visco-élastiques du cytoplasme, en établissant qu'un noyau de Spirogyre déplacé de quelques micromètres, par une intervention extérieure, retournait à sa position initiale une fois l'intervention terminée. Des expériences de stratification par centrifugation sur des oeufs d'oursin (5) et d'Ascaris (7) ont suggéré l'existence d'un support physique élastique, responsable de l'organisation des composants intracellu-

lares. Les composants cytoplasmiques ainsi déplacés à l'intérieur de ces cellules étaient capables de revenir presque complètement à leurs positions d'origine, sans préjudice pour l'activité cellulaire.

Toutes les connaissances accumulées sur la structure du cytoplasme à cette époque ont amené Joseph Needham en 1936 à employer pour la première fois le terme de "squelette cellulaire" (5). Plus tard, l'effet réversible d'une augmentation de la pression hydrostatique sur la consistance du cytoplasme a suggéré l'existence d'un phénomène de transformation sol-gel in vivo (8). De nouvelles évidences expérimentales ont amené Frey-Wyssling (9) en 1948 à élaborer un schéma décrivant la matrice cellulaire comme un réseau extrêmement serré contenant des substances solubles telles que des sels minéraux et du glucose, les liaisons entre les filaments du réseau pouvant être continuellement refaites. Ce système constituerait donc un gel "vivant".

Crick et Hughes (10) ont introduit des particules de fer à l'intérieur du cytoplasme des cellules, puis les ont soumises à un champ magnétique. D'après leurs résultats, ils ont conclu que le cytoplasme était un gel thixotrope. Selon eux, la résistance et l'élasticité présentées par le cytoplasme sont dûes à un réseau filamenteux capable de régénérer sa forme initiale après la perturbation.

Les techniques de microscopie électronique développées depuis les années 1940 ont largement contribué à faire progresser la connaissance du cytosquelette. Dix ans plus tard les coupes ultra fines ont ouvert de nouvelles perspectives pour l'étude de l'organisation du cytosquelette.

2. LES MICROFILAMENTS, LES MICROTUBULES ET LES FILAMENTS INTERMÉDIAIRES

Le cytosquelette des cellules eucaryotes, tel qu'il est conçu aujourd'hui, est composé essentiellement de trois catégories de structures bien définies : les microfilaments, les microtubules et les filaments intermédiaires. Récemment, une quatrième catégorie a été mise en évidence, le réseau microtrabéculaire. Chacune de ces structures, à l'exception du réseau microtrabéculaire de nature inconnue, est formée

de monomères capables de s'associer pour constituer un polymère. Chaque polymère exerce dans la cellule des fonctions bien spécifiques.

Les filaments d'actine, les microfilaments, sont des structures polarisées, constituées de molécules globulaires d'actine monomérique (actine-G) de poids moléculaire 43000 daltons. Cette protéine polymérise, donnant formation à des filaments constitués de deux brins torsadés en hélice de pas 700Å et dont le diamètre est de l'ordre de 7 nm. La première étape de la polymérisation de l'actine in vitro est la nucléation, pendant laquelle deux ou trois molécules d'actine-G doivent s'aligner dans une conformation bien déterminée ; à partir de ce centre de nucléation le polymère s'allonge rapidement (11). La molécule d'actine est synthétisée dans les cellules eucaryotes par plusieurs gènes qui codent pour des molécules très semblables, mises en évidence dans différents tissus à différentes étapes de leur évolution embryonnaire. Cependant, ces gènes sont très conservés et des molécules d'actine d'origines très éloignées sont fonctionnellement interchangeables. L'actine est un constituant majoritaire de la plupart des cellules eucaryotes, correspondant dans certains cas à 10 % de la masse totale de protéine.

Les microtubules sont des structures cylindriques, rectilignes et polaires qui apparaissent vides au microscope électronique. Ces structures sont très labiles, capables de dépolymériser in vitro et in vivo sous l'effet de basses températures ou de pressions élevées (15,16). Les microtubules ont un diamètre externe de 25 nm et sont formés de sous-unités globulaires de 55000 daltons, appelées tubuline. La tubuline se présente sous la forme d'un hétérodimère d' α et de β tubuline. Ces deux molécules sont très conservées dans l'échelle biologique et ayant des séquences d'acides aminés très semblables. L'association de la tubuline en microtubule est accompagnée de l'hydrolyse d'une molécule de GTP qui, de même que l'ATP du monomère d'actine, n'intervient pas directement dans le processus de polymérisation, mais règle plutôt sa vitesse. Les dimères $\alpha \beta$ de tubuline s'associent bout à bout linéairement par des interactions hydrophobes et forment un protofilament. L'association latérale de treize protofilaments constitue un microtubule. La cinétique de polymérisation in

in vitro de la tubuline présente, comme dans le cas de l'actine, une phase initiale de nucléation, ou lag phase, suivie d'une phase d'élongation (12,13,14).

Les microfilaments d'actine et les microtubules sont, comme il a été signalé ci-dessus, des structures polaires à cause de l'orientation des monomères asymétriques qui les composent. Cette asymétrie est importante pour leur fonction à l'intérieur du cytoplasme et pour leur croissance in vitro et in vivo. En effet, à cause de cette asymétrie, les vitesses de polymérisation et de dépolymérisation ne sont pas les mêmes des deux côtés du polymère. Pour une concentration donnée de molécules libres, l'incorporation des sous-unités sur l'extrémité dite positive (+) est plus importante que la perte, tandis que sur l'extrémité dite négative (-) la tendance à la dépolymérisation est plus accentuée que la tendance à l'incorporation de nouveaux monomères. Autrement dit, la concentration critique, définie comme la concentration des molécules solubles à laquelle la vitesse d'incorporation est égale à celle de dissociation, est plus faible à l'extrémité (+) qu'à l'extrémité (-) (17,18). Pour des concentrations entre ces deux valeurs critiques, la vitesse d'incorporation soit de l'actine, soit de la tubuline peut être égale à celle de dissociation. Le polymère se trouve alors dans un état d'équilibre appelé "treadmilling" pour lequel la croissance nette est nulle (19,20). Toutefois, malgré cette absence d'augmentation de longueur, il se produit à l'intérieur du polymère un mouvement continu de "translocation" des monomères qui sont incorporés du côté positif et dissociés du côté négatif.

Un autre modèle a été proposé par Mitchison et Kirschner (21,22) pour l'association des microtubules in vitro et in vivo. Leur modèle est basé sur l'existence ou non d'un "cap" formé par des monomères contenant du GTP, liés à l'extrémité du microtubule (23). L'hydrolyse du GTP se fait grâce à une variation conformationnelle de la sous-unité incorporée au polymère. Il existe cependant un délai entre l'incorporation d'une sous-unité liée au GTP et l'hydrolyse du nucléotide. En présence de fortes concentrations de tubuline libre, la vitesse d'incorporation est élevée et l'hydrolyse du nucléotide est peu probable. De ce fait résulte la stabilité du polymère qui tend donc à s'allonger. Par contre, lorsque

la concentration de tubuline libre en solution diminue, l'incorporation de nouveaux monomères est moins importante et la probabilité d'hydrolyse augmente. Le nombre de monomères liés au GDP, exposés à l'extrémité du polymère devient donc plus important.

L'équilibre entre les monomères de tubuline liées au GTP, stabilisant l'extrémité du microtubule, et ceux liés au GDP, très dissociables, explique l'existence de microtubules qui s'allongent et d'autres qui dépolymérisent même à de basses concentrations de tubuline libre. Ces deux modèles basés sur des expériences in vitro, ont été utilisés pour essayer d'expliquer le comportement dynamique de ces structures in vivo.

La troisième catégorie de structures bien définies composant le cytosquelette des cellules eucaryotes consiste en des filaments dits intermédiaires. Ceux-ci sont des structures cytoplasmiques très insolubles, ayant un diamètre de l'ordre de 10 nm, intermédiaire entre celui des microfilaments et celui des microtubules. Les filaments intermédiaires sont constitués d'une famille de monomères de différents poids moléculaires (de 40000 à 200000 daltons), que l'on peut classer en cinq groupes en fonction de leurs propriétés biochimiques et immunologiques. Ainsi on trouve la desmine ou squelettine dans les cellules musculaires (24), la vimentine ou decamine dans les cellules d'origine mesenchymales (25), les cytokératines dans les tissus épithéliaux (25), les neurofilaments dans les neurones (26) et les filaments gliaux dans les cellules gliales (27).

En dépit des différences entre les propriétés des sous-unités qui composent les filaments intermédiaires, ceux-ci présentent une étonnante homogénéité structurale in vitro et in vivo, ainsi que des comportements de solubilité très semblables.

Les sous-unités des filaments intermédiaires sont constituées de molécules fibreuses, contrairement aux monomères d'actine et aux dimères de tubuline qui sont des structures globulaires (28,29,30). Des études de diffraction de rayons-X montrent que toutes les sous-unités contiennent un large domaine central en α -hélice, formé par quatre régions d' α -hélice "coiled-coil" entrecoupées par des domaines non

α -hélice (27,31,32,33,34,35). La détermination des homologues de séquences d'acides aminés entre les différentes sous-unités des filaments intermédiaires ainsi que les dimensions très semblables des domaines α -hélice a montré l'existence d'au moins trois types différents de domaines : type I pour les kératines acides ; type II pour les kératines basiques et type III pour la desmine et la vimentine (32,33,36,37). Par contre, les extrémités amine et carboxyl terminales des différentes sous-unités varient largement par leur taille et par leur séquence d'acides aminés. Ces régions sont normalement basiques, adoptant une conformation globulaire ou en "random coil".

L'organisation des sous-unités à l'intérieur des filaments intermédiaires n'est pas encore bien connue. Les résultats expérimentaux obtenus par différents auteurs suggèrent que les filaments intermédiaires sont formés par l'association latérale des monomères au niveau du domaine central α -hélice, commun à toutes les sous-unités. Les extrémités, qui sont très variables d'un monomère à l'autre, ne participent pas directement à la structure du filament. Toutefois, elles sont probablement liées aux différentes propriétés et fonctions des filaments intermédiaires dans les cellules (35,38,39).

L'association latérale des sous-unités forme des protofilaments. Différents modèles de protofilaments ont été proposés. Steinert et col. (39) ont proposé que les protofilaments sont formés de trois sous-unités alignées côte à côte, formant une unité "coiled-coil". Par contre, Gruen et Woods (40) ont suggéré que le protofilament consiste d'une paire de deux sous-unités arrangées en "coiled-coil".

L'organisation des protofilaments dans la structure des filaments intermédiaires n'est pas non plus bien établie. Certains modèles suggèrent que les protofilaments s'associent par deux ou trois, constituant une protofibrille. Quatre protofibrilles formeraient donc le filament de 10 nm (41,42). D'autres auteurs ont proposé que les filaments intermédiaires soient polymorphes et composés de sept, ou de dix protofilaments (36).

Les filaments intermédiaires peuvent être amenés à polymériser ou

dépolymériser in vitro par des modifications des conditions de pH et de force ionique du milieu. Cependant, dans le cytoplasme, contrairement au cas des microfilaments et des microtubules, les filaments intermédiaires semblent être très stables. Aucun processus d'association et dissociation du type "treadmilling" n'a été détecté pendant le cycle cellulaire. Il n'existe pas non plus d'évidences d'une réserve de sous-unités non polymérisées à l'intérieur du cytoplasme.

La découverte d'enzymes protéolytiques activées par le Ca^{++} capables de dégrader spécifiquement les différentes classes de filaments intermédiaires in vitro (43), peut suggérer un mécanisme intracellulaire de régulation de ces structures par un clivage enzymatique sélectif. Toutefois, les conditions de cette activité enzymatique in vivo demeurent inconnues.

Les trois catégories de filaments décrits ci-dessus composent le cytosquelette de la majorité des cellules eucaryotes. Leur organisation est très complexe, et assure un support mécanique responsable de la morphologie, de la compartimentalisation des organelles intracellulaires et des diverses formes de motilité cellulaire. C'est grâce aux différentes propriétés présentées par les composants du cytosquelette qu'il peut exister une interaction organisée dans l'espace et dans le temps, coordonnant les fonctions vitales tout au long du cycle cellulaire. Souvent cette organisation implique des interactions entre les composants du cytosquelette et une autre catégorie de protéines, les protéines associées, dont les fonctions peuvent aller de la régulation de la stabilité des filaments à l'établissement des interactions entre eux et avec d'autres structures cellulaires.

3. ROLE DES MICROFILAMENTS DANS LE CYTOSQUELETTE DES CELLULES EUCARYOTES

Dans les cellules non musculaires les microfilaments d'actine se trouvent surtout sur la périphérie des cellules, la région corticale, où l'architecture de ces filaments est très variée. Les microfilaments remplissent un rôle fondamental dans la cellule, soit comme support rigide et stable, par exemple à l'intérieur des microvillosités (44),

soit en participant intimement à différents mécanismes de motilité cellulaire, le plus souvent grâce à l'interaction avec les filaments de myosine, selon le mécanisme classique de la contraction musculaire (45). La réorganisation du cytoplasme est rendue possible aussi grâce à la structure labile des microfilaments. Ceux-ci sont capables de polymériser et dépolymériser rapidement, en réponse à l'association des protéines régulatrices, ou à l'action des agents externes (46).

Les faisceaux de microfilaments ont été particulièrement étudiés (47). Ces faisceaux peuvent se trouver alignés dans des extensions du cytoplasme, comme les microvillosités, abondantes dans les cellules épithéliales (44), dans la région corticale des oeufs fertilisés (48) et dans les cellules en culture (49). Dans ces structures, les faisceaux de microfilaments sont attachés à la membrane, plasmique de l'extrémité de la microvillosité par des protéines associées, comme la vinculine (44), et au "terminal web" constitué d'un réseau de filaments où la tropomyosine a été identifiée (47). Les faisceaux de microfilaments à l'intérieur des microvillosités sont maintenus par association à d'autres protéines, comme la villine et la fimbrine (47).

Des faisceaux de microfilaments moins compacts sont observés dans la région corticale des cellules en mouvement. Ils participent à l'émission de pseudopodes chez l'Amoeba et à la formation des lamellipodes impliqués dans l'attachement au substrat des fibroblastes en culture (50). Le mouvement améboïde et le déplacement des fibroblastes en culture sont sensibles à l'action de drogues comme la cytochalasine B et la phalloïdine, qui interviennent respectivement dans la polymérisation et la dépolymérisation des microfilaments (50). Ceux-ci peuvent aussi s'organiser sous forme de "fibres de stress" sur la surface ventrale de fibroblastes en culture, ainsi que dans certaines cellules épithéliales (49). Les "fibres de stress" sont constituées de faisceaux de filaments d'actine contenant des protéines associées, l'ensemble étant capable de se contracter en réponse à l'ATP. Il a été montré par immunofluorescence que cette organisation contient, en plus de l'actine, de la myosine, de l' α -actinine et de la tropomyosine (51,52). Dans les fibroblastes en culture, les "fibres de stress" sont ancrées à la membrane plasmique dans les régions de contact (53) avec le substrat par l'intermédiaire de

protéines associées. La contraction du système de filaments entraîne des altérations de la surface cellulaire (54,55).

Néanmoins, la majorité des filaments d'actine à l'intérieur du cytoplasme se trouve sous forme d'un réseau de filaments courts. Ce réseau est responsable de la consistance gélifiée du cytoplasme. Sa rupture dans une région donnée entraîne la transition de l'état de gel à l'état de sol, permettant la formation de courants intracellulaires et le déplacement des organelles (47,56).

4. ROLE DES MICROTUBULES DANS LE CYTOSQUELETTE DES CELLULES EUCARYOTES

Le rôle des microtubules dans la morphologie cellulaire a été mis en évidence dans différents types de cellules eucaryotes. Au cours du développement embryonnaire des organismes pluricellulaires, la forme de certaines cellules est déterminée par la mise en place de microtubules (57). Les microtubules interviennent également dans des mouvements cellulaires : ils y participent soit indirectement (53), en coordonnant les différents éléments du cytosquelette, soit directement comme dans le cas des battements ciliaires ou flagellaires (58).

La majorité des microtubules des cellules eucaryotes se forme à partir de sites bien déterminés appelés centres organisateurs des microtubules (MTOC). L'apparence des MTOC au microscope électronique est très variée (59). Les cellules de différents tissus des métazoaires possèdent un MTOC principal situé à la proximité du noyau. Le MTOC est constitué d'une paire de centrioles disposés à angle droit l'un par rapport à l'autre. Les centrioles sont entourés d'une substance d'aspect amorphe au microscope électronique, appelée matériel péricentriolaire. Cette substance joue un rôle important dans le contrôle de l'organisation des microtubules, en initiant l'association de nouveaux microtubules à différents temps du cycle cellulaire en réponse à des variations des conditions physiologiques (59).

Les cils, comme les flagelles, sont animés de mouvements pendulaires ou ondulants auxquels les microtubules participent directement grâce au

glissement des doublets périphériques les uns par rapport aux autres (60). Ces mouvements provoquent un déplacement du liquide extracellulaire par rapport à la cellule, ce qui peut permettre la nage si la cellule est libre.

Les microtubules sont des structures labiles, capables de polymériser et dépolymériser en réponse à certains facteurs comme la présence de Ca^{++} ou la diminution de la température. Certaines fonctions qui sont médiées par ces structures à l'intérieur du cytoplasme dépendent par conséquent de leur labilité.

La participation de microtubules a été démontrée dans une série de mouvements intracellulaires tels que le flux axonal qui transporte des substances le long de toute l'extension de l'axone, le phénomène d'exocytose (57) et le déplacement de fibroblastes en culture (53). Bien que le rôle exact des microtubules dans ces phénomènes ne soit pas encore bien compris, il y a des évidences que leur participation consiste plutôt à orienter et coordonner l'action d'autres éléments du cytosquelette plus directement engagés dans la génération de forces motrices.

L'interaction entre les microtubules et les filaments d'actine est proposée par plusieurs auteurs comme le mécanisme des mouvements intracellulaires. Les microtubules fonctionneraient indirectement comme support ou comme orientation, tandis que les filaments d'actine seraient les éléments contractiles directement impliqués dans le processus de mouvement grâce à leur capacité d'interagir avec la myosine. Les expériences biochimiques menées par Pollard et col. (61) montrent que l'interaction des microtubules et des microfilaments in vitro dépend de la présence de protéines de haut poids moléculaire, les MAPS.

5. ROLE DES FILAMENTS INTERMÉDIAIRES DANS LES CELLULES EUCARYOTES

Les filaments intermédiaires sont les structures les plus insolubles du cytosquelette. Ils ne sont extraits ni par les tampons de faible ou de forte force ionique ni par les détergents non ioniques. La solubi-

lisation des constituants des filaments intermédiaires sous forme monomérique ou oligomérique ne se fait que par l'action d'agents dénaturants comme l'urée ou le chlorhydrate de guanidine à fortes concentrations (62). Contrairement aux microtubules et aux microfilaments, les filaments intermédiaires sont des structures très stables. Ils ont une vie moyenne plus longue que le cycle cellulaire et ne semblent pas être capables de s'associer et de se dissocier spontanément à l'intérieur du cytoplasme. L'insolubilité associée à la grande stabilité des filaments intermédiaires suggèrent que leur rôle à l'intérieur du cytoplasme doit être plus mécanique et moins dynamique (27).

Les filaments intermédiaires ont été identifiés dans la majorité des cellules étudiées, où ils constituent une classe complexe de polypeptides de poids moléculaires variant de 50000 à 200000 daltons, ayant des propriétés physico-chimiques et immunologiques distinctes. Malgré cette diversité, les filaments intermédiaires de différentes origines présentent une morphologie commune.

Les kératines ou cytokératines représentent une famille très complexe de protéines multigènes immunologiquement semblables, dont les sous-unités acides ou basiques ont des poids moléculaires compris entre 40000 et 70000 daltons. Elles sont exprimées différemment selon le type d'épithélium et son stade de différenciation (27). Les cytokératines sont abondantes à l'intérieur du cytoplasme des cellules épithéliales en culture, où elles sont distribuées selon une orientation radiale dans le cytoplasme, sous forme de faisceaux appelés tonofilaments. Ceux-ci peuvent atteindre la périphérie de la cellule où ils sont connectés à des régions spécialisées de la surface cellulaire, les desmosomes (63). Le traitement prolongé de ces cellules avec des drogues qui dépolymérisent les microtubules, comme la colchicine ou la colcemide ne modifie pas le réseau tridimensionnel des faisceaux de cytokératines (25). La désorganisation du réseau de microfilaments avec les cytochalasines n'altère pas non plus la distribution des cytokératines dans le cytoplasme (64). Par contre, Knapp et col. (65) ont montré que l'action combinée des cytochalasines et de la colchicine sur les cellules HeLa est capable de désorganiser le réseau de cytokératines, ce qui suggère une interaction entre les microtubules et les microfilaments

pour le maintien de l'organisation des cytokératines dans ces cellules.

Les cytokératines de certaines cellules épithéliales sont aussi capables de se réorganiser pendant le processus de division cellulaire, ce qui suggère également une interaction entre les différents éléments du cytosquelette (66). Bien que la fonction de ces filaments dans les cellules épithéliales ne soit pas claire, il est probable qu'ils soient directement impliqués dans la morphologie cellulaire (25).

Plusieurs cellules d'origine mésenchimale contiennent une classe de filaments intermédiaires identifiables biochimiquement et immunologiquement entre eux. Ils sont formés de sous-unités de poids moléculaire entre 55000 et 58000 daltons appelées vimentine. Les filaments de vimentine se distribuent dans le cytoplasme sous forme d'un réseau. La principale caractéristique in vivo de ces filaments est leur réponse au traitement par des drogues qui déstabilisent les microtubules (67), ce qui reflète l'interaction de ces deux systèmes de filaments in vivo. Le traitement prolongé par la colchicine provoque la réorganisation du réseau de filaments de vimentine sous forme d'un "cap" périnucléaire biréfringent. L'organisation initiale est rétablie une fois la drogue éliminée. Les filaments de vimentine des cellules BHK-21 sont capables de s'organiser en deux "caps" périnucléaires pendant le processus de mitose. Le réseau cytoplasmique est rétabli à l'intérieur de chaque cellule fille une fois la division cellulaire accomplie (67).

Franke et col. (68) ont démontré par des techniques d'immunoréplique et d'immunofluorescence indirecte qu'une large variété de cellules en culture d'origine mésenchimale et épithéliale, normales ou transformées, embryonnaires ou provenant d'animaux adultes, expriment la vimentine. Cette protéine coexiste avec le type de filament intermédiaire caractéristique de la cellule originale, à partir de laquelle la culture est dérivée. Dans les cellules en culture la vimentine se distribue aussi sous forme d'un réseau dans le cytoplasme et répond à l'action de drogues antiméitotiques.

Le rôle des filaments de vimentine in vivo n'est pas très clair. Ils participent probablement à la structure cellulaire, comme les cyto-

kératines. Schliwa et Van Blerkom (69) ont observé que l'extraction des microfilaments et des microtubules, avec des tampons de faible et forte force ionique à partir de fibroblastes d'embryon de poulet et de cellules épithéliales en culture de singe (BSC-1), provoquait le détachement des cellules à partir du substrat. Ce résultat suggère que les filaments intermédiaires ne sont pas impliqués dans le processus d'attachement au substrat.

Les filaments intermédiaires des cellules neuronales du système nerveux central et périphérique sont appelés neurofilaments et sont constitués d'un triplet de protéines de poids moléculaires 200000, 150000 et 68000 daltons (27). Les neurofilaments sont les constituants structuraux les plus importants des axones, où ils apparaissent alignés avec les microtubules. Les neurofilaments in vivo et ceux associés in vitro présentent une morphologie différente de celle des autres classes de filaments intermédiaires, puisqu'ils portent de petits appendices qui émergent à leur surface.

Des études biochimiques suggèrent que la sous-unité de 68000 daltons des neurofilaments forme la région centrale de filaments, tandis que les sous-unités de plus haut poids moléculaire sont localisées sur la périphérie et sont capables de former des projections à partir de la surface (38). Ces projections peuvent servir à relier les neurofilaments, entre eux ou avec les microtubules (70).

Dans les cellules d'invertébrés, il existe des évidences en faveur de la présence de protéines qui partagent des déterminants antigéniques avec certains types de protéines des filaments intermédiaires de vertébrés. Falkner et col. (71) ont démontré la présence de deux protéines, de poids moléculaires de 46000 et 40000 daltons respectivement, dans le cytoplasme de cellules Kc isolées des glandes salivaires de Drosophila melanogaster. Ces deux protéines présentent les mêmes déterminants antigéniques que la vimentine et la desmine de fibroblastes d'embryon de cochon d'Inde (BHK). Plus récemment, Harris et Shaw (72) ont mis en évidence par immunofluorescence avec un anticorps monoclonal dirigé contre la desmine d'estomac de porc, la présence de protéines qui présentent les mêmes sites antigéniques que la desmine,

dans les cellules épithéliales de pedicellaires de S. purpuratus. Les neurofilaments ont été isolés aussi à partir d'axones de différentes espèces d'invertébrés (73,74). Ces neurofilaments sont capables de polymériser et dépolymériser in vitro dans les mêmes conditions que les neurofilaments de mammifères. En plus, les neurofilaments d'invertébrés présentent une morphologie semblable à celle des neurofilaments des mammifères in vivo.

Les filaments gliaux correspondent à une quatrième classe de filaments intermédiaires trouvée dans les cellules gliales ou d'origine gliale. Ils sont constitués d'une sous-unité de 51000 daltons immunologiquement différente de celles des neurofilaments (27).

La cinquième classe de filaments intermédiaires, la desmine, typique des cellules musculaires sera présentée dans le chapitre concernant le cytosquelette de ces cellules.

6. LE RESEAU MICROTRABECULAIRE

Le cytosquelette des cellules eucaryotes tel qu'il est conçu aujourd'hui est donc composé au moins de trois catégories de filaments ayant des caractéristiques et des fonctions différentes à l'intérieur de la cellule, mais partageant tous une propriété commune : leur insolubilité dans des détergents non ioniques comme le Triton X-100 (75). Comme la majorité des observations au microscope électronique sur le cytosquelette de cellules sont faites sur la fraction résistance au Triton X-100, l'information sur le vrai réseau tridimensionnel du cytoplasme semble être perdue (69), car ce traitement enlève les organelles intracellulaires.

Les progrès dans cette étude ont commencé vers les années 1970 avec l'utilisation du microscope électronique à haut voltage par les biologistes. Par cette méthode les électrons ont une énergie cinétique suffisante pour pénétrer dans des échantillons épais ou des cellules intactes jusqu'à une profondeur de plusieurs micromètres. L'image résultante est analogue à un cliché de rayons X. La structure interne de

la cellule est ainsi révélée sans qu'il soit nécessaire de la couper en tranches, ce qui est courant pour les méthodes classiques de microscopie électronique. L'avantage principal de cette méthode est de fournir une information en profondeur du matériel examiné, donnant une vue tridimensionnelle de la cellule (76).

Porter et col. (76) ont examiné plusieurs cellules en culture et ont observé un réseau tridimensionnel irrégulier, constitué de filaments fins visibles surtout sur les bords des cellules, en connection avec la membrane plasmique. Ce réseau de filaments fins a été appelé réseau microtrabéculaire par analogie avec la structure trabéculaire de la substance spongieuse de l'os. Les auteurs ont observé que le réseau microtrabéculaire s'étend à l'intérieur du cytoplasme en interconnectant les autres éléments du cytosquelette tels que les microtubules et les microfilaments, ainsi que les organelles intracellulaires. Ces dernières sont littéralement suspendues à l'intérieur du réseau microtrabéculaire et forment une unité structurale et fonctionnelle appelée cytoplaste.

L'existence du réseau microtrabéculaire dans le cytoplasme des cellules in vivo est aujourd'hui un sujet controversé (77). Cependant, plusieurs études de différents auteurs confirment l'existence du réseau microtrabéculaire comme une entité du cytosquelette impliquée dans plusieurs fonctions spécialisées de la cellule.

Wolosewick et Porter (77) ont testé la possibilité que le réseau microtrabéculaire soit un artefact de fixation, en utilisant différents types de cellules en culture, comme les WI-38 (fibroblastes de poumon d'embryon humain), et les fibroblastes d'embryon de poulet. Ces cellules ont été soumises à plusieurs fixateurs chimiques (aldehydes, tétroxyde d'osmium) ainsi qu'à des schémas de fixation par congélation, associés à des méthodes de déshydratation classiques par l'alcool et l'acétone ou bien au processus du "critical-point drying". L'ensemble de leurs observations a montré que le réseau microtrabéculaire n'est pas un artefact de la fixation chimique, puisqu'il a été identifié après les différentes méthodes de fixation chimiques ou non et que dans toutes les conditions de traitement, l'image du réseau tridimensionnel est peu altérée. Ces auteurs ont cependant observé que l'apparence des

trabécules peut varier selon le traitement utilisé. Les trabécules des cellules fixées par congélation apparaissent plus épaisses que celles provenant de cellules traitées au glutaraldéhyde.

Les preuves les plus convaincantes de l'existence du réseau microtrabéculaire dans les cellules proviennent de l'étude des modifications structurales de ce réseau au cours de certaines fonctions cellulaires ou lors de variations de son environnement (78).

La participation du réseau microtrabéculaire au mouvement intracellulaire a été étudié en microscopie électronique à haut voltage sur les chromatophores, les cellules contenant des granules de pigments, situées dans la peau de certains amphibiens et dans les écailles de plusieurs poissons et reptiles. Les granules de pigment se déplacent à l'intérieur du cytoplasme sous contrôle hormonal et nerveux de façon à s'agréger au centre de la cellule, puis se dispersent vers la périphérie, ce qui permet à ces animaux de changer la couleur de leur peau en fonction de l'environnement (76). Le cytosquelette de ces cellules est composé de microtubules polarisés disposés de façon radiale, qui dirigent le mouvement des pigments à partir du centrosome. Les microtubules et les granules de pigments sont suspendus dans un réseau tridimensionnel de filaments de 3-9 nm de diamètre, identifié comme étant le réseau microtrabéculaire (79). L'agrégation des pigments se fait à vitesse constante et est accompagnée d'une déformation du réseau de la cellule. Le réseau devient très compact, la longueur des trabécules diminue de moitié, et celles-ci forment des structures globulaires. La dispersion des pigments est plus lente et se fait grâce à des mouvements discontinus de type saltatoire. Cette dispersion est accompagnée de l'expansion du réseau microtrabéculaire qui se reconstitue. Le processus de dispersion consomme de l'énergie provenant de l'ATP. Cette énergie est stockée sous forme d'énergie potentielle et est libérée au moment de l'agrégation. L'augmentation du niveau intracellulaire de Ca^{++} induit l'agrégation des pigments, tandis que leur dispersion est favorisée par l'absence de Ca^{++} (76). Au cours de ce processus, les microtubules restent immobiles. Cependant, leur fonction est celle de guider le mouvement d'agrégation et de dispersion. L'élimination des microtubules avec des drogues antiméitotiques provoque

des mouvements incohérents des pigments (80).

Le réseau microtrabéculaire a été observé aussi à l'intérieur de l'axoplasme des cellules neuronales par Ellisman et Porter (81), en utilisant le microscope électronique à haut voltage. Ces auteurs ont observé que les microtubules, les microfilaments et plusieurs types d'organelles intracellulaires apparaissent immergés dans un réseau microtrabéculaire où ils sont suspendus par un système de ponts croisés qui émergent de façon périodique à angle droit de la surface des microtubules et des microfilaments. D'après ces observations ils ont suggéré que le réseau microtrabéculaire est engagé dans le mécanisme de transport rapide à l'intérieur de l'axoplasme.

Schliwa et Van Blerkom (69) ont décrit dans le cytoplasme des cellules épithéliales de singe (BSC-1) et dans celui de fibroblastes de poulet en culture, la présence d'un réseau tridimensionnel constitué de microfilaments, microtubules, filaments intermédiaires et filaments de 2-3 nm. Ils ont vérifié également que le réseau microtrabéculaire de ces cellules peut être extrait par des détergents non ioniques et par les tampons de haute force ionique.

D'après ces évidences présentées par différents auteurs dans un nombre à chaque fois plus important de cellules, il serait étonnant que le réseau microtrabéculaire soit un artefact. Le plus probable est que ces auteurs sont en train de mettre en évidence un quatrième système fibrillaire constitutif du cytosquelette des cellules eucaryotes, visiblement très complexe, dont la caractérisation moléculaire et les propriétés physiochimiques offrent une belle perspective d'étude.

Une autre catégorie de filaments fins, qui ne possèdent pas la même organisation que les microtrabécules, a été observée dans différents systèmes biologiques. Linck et col (82) ont isolé, à partir de l'axonème flagellaire de sperme d'oursin, une fraction insoluble dans du sarkosyl 0,5 % et de l'urée 2,5 M, constituée de trois polypeptides de poids moléculaires de 55000, 51000 et 47000 daltons. Cette fraction insoluble dans du sarkosyl/urée est formée de filaments de 2-3 nm de diamètre qui se présentent sous forme de faisceaux. Ces structures ont été appelées

filaments de tektine. L'étude immunocytochimique menée en utilisant l'antisérum produit contre ces trois polypeptides montre qu'ils sont immunologiquement différents de la tubuline. Ils sont localisés le long de l'axonème flagellaire et sont associés longitudinalement aux microtubules.

Des filaments fins ont été identifiés aussi dans des organismes unicellulaires ciliés et associés à la base des axopodes des Heliozoa (83). Le cytoplasme du protozoaire cilié Isotricha prostoma est compartimentalisé par un système fibrillaire qui établit la frontière entre l'exoplasme et l'endoplasme. Ce système est constitué de filaments de 4 nm de diamètre résistants au Triton X-100 1 % et à l'exposition prolongée au KCl 1M. Les filaments fins de ce réseau fibrillaire présentent in situ un aspect globulaire périodique et sont apparemment constitués par plusieurs polypeptides de poids moléculaires entre 11000 et 23000 daltons (83).

7. LE CYTOSQUELETTE DE L'OEUF D'OURSIN

Depuis le début du siècle, les oeufs d'oursin et d'autres invertébrés ont été largement utilisés pour démontrer les propriétés viscoélastiques du cytoplasme (5). A cette époque, plusieurs auteurs ont vérifié que même après des centrifugations prolongées à haute vitesse, les constituants particuliers du cytoplasme des oeufs étaient capables de retourner à leur position d'origine et que la cellule pouvait se diviser normalement par la suite.

Hiramoto (84) a développé une méthode plus sensible capable de mesurer une déformation localisée de la surface de l'oeuf, induite par une particule de fer injectée sous la membrane cellulaire et soumise à un champ magnétique d'intensité connue.

Maruyama et col. (85) ont isolé, à partir du cortex des oeufs d'oursin fertilisés, une protéine élastique insoluble dans du dodecyl sulfate de sodium (SDS) 1 % et dans l'urée 6M, même en présence d'agents réducteurs comme le β -mercaptoéthanol. Cette protéine hautement

insoluble forme des fibres capables de créer une tension mécanique sous "stretching". Sa composition en acides aminés et ses propriétés immunologiques la rapprochent de la connectine, protéine élastique décrite par Maruyama et col. (86) dans les myofibrilles de muscle squelettique de lapin. L'élasticité du cortex de l'oeuf d'oursin a donc été attribuée par Maruyama à la présence de cette protéine élastique qui, selon lui, formerait un réseau à l'intérieur du cortex.

L'actine, un des composants majoritaires du cytosquelette des cellules eucaryotes, est présente sous forme non filamenteuse à l'intérieur du cortex des oeufs d'oursin non fertilisés. La polymérisation et la formation de faisceaux sont induites soit par la fertilisation (87), soit par l'activation parthénogénétique (88).

La tubuline, présente aussi sous forme non polymérisée dans l'oeuf non fécondé, est capable de s'organiser sous forme d'un système sous-cortical de microtubules perpendiculaires à la surface de l'oeuf, entre cinq et quinze minutes après la fécondation (89). Ces microtubules sous-corticaux en polymérisant vers le centre de l'oeuf, provoquant la migration centripète des pronucléi (90).

Coffe et col. (88) ont démontré la présence de filaments de 3-4 nm dans l'oeuf d'oursin activé parthénogénétiquement.

Salmon (91) a démontré que les fibres du fuseau mitotique isolé sont composées principalement de microtubules entourés d'un réseau de filaments fins dont le diamètre est de l'ordre de 4 nm.

L'existence de filaments intermédiaires dans l'oeuf d'oursin est à l'heure actuelle inconnue. Toutefois, ces filaments ont été décrits dans les oeufs de X. laevis (92). Ils sont résistants à l'extraction dans des tampons de haute force ionique en présence de Triton X-100, et sont immunologiquement analogues aux cytokératines d'estomac de boeuf (93). Les cytokératines de l'oeuf de X. laevis sont constituées de polypeptides de poids moléculaires de 56000, 46000 et 42000 daltons. Ces polypeptides sont identifiées aussi dans les embryons, dans la muqueuse intestinale de l'animal adulte et dans ses cellules épithéliales en

culture.

La présence des protéines du type filament intermédiaire a été identifiée aussi dans les oocytes de rat par Lehtonen et col. (94). Des polypeptides de 57000 et de 54000 daltons de ces oocytes présentent une réaction croisée sur filtre de nitrocellulose avec l'anticorps contre les cytokératines de lapin.

8. LE CYTOSQUELETTE DES CELLULES MUSCULAIRES

8.1 Les protéines contractiles

Toutes les cellules produisent des mouvements et les contractions des cellules musculaires ne sont qu'un aspect particulier de la motilité cellulaire.

Les protéines contractiles les plus importantes sont la myosine et l'actine. La myosine est une molécule asymétrique qui a la forme d'un bâtonnet terminé par une tête faite de deux parties globuleuses accolées. La myosine, dont le poids moléculaire est 220000 daltons, comporte quatre chaînes polypeptiques : deux longues et deux courtes. La partie en bâtonnet est constituée de la plus grande partie des chaînes longues, qui, dans cette région, ont une structure secondaire en hélice α et sont de plus spiralées l'une autour de l'autre. Les chaînes courtes sont situées dans la tête où se trouvent également les extrémités non spiralées des chaînes longues. Le poids moléculaire des chaînes courtes est compris entre 16000 et 20000 daltons. La myosine est une ATPase activée par l'actine, qui utilise l'énergie d'hydrolyse de l'ATP dans le processus de contraction musculaire. La molécule d'actine a été décrite au début de ce chapitre.

Les mouvements de contraction et de relaxation musculaires sont rendus possibles grâce à des glissements des deux catégories de myofilaments les uns par rapport aux autres ; au cours de ce processus, les myofilaments ne changent pas de longueur.

L'unité contractile d'une cellule musculaire, la myofibrille est constituée de filaments épais et de filaments fins. Les filaments épais sont composés de molécules de myosine disposées tête-bêche. Les parties en bâtonnet sont accolées les unes aux autres et se recouvrent partiellement ; les têtes restent en saillie et sont disposées selon une hélice dont le pas est de 429 Å, la distance entre les têtes le long du myofilament étant de 143 Å (57). Les filaments fins sont composés de polymères d'actine F, formés de deux brins torsadés en hélice, auxquels sont associées des molécules de tropomyosine disposées bout à bout dans les deux gouttières de la torsade d'actine. Une molécule de tropomyosine est en contact avec sept molécules d'un même brin d'actine.

Le mécanisme de contraction musculaire est basé sur l'interaction de la tête pivotante de la myosine avec les molécules d'actine suivant un cycle : attachement, pivotement, détachement. Au début du cycle, la tête de la myosine contenant les produits de l'hydrolyse de l'ATP (ADP et Pi) pivote passivement et établit un contact avec le filament fin. Dans l'étape suivante l'ADP et le Pi sont libérés provoquant une modification conformationnelle de la tête de la myosine, accompagnée d'un nouveau pivotement qui déplace d'une centaine d'Angströms les filaments fins. La liaison d'une nouvelle molécule d'ATP sur la tête de la myosine provoque la libération des filaments fins et finalement le cycle se complète avec l'hydrolyse de l'ATP et le retour à la conformation originale (95).

Le mécanisme de la contraction musculaire est basé sur les mêmes principes, dans les muscles striés comme dans les muscles lisses, bien que la régulation de ce processus soit différente dans les deux tissus. Le même modèle est valable également pour la contraction médiée par l'actomyosine dans les cellules non musculaires.

8.2 Le muscle lisse

Les unités contractiles des cellules du muscle lisse sont attachées à la membrane plasmique. Dans les cellules relaxées, les éléments contractiles sont parallèles au grand axe de la cellule. Toutefois, pendant la contraction ils deviennent progressivement obliques, jusqu'à

atteindre des angles de 25° à 45° par rapport à l'axe cellulaire (96,97).

Les points d'attachement des unités contractiles à la membrane plasmique sont constitués de plaques denses. Cependant, les éléments contractiles sont attachés également à des structures opaques aux électrons, les corpuscules denses, dispersés dans le cytoplasme (44).

Geiger et col. (44) ont démontré la présence de différentes protéines associées aux points d'ancrage des filaments fins sur la membrane plasmique et sur les corpuscules denses du cytoplasme. Ils ont utilisé des techniques immunocytochimiques de double marquage au microscope électronique. Leurs résultats montrent la présence de vinculine exclusivement au niveau des plaques denses de la membrane plasmique, tandis que l' α -actinine se trouve soit au niveau des plaques denses, soit associée aux corpuscules denses dispersés dans le cytoplasme. Ceci confirme les résultats de Schollmeyer et col. (98). Ces résultats montrent que les corpuscules denses et les plaques denses présentent une composition moléculaire différente, malgré l'identité de leur fonction d'association avec les filaments d'actine.

Les filaments de 10 nm ont été identifiés dans toutes les cellules musculaires de vertébrés étudiées. Uehara et col. (99) ont identifié, par microscopie électronique, sur le tissu entier, la présence de filaments de 10 nm de diamètre distribués sous forme d'un réseau à l'intérieur du cytoplasme des cellules de muscles lisses de plusieurs vertébrés. Small et Sobieszek (100) ont identifié un réseau de filaments de 10 nm dans les cellules musculaires d'intestin grêle de cochon d'Inde extraites dans des tampons de faible et forte force ionique. Ils ont observé également que ces filaments ne participent pas au processus de contraction musculaire, puisque les cellules auxquelles les filaments de 10 nm ont été enlevés par traitement enzymatique à la collagenase, gardent leur capacité de se contracter en réponse à l'ATP. Ils proposent que les filaments de 10 nm jouent un rôle structural à l'intérieur de ces cellules.

Les sous-unités des filaments intermédiaires des cellules musculaires

ont des propriétés biochimiques et immunologiques caractéristiques. La desmine est le composant majoritaire des filaments intermédiaires des muscles lisses et striés (24). Toutefois, certaines cellules musculaires lisses en culture de tissu vasculaire de rat peuvent exprimer aussi la vimentine (101).

Dans les muscles lisses des vertébrés, il existe des évidences que les filaments de 10 nm sont associés aux corpuscules denses dispersés dans le cytoplasme (100) et sont ancrés également sur les plaques denses de la membrane plasmique (102). Néanmoins les filaments de 10 nm n'ont pas été trouvés dans les muscles lisses des invertébrés. En particulier, ces structures n'ont pas été immunologiquement identifiées ni dans le muscle lisse des pédicellaires de S. purpuratus ni dans l'oesophage des larves pluteus de D. exentricus (72).

8.3 Le muscle strié

Dans les muscles squelettiques et cardiaques des vertébrés, les filaments intermédiaires sont associés aux lignes Z (103, 104, 105) d'où ils partent sous forme de réseaux transversaux et longitudinaux. Ils interconnectent latéralement les lignes Z des sarcomères adjacents et longitudinalement les lignes Z d'un même sarcomère. Dans le muscle squelettique de poulet, la vimentine et la desmine participent à l'association des lignes Z pendant la myogenèse in vitro. Dans le muscle de l'animal adulte l'expression de la vimentine varie selon l'origine du tissu (106).

Des protéines élastiques de poids moléculaires très élevés ($\sim 10^6$ daltons), appelées connectine (107) ou titine (108) ont été identifiées à partir du muscle squelettique de lapin (109) et du muscle pectoral de poulet (110). Toyoda et Maruyama (111) ont démontré par microscopie électronique que la connectine est constituée de filaments fins de 2 nm de diamètre, formant un réseau entre les lignes Z du muscle squelettique de grenouille. Ce réseau est visible après l'extraction de l'actomyosine dans une solution contenant du KI 0,6 M. Ces résultats ont été confirmés par Sawada et col. (110) à partir de muscles squelettiques de poulet et

de lapin.

La connectine est constituée de deux sous-unités ayant des poids moléculaires de $2,1 \times 10^6$ et $2,8 \times 10^6$ daltons respectivement, déterminés par électrophorèse en présence de SDS (107). La fonction de ces protéines élastiques à l'intérieur des cellules n'est pas encore bien connue, toutefois, il est possible qu'elles soient responsables de l'élasticité passive des muscles striés des vertébrés (107).

Jusqu'à présent les filaments élastiques n'ont pas été identifiés dans des cellules de muscle lisse.

CHAPITRE II

MATERIELS ET METHODES

1. DOSAGE DES PROTEINES
2. ANALYSE DES PROTEINES PAR ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE EN MILIEU DENATURANT (SDS-PAGE)
3. TECHNIQUES DE FOCALISATION ISOELECTRIQUE
 - 3.1 Focalisation isoélectrique à l'équilibre (IEF)
 - 3.2 Focalisation isoélectrique dans des conditions de non-équilibre (NEPHGE)
4. OBTENTION DU MATERIEL BIOLOGIQUE
 - 4.1 Les animaux
 - 4.2 Tissus et cellules
 - 4.3 Préparation de la cytomatrice résistante au traitement hexylène glycol-Triton X-100 à partir de l'oeuf d'oursin
 - 4.4 Elimination des cellules épithéliales et préparation des tissus riches en cellules de muscle lisse
 - 4.5 Fractionnement des protéines contractiles à faible et haute force ionique
 - 4.5.A Cellules de muscle lisse de rat
 - 4.5.B Cellules de muscle lisse d'oursin
 - 4.6 Fractionnement des protéines directement à haute force ionique, à partir des cellules de muscle lisse d'oursin, d'holothurie et de rat

- 4.7 Fractionnement de la cytomatrice résistante à l'hexylène glycol-Triton X-100 à partir de l'oeuf d'oursin
5. ISOLEMENT DES PROTEINES PAR ELECTROPHORESE PREPARATIVE
6. ESSAI DE POLYMERISATION IN VITRO DES PROTEINES ISOLEES PAR ELECTROPHORESE PREPARATIVE
7. TECHNIQUES IMMUNOCYTOCHIMIQUES
 - 7.1 Préparation de l'antisérum contre la protéine de 54000-55000 daltons du muscle lisse d'oursin
 - 7.2 Détermination de la spécificité de l'anticorps
 - 7.2.A Electrotransfert
 - 7.2.B Transfert par diffusion
 - 7.2.C Réaction immunologique
 - 7.3 Immunofluorescence
 - 7.3.A Préparation des échantillons
 - 7.3.B Procédé expérimental d'immunofluorescence
 - 7.4 Immunocytochimie à l'or colloïdal
8. IDENTIFICATION DES FILAMENTS D'ACTINE PAR LA CHAINE LOURDE DE LA MEROMYOSINE (HMM)
9. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE
 - 9.1 Tissus musculaires
 - 9.2 Cytomatrices des oeufs non fécondés

1. DOSAGE DES PROTEINES

Les dosages de protéines ont été faits par la méthode classique de Lowry et col. (112) quand les échantillons étaient dissous dans du SDS 1%. Le dosage par la méthode de Geiger et col. (113) utilisant le peroxyde d'hydrogène pour oxyder les groupements SH a été employé quand les échantillons étaient dissous en SDS 1% ; β -mercaptoéthanol 5%. Dans les deux cas, les lectures ont été faites sur un spectrophotomètre VARIAN-TECHTRON model 635 à des longueurs d'onde de 660 et de 540 nm, respectivement.

2. ANALYSE DES PROTEINES PAR ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE EN MILIEU DENATURANT (SDS-PAGE)

L'analyse des protéines par électrophorèse monodimensionnelle a été faite sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE), selon le système discontinu de pH de Laemmli (114).

Les échantillons protéiques, dissouts dans du SDS ; β -mercaptoéthanol, ont été dilués à une concentration finale de l'ordre de 2 mg/ml dans le tampon TRIS-HCl 0,0625 M, pH 6.8 ; glycérol 10 % ; SDS 3% et β -mercaptoéthanol 5%. Aux échantillons dont la concentration ne dépassait pas 3 mg/ml, il a été ajouté 20 % (V/V) d'un mélange contenant : deux volumes de glycérol ; un volume de β -mercaptoéthanol ; trois volumes de SDS à 10 %. Avant d'être déposés, les échantillons ont été immergés pendant trois minutes dans un bain-marie bouillant.

Les gels de polyacrylamide étaient soit homogènes à une concentration de 10 % en acrylamide, soit en gradient de concentration d'acrylamide entre 5 et 20 %.

Pour des plaques de 160 x 190 x 1 mm, la migration électrophorétique a été faite dans un temps de l'ordre de 18 heures sous 10 mA et un voltage maximal de 60 volts. Pour des plaques de 160 x 140 x 1 mm, la migration électrophorétique a duré 7 heures sous 15 mA et un voltage maximal de 150 V.

Les électrophorèses préparatives ont été faites sur des plaques de 160 x 190 mm avec des épaisseurs de 3 ou 6 mm, en gel homogène à 10 % d'acrylamide, sous un courant de 12 mA et 25 mA respectivement et un voltage maximal de 100 volts par plaque. La source de courant a été dans tous les cas une alimentation DESAGA DESATRONIC 2000/300, Heidelberg.

Les étalons de poids moléculaires utilisés ont été ceux d'un KIT de calibration Pharmacia pour des sous-unités protéïques entre 14400 et 94000 daltons, ainsi que de la tubuline de cerveaux de porc, de la myosine de muscle squelettique de lapin et de la β -galactosidase, à des concentrations de 2 mg/ml.

La coloration des gels d'électrophorèse a été faite soit par le nitrate d'argent selon Merril et col. (115), soit par le bleu de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R. SIGMA), à 0,1 % en méthanol 50 % ; acide acétique 10 % , pendant 30 minutes, sous agitation. La décoloration a été faite par plusieurs bains de méthanol 50 %, acide acétique 10 %, jusqu'à ce que le fond du gel ait été complètement décoloré. Les gels ont été conservés dans de l'acide acétique à 7% et séchés sous vide dans un GEL SLAB DRYER, Model 224, BIO-RAD Laboratories.

3. TECHNIQUES DE FOCALISATION ISOELECTRIQUE

3.1 Focalisation isoélectrique à l'équilibre (IEF)

Cette méthode a été faite selon le procédé de O'Farrell (116). Les gels de focalisation isoélectrique ont été préparés dans des tubes de 130 mm de longueur et 3 mm de diamètre interne. Le gradient final de pH de l'ordre de 4,5 à 7,8 a été obtenu grâce au mélange d'ampholines (LKB) de pH 5 à 7 et de 3,5 à 10. Ce gradient s'est formé sous un voltage de 400 volts pendant 16 heures dans des tubes adaptés au système BIO-RAD model 155, GEL ELECTROPHORESIS CELL, (BIO-RAD Laboratories).

La deuxième dimension a été faite en SDS-PAGE à une concentration de 10% en acrylamide, sur des plaques de 160 x 190 x 1 mm.

Les gels d'IEF ont été retirés des tubes et déposés directement en deuxième dimension sans équilibration préalable dans le tampon d'électrophorèse. La coloration des gels de polyacrylamide a été faite dans du bleu de Coomassie 0,3 % ; méthanol 50 % ; acide acétique 10 %, pendant 1 heure sous agitation. La décoloration a été faite par plusieurs bains dans un mélange de méthanol 50 % et acide acétique 10 %. Certains gels ont été colorés par le nitrate d'argent (115).

3.2 Focalisation isoélectrique dans des conditions de non équilibre (NEPHGE)

Les protéines ayant un point isoélectrique en dehors de la gamme de détection de l'IEF, ont été soumises à la technique de focalisation isoélectrique en condition de non équilibre (NEPHGE), selon O'Farrell et col. (117) pour les protéines acides et basiques. Dans cette méthode, la gamme finale de pH se situe entre 4,5 et 9,5, la migration se faisant vers le pH alcalin sous un courant de 400 volts pendant 2 à 4 heures.

Pour la deuxième dimension, nous avons procédé comme décrit dans la section 3.1 pour l'IEF.

4. OBTENTION DU MATERIEL BIOLOGIQUE

4.1 Les animaux

Les animaux marins : oursins (Paracentrotus lividus, Sphaerechinus granularis) et hotothuries (Holothuria tubulosa) nous ont été fournis par le Laboratoire Arago (Banyuls-sur-Mer).

Les rats (Wistar) âgés de 30 jours ont été fournis par l'élevage Janvier.

4.2 Tissus et cellules

Les oeufs de Paracentrotus lividus ont été obtenus débarrassés de leur gangue selon le procédé décrit par Coffe et col. (118). Ces oeufs peuvent être utilisés immédiatement ou stockés pendant plusieurs mois à -30°C dans un milieu contenant du glycérol 50 % ; EGTA 2.5 mM ; Azide de Na 0.5 mM ; Benzamidine 1mM ; 2.5 $\mu\text{g/ml}$ de chacun des quatre inhibiteurs de protéases : chymostatine, pepstatine, leupeptine et antipaïne (SIGMA).

Les intestins de l'oursin et de l'holothurie, après dissection, ont été recueillis dans de l'eau de mer sans Ca^{++} à 4°C , contenant de l'EGTA 1mM. Plusieurs lavages rapides ont été faits dans ce milieu pour enlever le contenu intestinal. Dans le cas de l'holothurie, l'intestin a été coupé longitudinalement avec des ciseaux et le côté interne a été gratté avec une spatule pour enlever une partie des cellules épithéliales.

L'intestin grêle de rat, recueilli immédiatement après le sacrifice de l'animal, a été déposé sur une boîte de Petri qui était posée sur la glace. Ensuite, l'intestin a été rapidement débarrassé du tissu adipeux, coupé en morceaux de 20 cm de longueur, nettoyé à l'aide d'une canule, puis ouvert longitudinalement et gratté avec une spatule.

4.3 Préparation de la cytomatrice résistante au traitement

hexylène glycol-Triton X-100, à partir de l'oeuf d'oursin

Après plusieurs lavages dans l'eau de mer synthétique sans Ca^{++} (NaCl 451 mM ; KCl 10,11 mM ; MgCl_2 29,84 mM ; Mg SO_4 17,14 mM ; TRIS-HCl 40,1 mM pH 8.2) et contenant de l'EGTA 1mM, les oeufs ont été sédimentés par un pulse de 1200 rpm sur une centrifugeuse JANETZKY T 32 D, puis resuspendus à 4°C dans 10 volumes du milieu de lyse décrit par Coffe et col. (118) : hexylène glycol 1M ; EGTA 5mM ; MgCl_2 1mM ; KH_2PO_4 10 mM, pH 6.4 contenant du Triton X-100 1% et 10 $\mu\text{g/ml}$ du mélange des inhibiteurs de protéases. Les cytomatrices ont été récupérées par pulses de 1000 rpm.

Dans le cas des oeufs fécondés, la membrane de fécondation a été enlevée par addition de l'eau de mer sans Ca^{++} , contenant: DTT 1 mM; pronase 1 mg%; EGTA 10 mM, pH 8.9 . La suspension d'oeufs a été resuspendue (à une dilution finale de 2%) dans ce milieu 60 secondes après fertilisation et maintenue sous agitation pendant 2 minutes. Ensuite, la suspension d'oeufs a été lavée avec 10 volumes d'eau de mer sans Ca^{++} et sédimentée par pulses de 1200 rpm. Après trois lavages dans ces mêmes conditions, les oeufs ont été incubés à 19°C dans de l'eau de mer sans Ca^{++} . A différents temps du développement, les oeufs ont été sédimentés par un pulse de 1200 rpm, puis resuspendus dans 10 volumes du milieu de lyse contenant de l'hexilène glycol/Triton X-100 et le mélange d'inhibiteurs de protéases. Les cytomatrices ont été récupérées par des pulses de 1000 rpm.

4.4 Elimination des cellules épithéliales et préparation des tissus riches en cellules perméabilisées de muscle lisse

Les tissus débarrassés des résidus digestifs ont été traités à 4°C par une solution de Hank's modifiée par Small (96), appelée solution I (NaCl 137 mM ; KCl 5mM ; Na_2HPO_4 1,1 mM ; KH_2PO_4 0,4 mM ; NaHCO_3 4mM ; glucose 5,5 mM ; PIPES 5mM, pH 6.0) contenant du Triton X-100 0,05 %. Plusieurs lavages ont été faits dans dix volumes de cette solution, jusqu'à ce que le tissu musculaire ne contienne que très peu de cellules épithéliales. Le tissu a été ensuite transféré dans la solution II (96) (NaCl 137 mM ; KCl 5mM ; NaHCO_3 4mM ; glucose 5,5 mM ; PIPES 10 mM, pH 6.5) en présence de concentrations croissantes de Triton X-100 (0,2 % ; 0,5 % et 1%). Pour empêcher la contamination bactérienne et limiter l'action des enzymes protéolytiques très actives, les solutions I et II contenaient : azide de Na 2mM ; benzamidine 1mM ; DTT 0,5 mM ; inhibiteur de Trypsine du soja (SIGMA) 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$; mélange d'inhibiteurs de protéases 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Chaque lavage a été fait avec dix volumes de solution et le tissu récupéré par décantation. Ces lavages ont été arrêtés dès que les cellules musculaires collées sur le tissu connectif devenaient visibles au microscope optique. A cette étape, le tissu a été centrifugé à 750 g pendant dix minutes. Les tissus ainsi traités ont constitué le matériel de départ utilisé pour toutes les manipulations

biochimiques et immunocytochimiques.

A partir d'une centaine d'oursins nous avons obtenu en moyenne 10 ml de tissu enrichi en cellules de muscle lisse perméabilisé. Une centaine d'holothuries a donné en moyenne 254 ml de tissu et la même quantité de rats a donné 50 ml.

4.5 Fractionnement de protéines contractiles à faible et haute force ionique

Les muscles lisses d'intestin de rat et d'oursin ont été extraits selon la méthode décrite par Sobieszek et Small (119). Toutes les étapes ont été menées à 4°C.

4.5.A Muscle lisse de rat

Le muscle lisse de l'intestin de rat a été obtenu comme décrit dans la section 4.4. Le tissu enrichi en cellules musculaires a été traité par trois volumes d'une solution d'extraction de l'actomyosine décrite par Sobieszek et Small (119), appelée LAMES, contenant: KCl 60 mM ; ATP 10 mM ; EDTA 1mM ; EGTA 2mM ; Imidazole 40 mM, pH 7.1. Nous avons ajouté à cette solution 1mM de PMSF, 0,5 mM de DTT, 2mM d'azide de Na, 1mM de benzamidine et 10 µg/ml du mélange d'inhibiteurs de protéases.

Le tissu en suspension dans ce milieu a été broyé à l'aide d'un homogénéiseur ULTRA-TURRAX (JANKE-KUNKEL, IKA-WERK) pendant 30 secondes, puis immédiatement centrifugé à 20000 g pendant 30 minutes dans une centrifugeuse SORVALL RC 2-B avec un rotor SS-34.

Le culot a été réextrait dans les mêmes conditions. Le temps total d'incubation du tissu en présence de LAMES n'a pas dépassé 5 à 6 minutes pour chaque extraction.

Aux surnageants, après filtration sur coton de verre, il a été ajouté, sous agitation, une solution de $MgCl_2$ 1M jusqu'à faire 30 mM

final. Après une nuit à 4°C, le précipité formé a été centrifugé pendant 30 minutes à 20000 g, lavé deux fois avec de l'eau distillée contenant: EGTA 2mM; azide 2mM ; benzamidine 1mM ; PMSF 1mM et 10 µg/ml du mélange des inhibiteurs de protéases. Après lavage à l'acétone, le précipité a été dissout dans du SDS 1 % ; β-mercaptoéthanol 5 %, bouillant.

Au surnageant du traitement par le MgCl₂ 30 mM, il a été additionné du (NH₄)₂ SO₄ 2,3 M final, sous agitation à 4°C. Le précipité ainsi formé a été récupéré par centrifugation à 2 000 g, lavé avec de l'eau contenant les inhibiteurs décrits ci-dessus, lavé dans l'acétone et dissout dans du SDS 1 % ; β-mercaptoéthanol 5 %, bouillant.

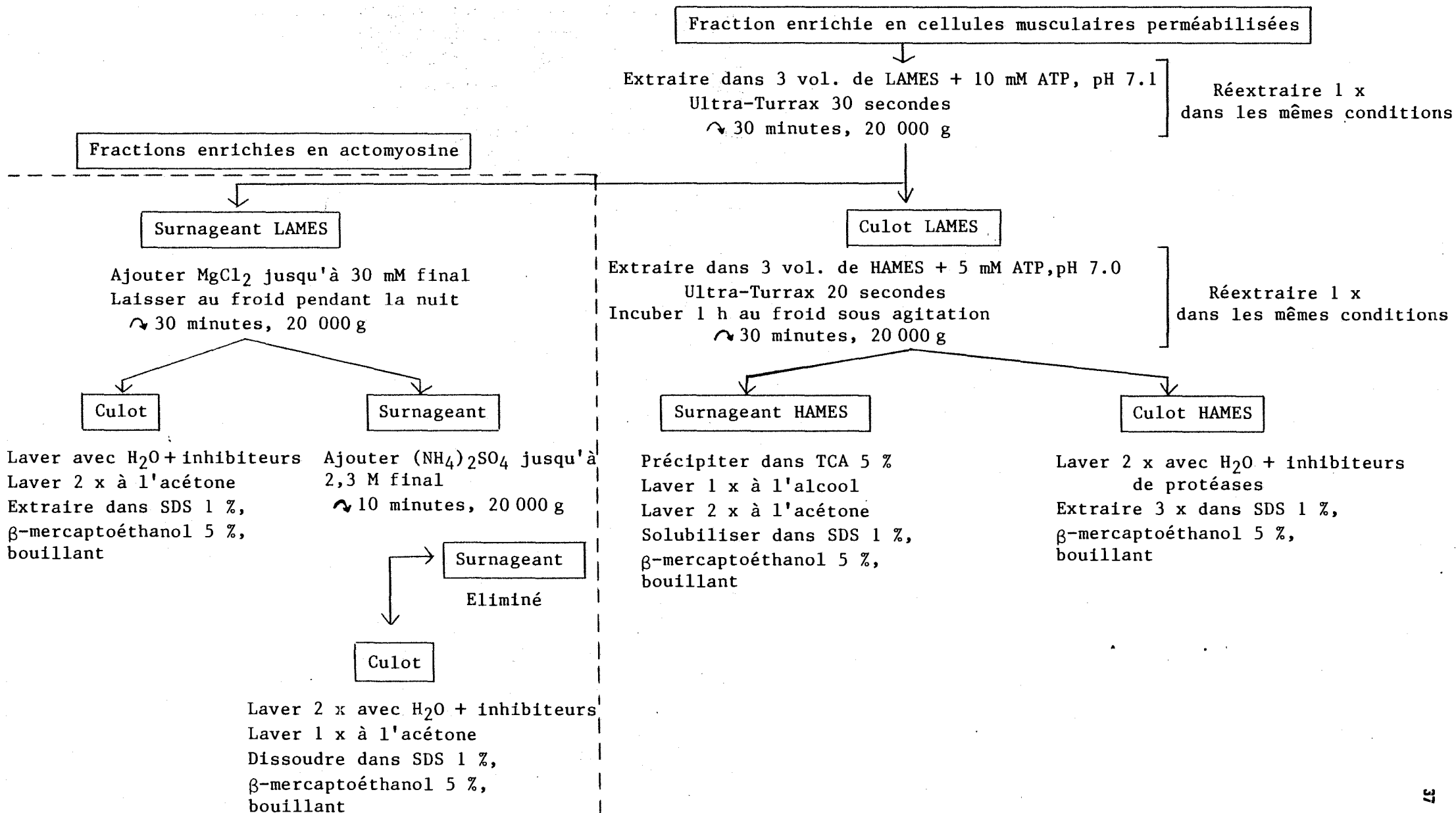
Le résidu des deux extractions dans le LAMES a été ensuite extrait à haute force ionique, comme décrit par Small et Sobieszek (100), dans un milieu contenant: KCl 600 mM ; imidazole 40 mM, pH 7.1 ; EDTA 1mM ; ATP 5mM, appelé HAMES par ces auteurs. A cette solution nous avons ajouté azide de Na 2mM ; benzamidine 1mM ; DTT 0.5 mM ; PMSF 1mM et 10 µg/ml du mélange d'inhibiteurs de protéases.

Deux extractions ont été faites avec trois volumes de HAMES. Pour la première extraction, le tissu a été broyé à l'aide de l'ULTRA-TURRAX pendant 20 secondes, puis incubé une heure sous agitation et centrifugé 30 minutes à 20000 g. Chaque surnageant a été précipité par le TCA 5%, lavé à l'alcool, à l'acétone et dissout dans du SDS 1% ; β-mercaptoéthanol 5 %, bouillant. Les culots des deux extractions ont été réunis et lavés rapidement avec 20 volumes d'eau distillée contenant les inhibiteurs décrits ci-dessus. Après centrifugation, le culot a été extrait dans du SDS 1% ; β-mercaptoéthanol, bouillant. L'ensemble de cette procédure est représentée sur le schéma n°1.

4.5.B Muscle lisse d'oursin

Pour le fractionnement des protéines du muscle lisse d'intestin d'oursin à faible et haute force ionique, nous sommes partis du tissu enrichi en cellules musculaires obtenu comme décrit dans la section 4.4, soit préparé fraîchement, soit conservé à -30°C dans 50 % glycérol ;

EXTRACTION DE L'ACTOMYOSINE A PARTIR DU MUSCLE DE L'INTESTIN DE RAT



50 % solution II contenant Triton X-100 à 0,2 % final et 10 µg/ml du mélange d'inhibiteurs de protéases.

Les protéines des cellules musculaires ont été extraites avec cinq volumes de LAMES, par broyage à l'aide de l'ULTRA-TURRAX pendant 30 secondes et centrifugées immédiatement après, à 20000 g, pendant 30 minutes. Le culot résultant de cette centrifugation a subi ensuite trois extractions dans du HAMES, suivies de centrifugations à 20000 g, comme décrit pour les cellules musculaires de rat. Les surnageants ont été réunis, filtrés sur du coton de verre et centrifugés pendant trois heures à 100 000 g dans une ultracentrifugeuse BECKMAN L5-75B avec un rotor 70 Ti. Le surnageant à 100000 g a été précipité par le TCA 5 %, lavé à l'alcool, à l'acétone et dissout dans du SDS 1 % ; β -mercaptoéthanol 5 %, bouillant. Le culot 100000 g a été lavé avec 20 volumes d'eau distillée contenant les inhibiteurs décrits et ensuite dissout dans du SDS 1 % ; β -mercaptoéthanol, bouillant.

La fraction soluble dans du LAMES, après centrifugation à 20000 g, a été ensuite recentrifugée pendant trois heures à 100000 g. Sur le surnageant, nous avons additionné, sous agitation, une solution de $MgCl_2$ 1M jusqu'à la concentration finale de 25 mM. Dans ces conditions, il n'y a pas eu la formation de précipité. La précipitation n'a été induite que par l'addition de $(NH_4)_2 SO_4$ 2,3 M final. Le matériel insoluble a été sédimenté par centrifugation pendant 15 minutes à 20000 g. Le culot ainsi obtenu a été resuspendu dans du HAMES et dialysé pendant la nuit contre 100 ml de cette solution. Après seize heures de dialyse, le matériel a été centrifugé à 100000 g pendant trois heures. Le culot a été lavé à 4°C avec de l'eau distillée contenant les inhibiteurs de protéases, puis repris dans du SDS ; β -mercaptoéthanol, bouillant. Le surnageant de dialyse a été précipité par du TCA 5 %, lavé à l'alcool, puis à l'acétone et repris dans du SDS ; β -mercaptoéthanol.

Cette procédure est représentée sur le schéma n°2.

EXTRACTION DE L'ACTOMYOSINE A PARTIR DU MUSCLE DE L'INTESTIN D'OURSIN

Fraction enrichie en cellules musculaires perméabilisées : 50 % Solution II + 0,2 % Triton X-100
et conservées dans : 50 % Glycérol

Laver avec 9 vol. de Sol. II + 0,2 % Triton
↻ 2000 rpm, 15 minutes

Surnageant → Eliminé

Culot

Extraire 5 vol. de LAMES + 10 mM ATP, pH 7.1
Ultra-Turrax 30 secondes
↻ 30 minutes, 20 000 g

Surnageant

Filtré
Coton de verre

Fractions enrichies en actomyosine

Surnageant

Ajouter $MgCl_2$ 25 mM final
Incuber 40 minutes à 0°C
Ajouter $(NH_4)_2SO_4$, 2,4 M final
↻ 15 minutes à 20 000 g

Culot

Reprendre dans HAMES

Dialyser 16 h
contre HAMES

↻ 100 000 g, 3 h

Surnageant

Culot

Précipiter au TCA 5 %
Laver 1 x à l'alcool
Laver 2 x à l'acétone
Dissoudre dans SDS 1 %, β -mercaptoéthanol 5 %, bouillant

Laver dans H_2O + inhibiteurs
Extrait dans SDS 1 %, β -mercaptoéthanol 5 %, bouillant

Réextraire 3 x
dans les mêmes conditions

Extraire dans 3 vol. HAMES + 5 mM ATP, pH 7.0
Ultra-Turrax 30 secondes
Incuber 15 minutes, 0°C
↻ 30 minutes, 20 000 g

Surnageant

Culot

Filtrer coton de verre
↻ 100 000 g, 3 h

Surnageant

Culot

Précipiter au TCA 5 %
Laver 1 x à l'alcool
Laver 2 x à l'acétone
Dissoudre dans SDS 1 %, β -mercaptoéthanol 5 %, bouillant

Laver à H_2O + inhibiteurs
Extraire dans SDS 1 %, β -mercaptoéthanol 5 %, bouillant

4.6 Fractionnement des protéines directement à haute force ionique à partir des cellules de muscle lisse d'oursin, d'holothurie et de rat

Les tissus enrichis en cellules musculaires perméabilisées ont été préparés comme décrit dans la section 4.4.

Les protéines ont été extraites dans cinq volumes de solution KCl 1M (KCl 1M ; EDTA 1mM ; EGTA 1mM ; Imidazole 40 mM, pH 7.2-7.5, β -mercaptoéthanol 5mM), contenant : azide de Na 2mM ; benzamidine 1mM ; PMSF 1mM et 10 μ g/ml du mélange des inhibiteurs de protéases SIGMA. La suspension a été homogénéisée pendant 30 secondes à l'aide de l'ULTRA-TURRAX, puis incubée pendant 30 minutes, sous agitation, dans la même solution. Le matériel insoluble a été sédimenté par centrifugation à 20000 g pendant 30 minutes, resuspendu et incubé dans la même solution à 4°C pendant 30 minutes, puis recentrifugé à la même vitesse. Le culot a été lavé avec vingt volumes d'eau distillée à 4°C, contenant les inhibiteurs de protéases, puis extrait dans du SDS 1 % ; β -mercaptoéthanol 5 %, bouillant.

Les surnageants des centrifugations à 20000 g ont été réunis et sédimentés à 100000 g pendant deux heures et demie. Le culot a été lavé avec vingt volumes d'eau contenant les inhibiteurs et ensuite solubilisé dans du SDS 1 % ; β -mercaptoéthanol 5 %, bouillant. L'extrait SDS ; mercaptoéthanol peut être conservé à -30°C pendant plusieurs mois.

Dans le cas de l'intestin d'oursin, l'extrait SDS ; mercaptoéthanol présentait une coloration marron foncé.

4.7 Fractionnement de la structure cytoplasmique résistante à l'hexylène glycol-Triton X-100, à partir de l'oeuf d'oursin

L'obtention de la structure cytoplasmique résistante à l'hexylène glycol-Triton X-100 a été décrite dans la section 4.3.

Les protéines solubles ont été extraites directement dans la solution

KCl 1M, comme décrit dans la section 4.6, excepté le fait que la suspension d'oeufs a été homogénéisée pendant 30 secondes à l'aide du VORTEX. L'extrait SDS; β -mercaptoéthanol a été conservé à -30°C pendant plusieurs mois.

La procédure générale d'obtention des fractions insolubles dans du KCl 1M est représentée sur le schéma n°3.

5. ISOLEMENT DES PROTEINES PAR ELECTROPHORESE PREPARATIVE

Les extraits SDS ; β -mercaptoéthanol, obtenus à partir des fractions insolubles à haute force ionique, ont été dilués dans le tampon TRIS-HCl 0,0625 M pH 6.8 ; glycérol 10 % ; SDS 3 % ; β -mercaptoéthanol 5 % et soumis à l'électrophorèse préparative sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE).

Après coloration rapide par bleu de Coomassie 0,1 % ; méthanol 50 % ; acide acétique 10 %, le gel a été rapidement lavé à l'eau froide pour éliminer l'excès de colorant. La bande désirée a été découpée du gel à l'aide d'un scalpel. La bande de gel ainsi séparée a été coupée en morceaux de 20 mm, qui ont été ensuite extraits par 10 volumes de solution d'urée 7M décrite par Huiatt et col. (120) : urée 7M ; TRIS-HCl 10 mM, pH 8.0 ; EGTA 1mM ; β -mercaptoéthanol 0.1 %, contenant les inhibiteurs des protéases. L'extrait a été ensuite broyé à l'aide de l'ULTRA-TURRAX, pendant 30 secondes, puis incubé à 0°C pendant une heure. Cette extraction a été répétée encore deux fois avec le même volume de solution d'urée. Le broyat a été ensuite déposé sur une toile de Nitex de 35 μm de maille, adaptée sur le bord d'un tube SORVALL de 50 ml, puis centrifugé à 2 500 rpm pendant 15 minutes.

Les extraits ont été réunis, centrifugés à 20000 g pendant 30 minutes et filtrés à travers un filtre en fibre de verre, GF/F, 0,7 μm WHATMAN, adapté à une MICRO-SYRINGE HOLDER (MILLIPORE). La filtration élimine les particules de gel ayant traversé la toile de Nitex. L'extrait filtré a été ensuite dialysé à 4°C pendant la nuit contre 1 litre de tampon TRIS-HCl 10 mM, pH 8.0 ; EGTA 1mM ; β -mercaptoéthanol 10 mM ; azide de

Schéma N°3

OBTENTION DES FRACTIONS INSOLUBLES A HAUTE FORCE IONIQUE
A PARTIR DES CELLULES PERMEABILISEES AU DETERGENT

Matériel résistant au traitement par le détergent

↓ Extraire dans KCl 1 M, pH 7.2-7.5
5-10 volumes

Homogénéiser au Vortex (oeuf) ou à l'Ultra-Turrax (intestin)
Incuber pendant 30 minutes à 0°C
↻ 20 000 g, 30 minutes

Surnageant

Culot

↓ Extraire dans KCl 1 M, pH 7.2-7.5
5-10 volumes

Homogénéiser au Vortex (oeuf) ou
à l'Ultra-Turrax (intestin)
Incuber pendant 30 minutes à 0°C
↻ 20 000 g, 30 minutes

Surnageant

Culot

↓ Extraire dans KCl 1 M, pH 7.2-7.5
5-10 volumes

Incuber pendant 30 minutes à 0°C
↻ 20 000 g, 30 minutes

Surnageant

Culot

Laver à H₂O + inhibiteurs
Extraire dans SDS 1 %, β-mercaptoéthanol 5 %,
bouillant

100 000 g
2 h 30

Culot

Laver à H₂O + inhibiteurs
Extraire dans SDS 1 %, β-mercaptoéthanol 5 %,
bouillant

Na 2mM ; benzamidine 1mM et PMSF 1mM.

Le dialysat a été concentré contre du polyéthylèneglycol 20000 (SIGMA) jusqu'à atteindre un volume de 1 à 2 ml. A partir de cet extrait concentré, la protéine a été précipitée à 4°C avec huit volumes d'acétone distillée, puis sédimentée par centrifugation à 5000 rpm. Le culot a été dissout dans du SDS 1 % ; β -mercaptoéthanol 5 %. Dans cette condition, la protéine peut être conservée à -30°C pendant plusieurs semaines.

6. ESSAIS DE POLYMERISATION in vitro DES PROTEINES ISOLEES PAR ELECTROPHORESE PREPARATIVE

1^{er} cycle :

Les protéines isolées par électrophorèse préparative, puis dissoutes dans du SDS ; β -mercaptoéthanol, comme décrit dans la section 5, ont été précipitées à 4°C avec 8 volumes d'acétone distillée. Ces protéines ont été ensuite reprises dans la solution d'urée 7M contenant les inhibiteurs de protéases dans un volume tel que la concentration protéique soit comprise entre 300 et 800 μ g/ml. Cette solution a été dialysée à 4°C pendant la nuit, soit contre le tampon : KCl 15 mM ; TRIS-HCl 5mM, pH 7.5 ; β -mercaptoéthanol 10 mM, décrit par Aebi et col. (41), contenant: azide de Na 2mM ; benzamidine 1mM et PMSF 1mM, soit contre le tampon NaCl 150 mM ; imidazole 10 mM, pH 7.0, décrit par Huiatt et col. (120), contenant les mêmes inhibiteurs de protéases. Après dialyse le matériel a été centrifugé pendant une heure à 100 000 g dans une AIRFUGE AIR-DRIVEN Ultracentrifugeuse (BECKMAN).

2^{ème} cycle :

Le culot de centrifugation a été repris dans la solution d'urée 7M et dialysé pendant la nuit à 4°C, soit contre le tampon contenant du NaCl 150 mM à pH 7.0 décrit dans le 1^{er} cycle, soit contre TRIS-HCl 10 mM,

pH 8.0 ; β -mercaptoéthanol 10 mM ; azide de Na 2mM ; benzamidine 1mM et PMSF 1mM. Dans ce dernier cas, une solution contenant du KCl concentré a été ajoutée le lendemain sur l'échantillon dialysé, jusqu'à une concentration finale de 15 mM.

Des aliquotes de matériel ont été déposées à différents temps sur des grilles en cuivre recouvertes d'une membrane de carbone et contrastées par coloration négative à l'acétate d'uranyle à 0,1 % dans l'eau. L'observation a été faite sur un microscope SIEMENS-ELMISKOP IA.

7. TECHNIQUES IMMUNOCYTOCHIMIQUES

7.1 Préparation de l'antisérum contre les protéines de 54000-56000 daltons du muscle lisse d'oursin

Les protéines isolées par électrophorèse préparative à partir de la fraction insoluble dans du KCl 1M, sédimentable à 100000 g (section 4.6) ont été extraites à partir du gel de polyacrylamide avec la solution d'urée 7M, dialysées pendant la nuit, concentrées contre du polyéthylène glycol et précipitées dans l'acétone, comme décrit dans la section 5.

Les protéines ainsi isolées ont été dissoutes dans 1 ml de solution d'urée 7M (urée 7M ; K_2HPO_4 10 mM, pH 7.4). Dans cette solution, il a été ajouté un volume égal d'adjuvant de Freund, sous agitation vigoureuse jusqu'à l'obtention d'une émulsion stable. Chaque lapin a été inoculé avec 1 ml de cette émulsion par injections dorsales sous-cutanées.

Le schéma d'immunisation a consisté en une première inoculation de l'ordre de 800 μ g de protéine dans chaque animal, suivie de trois autres injections aux jours 15, 30 et 64 avec 400 μ g de protéine par lapin. Une semaine après la dernière injection, des aliquotes de sang ont été recueillies à partir de la veine marginale de l'oreille. Les sérums testés sur filtre de nitrocellulose comme décrit dans la section suivante, ont révélé une réponse immunitaire fortement positive

vis-à-vis de l'antigène. Après cette constatation, des volumes de sang plus importants ont été collectés dans des grands tubes, puis laissés à coaguler pendant vingt heures à température ambiante en présence d'air, jusqu'à ce que le caillot se contracte. Le sérum a été récupéré par centrifugation à faible vitesse pendant 5 à 10 minutes à température ambiante. L'antisérum ainsi obtenu a été partagé en aliquotes de 200 μ l et congelé à -30°C .

Avant de faire la première injection d'antigène, nous avons prélevé environ 30 ml de sang de chaque animal à partir de la veine marginale de l'oreille. Les sérums ont été préparés comme décrit ci-dessus et conservés en petites aliquotes à -30°C . Ils ont été utilisés comme contrôle dans les expériences d'immunocytochimie.

7.2 Détermination de la spécificité de l'anticorps

Pour tester la spécificité de l'anticorps, les échantillons polypeptidiques ont été transférés à partir de gels de polyacrylamide sur des membranes de nitrocellulose de 0,45 μ par deux méthodes différentes.

7.2.A Electrotransfert

Cette méthode a été décrite par Cohen et col. (121). Le transfert des polypeptides sur le filtre de nitrocellulose a été fait sous un courant électrique de 200 mA et 65 volts pendant 3 H 30 grâce à un système BIO-RAD POWER SUPPLY MODEL 160/1.6 et TRANSBLOT CELL. Le tampon de transfert contenait : glycine 192 mM ; méthanol 20 % et TRIS 25 mM, pH 8.3.

7.2.B Transfert par diffusion

Cette méthode a été décrite par Cohen et col. (121). Après la migration électrophorétique, le gel de polyacrylamide a été équilibré

pendant 30 minutes dans 100 ml de tampon de transfert contenant NaCl 50 mM ; EDTA 2mM, DTT 0,1 mM et TRIS-HCl 10 mM, pH 8.2.

Le système de transfert était constitué par des feuilles de papier filtre Whatman 3MM, des filtres de nitrocellulose et du gel de polyacrylamide imprégnés de solution de transfert puis déposés sur une plaque de verre, dans l'ordre suivant : trois feuilles de papier filtre, un filtre de nitrocellulose, le gel, un filtre de nitrocellulose et trois feuilles de papier filtre. Le système a été recouvert par une feuille de cellophane (Cellofrais) et une plaque de verre a été placée sur cet ensemble. Le contact entre le gel et les filtres de nitrocellulose a été assuré par un poids d'un kilo déposé sur la plaque de verre.

Le transfert a été effectué pendant 16 heures à température ambiante. La qualité du transfert a été vérifiée soit par coloration du gel transféré avec du bleu de Coomassie R-250 0,1 % ; méthanol 50 % ; acide acétique 10 %, soit par coloration du filtre de nitrocellulose par du noir amide 0,1 % ; méthanol 45 % ; acide acétique 10 %, pendant 15 minutes, puis décoloré dans du méthanol 90 % et acide acétique glacial 2%.

7.2.C Réaction immunologique

Une fois effectué le transfert des protéines sur les filtres de nitrocellulose, ceux-ci ont été traités selon Cohen et col. (121). Chaque filtre a été incubé avec 100 ml de PBS (NaCl 137 mM ; KCl 2,7 mM ; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 3,2 mM ; KH_2PO_4 1,5 mM, pH 8.2 ajusté avec une solution de Na_2HPO_4 1M), contenant de la sérum-albumine bovine (BSA) à 3 g %. Cette incubation a été faite sous agitation à 37°C pendant une heure, suivie de trois lavages de 10 minutes avec 100 ml de PBS contenant 2 g/l de Triton X-100, 2 g/l de SDS et 2,5 g/l de BSA (PTBS-BSA), sous agitation.

Chaque filtre de nitrocellulose a été ensuite incubé avec 10 ml d'antisérum de lapin dilué à 1 % (V/V) dans du PTBS-BSA. L'incubation a

été faite sous agitation pendant une heure à 37°C, , dans des sacs en plastique étanches.

Après cinq lavages dans du PTBS-BSA, les filtres ont été incubés sous agitation pendant une heure à 37°C, , en présence d'anti IgG de lapin couplé à la peroxidase, produit chez le mouton (Pasteur Productions), dilué à 0.5 % dans 10 ml de PTBS-BSA. Après cinq autres lavages dans du PTBS-BSA, la détection de la réaction immunologique a été faite soit par la diaminobenzidine (DAB) SIGMA, selon Towbin et col. (122), soit par le 4-chloro-1-naphtol, selon Hawkes et col. (123). Dans les deux méthodes, la réaction a été arrêtée à l'intensité désirée en plongeant les filtres de nitrocellulose dans l'eau.

7.3 Immunofluorescence

7.3.A Préparation des échantillons

Les tissus enrichis en cellules musculaires perméabilisées ont été préparés comme décrit dans la section 4.4. Les expériences d'immunofluorescence ont été faites sur des tissus frais, ou conservés à -30°C en glycérol 50 % ; solution II 50 %, contenant 0,2 % final de Triton X-100.

Les cellules musculaires d'oursin ont été détachées du tissu tritonné par traitement mécanique à l'aide d'une pipette Pasteur. Le muscle lisse de rat a été homogénéisé à l'aide de l'ULTRA-TURRAX, trois fois 10 secondes. Les cellules musculaires ainsi obtenues ont été collectées en suspension après décantation des morceaux de tissu.

Les cellules musculaires lisses d'holothurie ont été détachées du tissu connectif soit par traitement mécanique, soit par digestion enzymatique, selon Small (96). Après deux lavages en solution II sans Triton X-100 et sans inhibiteurs de protéases pour éliminer le glycérol, le tissu a été centrifugé pendant deux minutes à basse vitesse, puis transféré dans de la solution II contenant 500 U.I./ml de collagénase

(SIGMA, Type VII, 960 U.I./mg). Après digestion enzymatique pendant une heure à 37°C sous agitation, la réaction a été arrêtée par l'addition de trois volumes de solution I froide, contenant les inhibiteurs de protéases. Après plusieurs lavages dans la solution I, les cellules musculaires ont été décrochées mécaniquement du tissu connectif par aspirations répétées à travers une pipette Pasteur. La suspension de cellules musculaires a été clarifiée par centrifugation à basse vitesse pour éliminer les morceaux de tissu.

Les cytomatrices résistantes au traitement hexylène glycol-Triton, obtenues à partir des oeufs d'oursin comme décrit dans la section 4.3, ont été resuspendues à 4°C dans un petit volume du même milieu. Ce milieu était, cette fois-ci, dépourvu de Triton et contenait de la benzamidine 1mM et 10 µg/ml d'inhibiteur de trypsine du soja. Cette suspension de cytomatrices a constitué le matériel utilisé pour le procédé expérimental d'immunofluorescence décrit dans le paragraphe suivant.

7.3.B Procédé expérimental pour l'immunofluorescence

La réaction d'immunofluorescence a été menée sur des lamelles propres, dégraissées à l'acétone et traitées par la polylysine (SIGMA) à 1 mg/ml dans l'eau. Une goutte de suspension de cellules, préparées comme décrit dans la section 7.3.A, a été déposée sur chaque lamelle et incubée pendant 10 minutes pour permettre la sédimentation des cellules et leur adsorption sur le film de polylysine.

Les cytomatrices ont été fixés à -20°C dans du méthanol contenant EGTA 50 mM pendant 6 minutes, selon Harris (124).

Les lamelles ont été ensuite lavées par immersion pendant 5 minutes dans 10 ml du tampon PBS décrit par Granger et Lazarides (125), contenant NaCl 140 mM ; KH_2PO_4 5mM ; Na_2HPO_4 5mM, pH 7.4 et EGTA 1mM.

Dans le cas des cellules musculaires extraites dans du KCl, les lamelles ont été immergées dans 10 ml de PBS contenant KCl 0,6 M (125)

pendant 5 minutes et ensuite rapidement transférées dans du PBS.

Une goutte de l'antisérum dilué au 1:50, 1:100 ou 1:200 dans du PBS a été déposée sur la préparation. L'incubation a été faite en chambre humide, à température ambiante pendant une heure, suivie de deux lavages de 10 minutes dans du PBS. La préparation a été ensuite incubée pendant une heure à l'abri de la lumière, avec un anti IgG de lapin produit chez le mouton (à une concentration de 2 mg/ml) et couplé à la fluoresceine isothiocyanate (FITC), BIOSYS. L'anti IgG a été dilué au 1:100 dans du PBS. Après un lavage de 10 minutes dans du PBS, les préparations ont été montées avec du MOWIOL sur des lames porte-objet et observées en épifluorescence sur un microscope LEITZ Ortholux 2 POL MK.

Les photographies ont été prises soit avec un film KODAK EKTACHROME 400 ASA, soit avec un film KODAK TRI-X pan ISO 400, tous deux poussés à 1600 ASA.

7.4. Immunocytochimie à l'or colloïdal

Les tissus riches en cellules musculaires ont été obtenus comme décrit dans la section 4.4. Les cytomatrices résistantes au traitement hexylène glycol-Triton ont été obtenues à partir des oeufs d'oursin, comme décrit dans la section 4.3.

Les échantillons ont été préfixés avec de la glutaraldéhyde 0,1 % et de la paraformaldéhyde 0,5 %, soit dans du PBS (125) (cas du muscle), soit dans le milieu de Kane (cas des oeufs), pendant une heure à 0°C, suivi d'un rinçage dans les mêmes tampons pendant 10 minutes. Après deux autres rinçages de 10 minutes dans du PBS, le muscle a été incubé trois fois une heure à température ambiante avec l'antisérum ou le sérum préimmun dilués au 1:100 dans du PBS. Les oeufs ont été incubés une fois pendant une heure et demie, dans les mêmes conditions.

Après trois rinçages de 10 minutes dans du PBS, suivis de deux rinçages dans du PBS-TRIS 20 mM, pH 8.2, contenant de la BSA, le matériel a été incubé à température ambiante pendant une heure avec

l'anti IgG couplé à l'or colloïdal, GAR G5 (Janssen Life Sciences Products), dilué au 1:6 dans le cas des oeufs et au 1:10 pour le muscle, dans du PBS-TRIS 20 mM, pH 8.2 contenant de la BSA 1%.

Après trois rinçages dans du PBS-TRIS 20 mM, pH 8.2, contenant de la BSA 0,1 %, deux rinçages dans du phosphate de Na 0,1 M, pH 7.0, les cellules musculaires ont été fixées dans de la glutaraldéhyde 2,5 %. Par contre, les oeufs ont été fixés dans de la glutaraldéhyde 2 % plus paraformaldéhyde 2 % dans le tampon phosphate et rincés encore trois fois dans le même tampon. Les échantillons ont été post-fixés dans OsO_4 1 %, ensuite deshydratés dans des bains successifs d'alcool et d'oxyde de propylène et, finalement, inclus dans l'Epon 812.

Les coupes ultrafines (700Å) ont été obtenues sur un ultrame III (LKB), colorées par l'acétate d'uranyle alcoolique et le citrate de plomb, puis examinées à l'aide d'un microscope électronique (SIEMENS ELMISKOP I A ou HITACHI H-600).

8. IDENTIFICATION DES FILAMENTS D'ACTINE AVEC LA CHAÎNE LOURDE DE LA MYOSINE (HMM)

Les tissus enrichis en cellules musculaires ont été obtenus comme décrit dans la section 4.4. La HMM a été préparée à partir de la myosine de muscle squelettique de lapin (126) et stockée à -20°C dans un tampon phosphate, pH 7.0, contenant du glycérol 50 %.

La décoration des filaments d'actine par la HMM a été menée sur le tissu préfixé selon Karnovsky-Soyer (127), puis incubé pendant une heure à température ambiante en présence de HMM à une concentration de 1,4 mg/ml dans le tampon PBS (125). Dans le cas des cellules musculaires extraites, le tissu préfixé a été immergé pendant 5 minutes dans du PBS contenant du KCl 0,6M (125), puis rincé rapidement dans du PBS et incubé en présence de HMM. Après lavage d'une heure dans du PBS, le tissu a été fixé dans de la glutaraldéhyde 1%, lavé rapidement dans le même tampon, fixé dans OsO_4 1%, déshydraté dans des bains successifs d'alcool et d'oxyde de propylène et ensuite inclus dans l'Epon 812.

Les coupes ultrafines ont été faites sur un ultrame III (LKB), colorées par l'acétate d'uranyle alcoolique et par le citrate de plomb, puis observées à l'aide d'un microscope électronique HITACHI H-600.

9. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

9.1 Tissus musculaires

L'étude ultrastructurale sur les cellules musculaires a été faite soit sur le tissu intact, prélevé directement par dissection, soit sur le tissu perméabilisé, comme décrit dans la section 4.4. Dans les deux cas, le tissu a été préfixé à température ambiante pendant 60 minutes dans le milieu Karnovsky-Soyer (127), contenant de la glutaraldéhyde 1,25% et du paraformaldéhyde 2 %, dans du PIPES 0,1 M, pH 7.7. Après trois lavages de 5 minutes dans le tampon PIPES 0,1 M, pH 7.7, le tissu a été post-fixé à 4°C pendant 60 minutes dans le même tampon auquel il a été ajouté du tétroxyde d'osmium 1 %. Les échantillons ont été ensuite lavés dans le même tampon, déshydratés par l'éthanol, traités dans l'oxyde de propylène et imprégnés dans l'Epon 812.

9.2 Cytomatrices des oeufs non fécondés

Les cytomatrices des oeufs non fécondés, obtenues comme décrit dans la section 4.3, ont été lavées dans de l'eau de mer synthétique. Ensuite elles ont été préfixées par de la glutaraldéhyde 2% et par du paraformaldéhyde 2% dans l'eau, pendant 60 minutes à température ambiante. Après lavages dans un tampon phosphate de potassium 0,1 M à pH 7.0, le matériel a été post-fixé par l'Os O₄ 1% pendant 30 minutes à 0°C. Ensuite, les échantillons ont été lavés dans le même tampon, déshydratés de façon classique et imprégnés dans l'Epon 812.

Les coupes ultrafines ont été faites sur un ultrame III (LKB), colorées par l'acétate d'uranyle alcoolique et le citrate de plomb, puis examinées à l'aide d'un microscope électronique HITACHI H-600 ou SIEMENS ELMISKOP I A.

CHAPITRE III

ETUDE BIOCHIMIQUE COMPARATIVE DES MUSCLES LISSES
D'INTESTIN DE RAT ET D'OURSIN

ULTRASTRUCTURE DU MUSCLE LISSE D'OURSIN

1. L'INTESTIN D'OURSIN

1.1 Description générale

1.2 Histologie

2. ETUDE COMPARATIVE DES PROFILS ELECTROPHORETIQUES DES PROTEINES DES
MUSCLES LISSES DE RAT ET D'OURSIN3. ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES PROTEINES DE 54000-56000 DALTONS DU
MUSCLE LISSE DE RAT4. ETUDE DES PROTEINES DE 54000-56000 DALTONS DES CELLULES DU MUSCLE
LISSE DE L'INTESTIN D'OURSIN

4.1 Extraction et isolement des protéines de 54000-56000 daltons à
partir de la fraction insoluble dans du KCl 1M, sédimentable à
100000 g

4.2 Identification immunologique des protéines de 54000-56000 daltons

4.3 Focalisation isoélectrique des protéines de 54000-56000 daltons

4.4 Essai de polymérisation in vitro des protéines de 54000-56000
daltons

4.5 Localisation des protéines de 54000-56000 daltons dans le muscle
lisse d'oursin par des méthodes immunocytochimiques

5. DISCUSSION

Dans ce chapitre nous faisons une étude comparative de protéines du cytosquelette des muscles lisses d'intestin de rat et d'oursin. D'abord nous faisons une brève étude comparative des propriétés de solubilité des protéines contractiles (l'actomyosine). L'analyse des profils électrophorétiques des deux tissus, fractionnés par une méthode classique décrite pour des muscles lisses de vertébrés, montre des comportements de solubilité semblables entre l'actomyosine de rat et d'oursin. Par contre, des différences sont observées en ce qui concerne la solubilité des protéines de poids moléculaires apparents de 54000-56000 daltons, soumises au même traitement. Dans le muscle de rat, ces protéines correspondent aux filaments intermédiaires (desmine et vimentine).

Ensuite, nous développons une étude biochimique et ultrastructurale des protéines de 54000-56000 daltons du muscle lisse d'intestin d'oursin. Ces protéines sont insolubles dans des tampons de haute force ionique (KCl 1M), une propriété est caractéristique des protéines qui constituent les filaments intermédiaires. Toutefois, nous démontrons par des techniques de focalisation isoélectrique et par des méthodes immunologiques que ces protéines co-isolées du muscle lisse d'oursin ne présentent pas les mêmes propriétés que la desmine et la vimentine du muscle lisse de rat. Par ailleurs, ces protéines d'oursin ne sont pas capables de polymériser dans des conditions de polymérisation classiques pour les filaments intermédiaires. Dans ces mêmes conditions, la desmine et la vimentine de rat co-polymerisent en filaments de 10 nm de diamètre.

Les études ultrastructurales réalisées sur le muscle lisse d'oursin montrent que l'organisation des filaments fins et épais ressemble celle décrite pour le muscle lisse de vertébrés. Cependant, après extraction des filaments fins et épais par le KCl 0.6 M, un réseau de filaments de 3-4 nm de diamètre est mis en évidence, tandis que les filaments de 10 nm, décrits chez les vertébrés, ne sont pas détectés.

L'antisérum dirigé contre les protéines de 54000-56000 daltons du muscle lisse d'oursin a été utilisé pour des études d'immunocytochimie par fluorescence et par marquage à l'or colloïdal. Ces derniers

résultats montrent que les anticorps marquent spécifiquement les filaments de 3-4 nm du muscle lisse d'oursin.

Nos résultats expérimentaux suggèrent que les protéines de 54000-56000 daltons sont des constituants des filaments de 3-4 nm.

La signification probable de ce nouvel élément cytosquelettique, que nous appelons echinonématique, sera discuté à la fin de ce chapitre.

1. L'INTESTIN D'OURSIN

1.1 Description générale

Les oursins, comme tous les échinodermes présentent une symétrie pentamérique. Le tube digestif de l'oursin est bien développé, étant constitué d'une bouche, d'un pharynx et d'un intestin, lequel peut être divisé en intestin grêle proximal et gros intestin distal .

L'intestin proximal fait un tour complet autour de la cavité coelomique dans laquelle il est suspendu, puis se transforme en gros intestin , qui fait un autre tour complet dans le sens opposé, avant de rejoindre le rectum et se vider à travers l'anus.

La partie distale est composée d'une membrane fragile de coloration marron, disposée dans la cavité coelomique sous forme de poches attachées à la paroi interne du test en cinq points différents, suivant la symétrie pentamérique caractéristique des échinodermes.

La figure 1 montre l'aspect et la disposition de l'intestin d'oursin in vivo. L'intestin est le site de digestion et d'absorption et les produits digérés passent à travers la paroi intestinale vers la cavité coelomique pour être distribués. Les oursins se nourrissent surtout d'algues. Néanmoins, une variété de plantes et d'animaux composent leur source d'alimentation (128).

Notre travail expérimental a été réalisé sur le tissu musculaire présent dans la partie distale de l'intestin.

1.2 Histologie

Sur des coupes transversales de la partie distale de l'intestin d'oursin préfixée en glutaraldéhyde 1,25 %, paraformaldéhyde 2 %, comme décrit dans la section 9. du chapitre Matériels et Méthodes, puis colorées à l'azur II et au bleu de méthylène (figure 2.A), nous observons les différentes couches de cellules qui le composent.

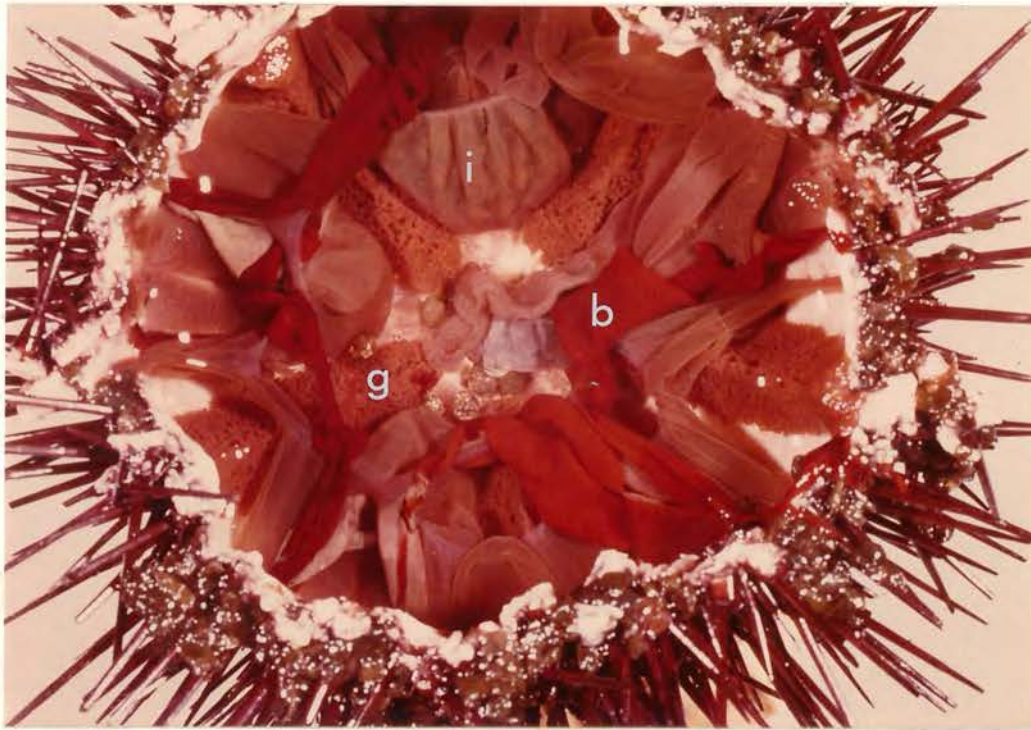


Figure 1. Vue aboral de la cavité coelomique du P. lividus. Nous observons la disposition selon une symétrie pentamérique des gonades (g), de la glande brune (b), de fonction inconnue, et de l'intestin (i) qui se présente sous forme d'une membrane très fragile et fine dont la transparence permet d'apercevoir le contenu.

L'épithélium digestif formé surtout d'entérocytes se trouve sur le lumen intestinal avec des microvillosités où des processus de pinocytose ont lieu. Cet épithélium repose sur le tissu connectif contenant des fibres de collagène arrangées de façon irrégulière. Du côté extérieur du tissu connectif se trouve une fine couche continue de fibres musculaires transversales et des fibres longitudinales un peu moins jointives, immergées dans le tissu connectif riche en collagène. La couche la plus externe de l'intestin est constituée de cellules épithéliales typiques qui délimitent l'organe dans la cavité coelomique.

Nous pouvons observer sur des coupes ultra fines contrastées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb, puis examinées à plus fort grossissement (figure 2.B) que les myofilaments sont les principaux constituants cytoplasmiques des cellules musculaires et que leur organisation est typiquement celle des muscles lisses de vertébrés (99). Sur la périphérie de ces cellules nous pouvons identifier des mitochondries et des structures vésiculaires contenant des substances de réserve.

2. ETUDE COMPARATIVE DES PROFILS ELECTROPHORETIQUES DES PROTEINES DES MUSCLES LISSES DE RAT ET D'OURSIN

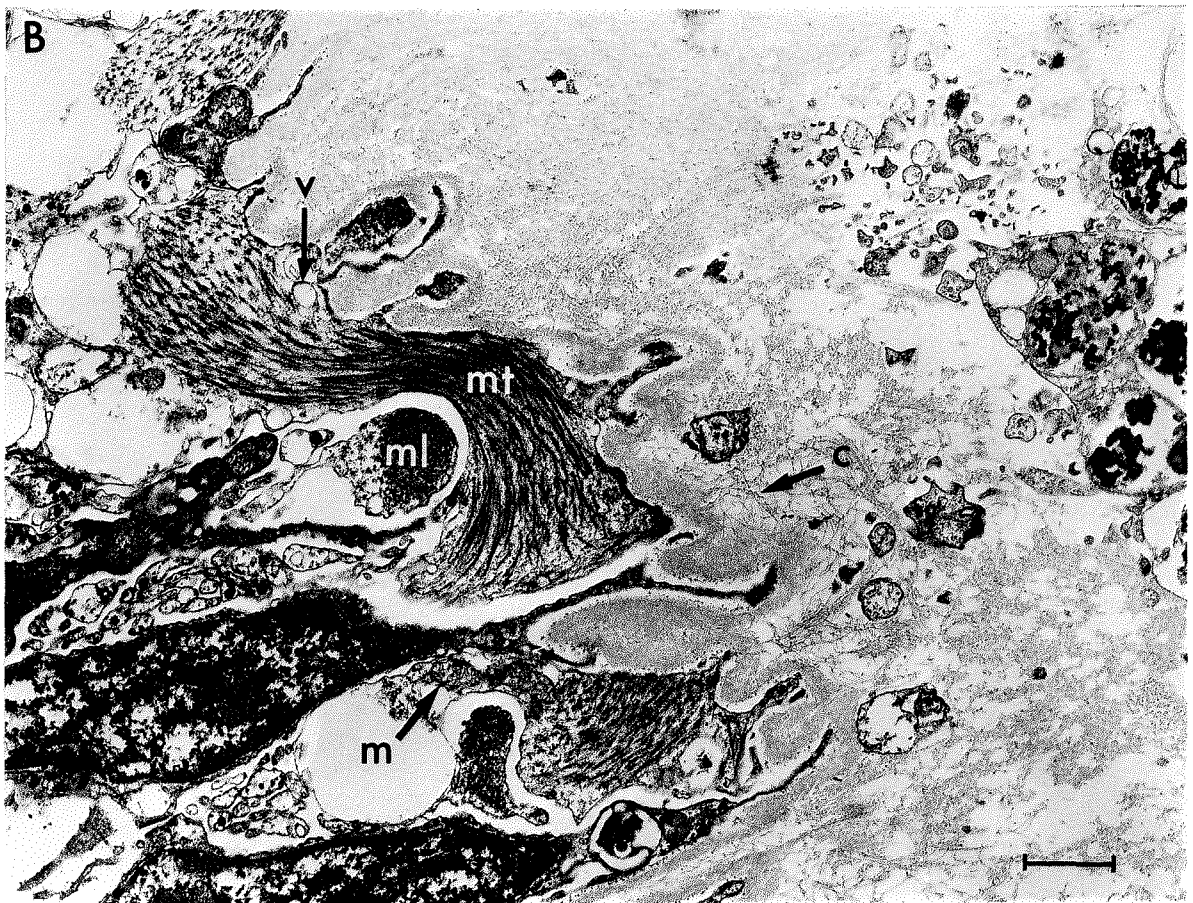
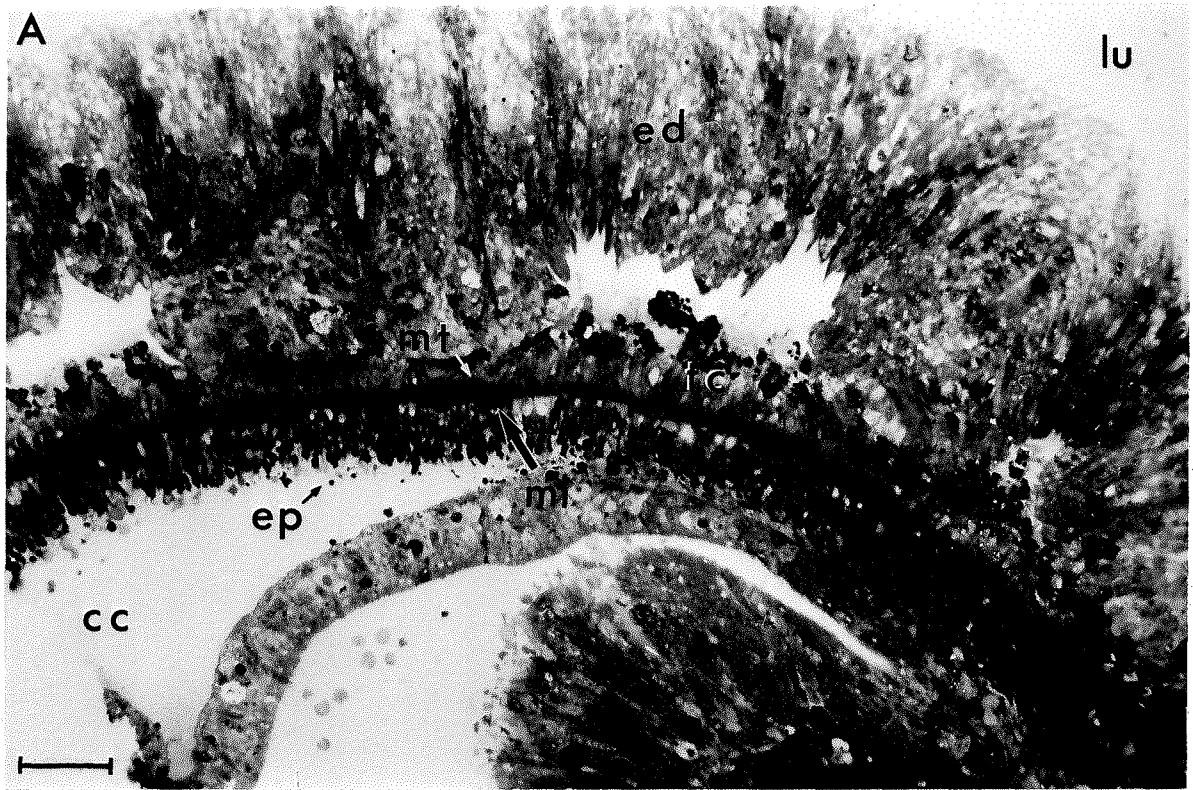
Afin d'étudier les protéines structurales du muscle lisse de l'intestin d'oursin, nous avons employé une méthode de fractionnement protéique classiquement utilisée pour les muscles lisses de vertébrés, en prenant pour comparaison un tissu qui accomplit une fonction similaire chez un animal supérieur, l'intestin de rat.

Nous avons fait l'étude comparative par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE), des différentes fractions résultantes du traitement à faible et haute force ionique de ces deux tissus chez des animaux qui sont fort éloignés dans l'échelle biologique. Cette étude nous montre des analogies et des différences de comportement de solubilité au niveau des protéines contractiles et structurales.

Figure 2. Coupes transversales de l'intestin d'oursin P. lividus.

A. Coupe semi-fine (1 μ) colorée à l'azur II et au bleu de méthylène, observée en microscopie optique, montrant les différentes couches de cellules qui composent le tissu: (lu) lumen digestif; (ed) épithélium digestif; (tc) tissu connectif; (mt) muscle transversal; (ml) muscle longitudinal; (ep) épithélium péritonéal; (cc) cavité coelomique. Grossissement: X 100. Bar = 11 μ .

B. Coupe ultra-fine (0,08 μ) contrastée à l'acetate d'uranyle et au citrate de plomb, observée au microscope électronique: (mt) cellule musculaire de la couche transversale; (ml) cellule musculaire de la couche longitudinale; (m) mitochondrie; (v) vésicules; (c) fibres de collagène. Grossissement: X 12500. Bar = 1 μ .



Parmi les nombreuses chaînes polypeptidiques visibles sur les gels de polyacrylamide montrés sur la figure 3, notre intérêt s'est concentré sur celles correspondant aux protéines contractiles les plus importantes (l'actomyosine) ainsi que sur celles des filaments intermédiaires (129), dont la fonction n'est pas encore complètement élucidée.

Le tissu musculaire est préparé par traitement en concentrations croissantes de Triton X-100, comme décrit en détail dans la section 4.4 du chapitre Matériels et Méthodes. Après élimination des cellules épithéliales par action du détergent, il reste une couche de cellules musculaires perméabilisées reposant sur le tissu connectif. Ces cellules musculaires se trouvent en état de rigidité provoqué par l'action du détergent et par l'absence d'ATP nécessaire pour que l'interaction entre les molécules d'actine et de myosine soit défaire (100).

L'analyse du profil électrophorétique par SDS-PAGE des protéines de cellules musculaires perméabilisées de rat (figure 3.A, ligne a) et d'oursin (figure 3.B, ligne a) montre la présence de plusieurs chaînes polypeptidiques. Parmi ces chaînes se trouvent celles de 220000 daltons correspondant au poids moléculaire des chaînes lourdes de la myosine, des bandes au niveau des chaînes légères de la myosine (20000 et 17000 daltons) (45,130), un polypeptide de 43000 daltons, au niveau de la sous-unité de l'actine (45) et un doublet de 54000-56000 daltons, qui correspond au poids moléculaire des protéines constitutives des filaments intermédiaires de muscle chez les vertébrés (131).

Des expériences réalisées sur des muscles lisses de vertébrés suggèrent que la myosine non phosphorylée (en absence de Ca^{++}) forme des filaments qui peuvent être dissociés par le complexe ATP-Mg en condition de force ionique dite physiologique, alors que les filaments de myosine phosphorylée ne présentent pas cette propriété (130).

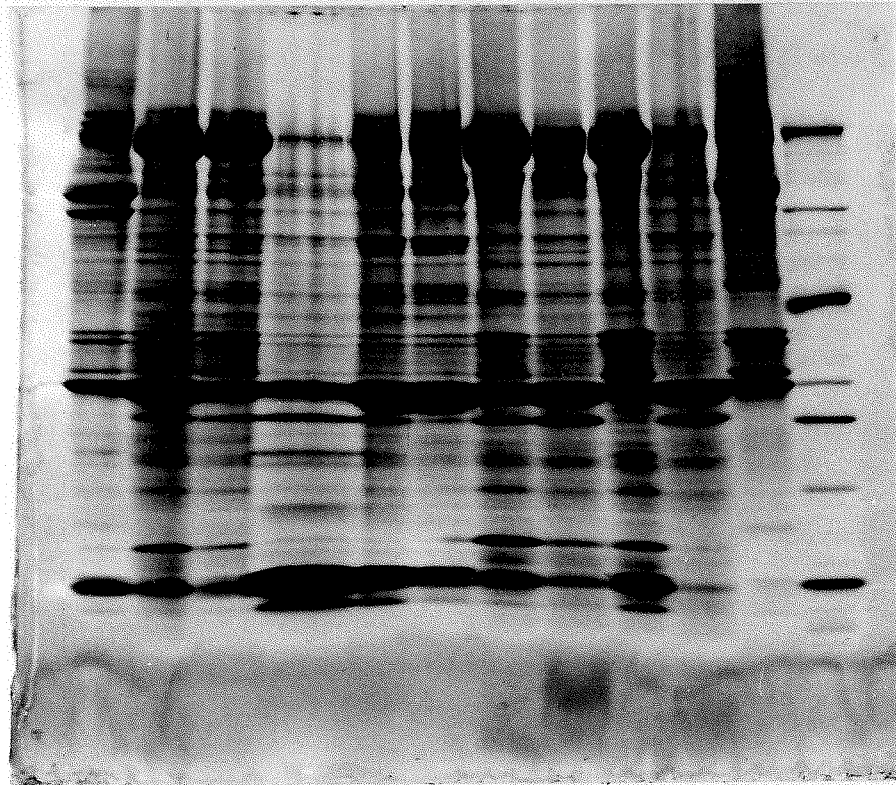
Lors du fractionnement à faible et haute force ionique (119), comme décrit dans la section 4.4.A du chapitre Matériels et Méthodes, les cellules musculaires lisses de rat et d'oursin montrent des comportements de solubilité semblables en ce qui concerne les protéines

Figure 3. Electrophorèse en présence de SDS, en gradient de concentration d'acrylamide (5 - 20%) des protéines de muscles lisses de rat (A) et d'oursin (B), extraites à faible (LAMES) et haute (HAMES) force ionique.

A. (a) Muscle lisse tritonné; (b,c) surnageant 20000 g LAMES, 1^{ère} et 2^{ème} extractions; (d-f) surnageant 20000 g HAMES, 1^{ère}, 2^{ème} et 3^{ème} extractions; (g,i) fractions précipitées par le $MgCl_2$ 30 mM à partir des surnageants (b,c), respectivement; (h,j) fractions précipitées par le $(NH_4)_2 SO_4$ 2,3 M à partir des surnageants $MgCl_2$; (k) fraction insoluble après les extractions successives par le LAMES et HAMES. Chaque dépôt correspond à 120 μ g de protéines.

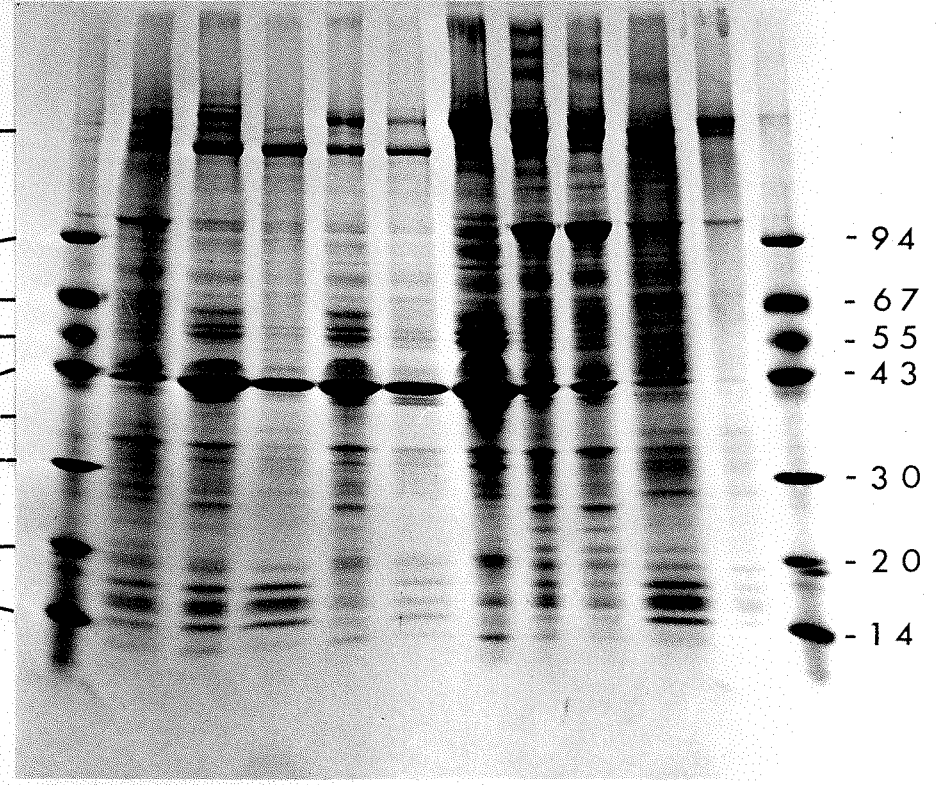
B. (a) Muscle lisse tritonné; (b) surnageant 20000 g LAMES; (c) culot 100000 g LAMES; (d) surnageant 100000 g LAMES; (g) surnageant 20000 g HAMES; (h) surnageant 100000 g HAMES; (i) culot 100000 g HAMES; (j) fraction insoluble après les extractions par le LAMES et HAMES. Le surnageant (d) a été précipité par $(NH_4)_2 SO_4$ 2,4 M, dialysé contre du HAMES, puis fractionné par centrifugation à 100000 g; (e) culot 100000 g; (f) surnageant 100000 g. (w) Etalons de poids moléculaires. Coloration au bleu de Coomassie.

A



a b c d e f g h i j k w

B



w a b c d e f g h i j w

de poids moléculaires correspondant à ceux de l'actomyosine. Les schémas n°1 et n°2 sont rappelés dans la page suivante.

L'analyse par SDS-PAGE des fractions extraites dans le LAMES en présence d'ATP 10 mM et en absence de Ca^{++} , à partir des cellules musculaires de rat (figure 3.A, lignes b et c) et d'oursin (figure 3.B, ligne b), montre dans les deux tissus un enrichissement au niveau de la myosine, extraite sous forme d'actomyosine. Dans le cas de l'oursin, ces protéines restent en solution même après centrifugation à 100000 g, (figure 3.B, ligne d).

L'addition de MgCl_2 30 mM final sur l'extrait LAMES provoque, chez le rat, la précipitation d'une fraction enrichie en actomyosine (figure 3.A, lignes g et i). L'addition de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,3 M final au surnageant du traitement préalable en MgCl_2 , induit la précipitation d'une fraction enrichie en protéines de 36000 daltons, décrite par Sobieszek et Small (119) comme étant la tropomyosine (figure 3.A, lignes h et j).

Chez l'oursin, l'addition de MgCl_2 sur la fraction extraite dans le LAMES n'induit pas de précipitation ; cependant, le traitement par le $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ provoque la précipitation de la majorité de l'actomyosine, accompagnée d'une faible bande au niveau de 36000 daltons (figure 3.B, ligne f).

Par cette méthode d'extraction, nous avons obtenu 160 mg d'actomyosine brute de muscle de rat, à partir de 12 g de tissu humide enrichi en cellules musculaires. Dans le cas de l'oursin, les extraits n'ont pas pu être dosés parce que le tissu prend une coloration marron foncé au cours de son traitement. Cela est peut être dû à l'action réductrice du DTT ou du β -mercaptoéthanol sur certains pigments de nature inconnue. Tous les extraits provenant de l'intestin d'oursin présentent cette coloration marron foncé, qui fausse les dosages colorimétriques. Cette coloration persiste même après traitement à l'acétone, ce qui suggère que ces pigments ne sont pas de nature lipidique.

Après l'extraction de l'actomyosine à faible force ionique à partir des cellules musculaires homogénéisées de rat et d'oursin, le résidu de

Schéma N° 1

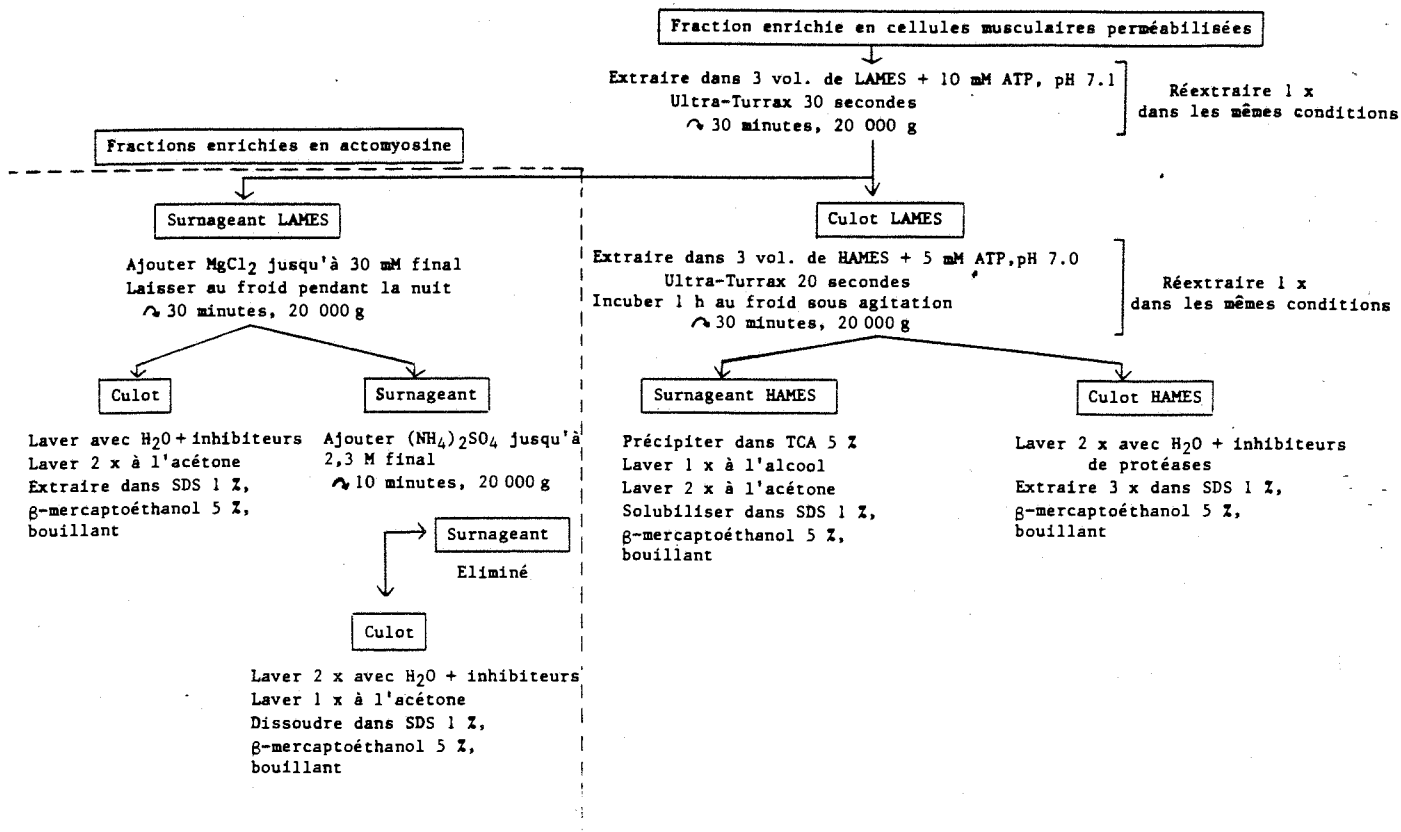
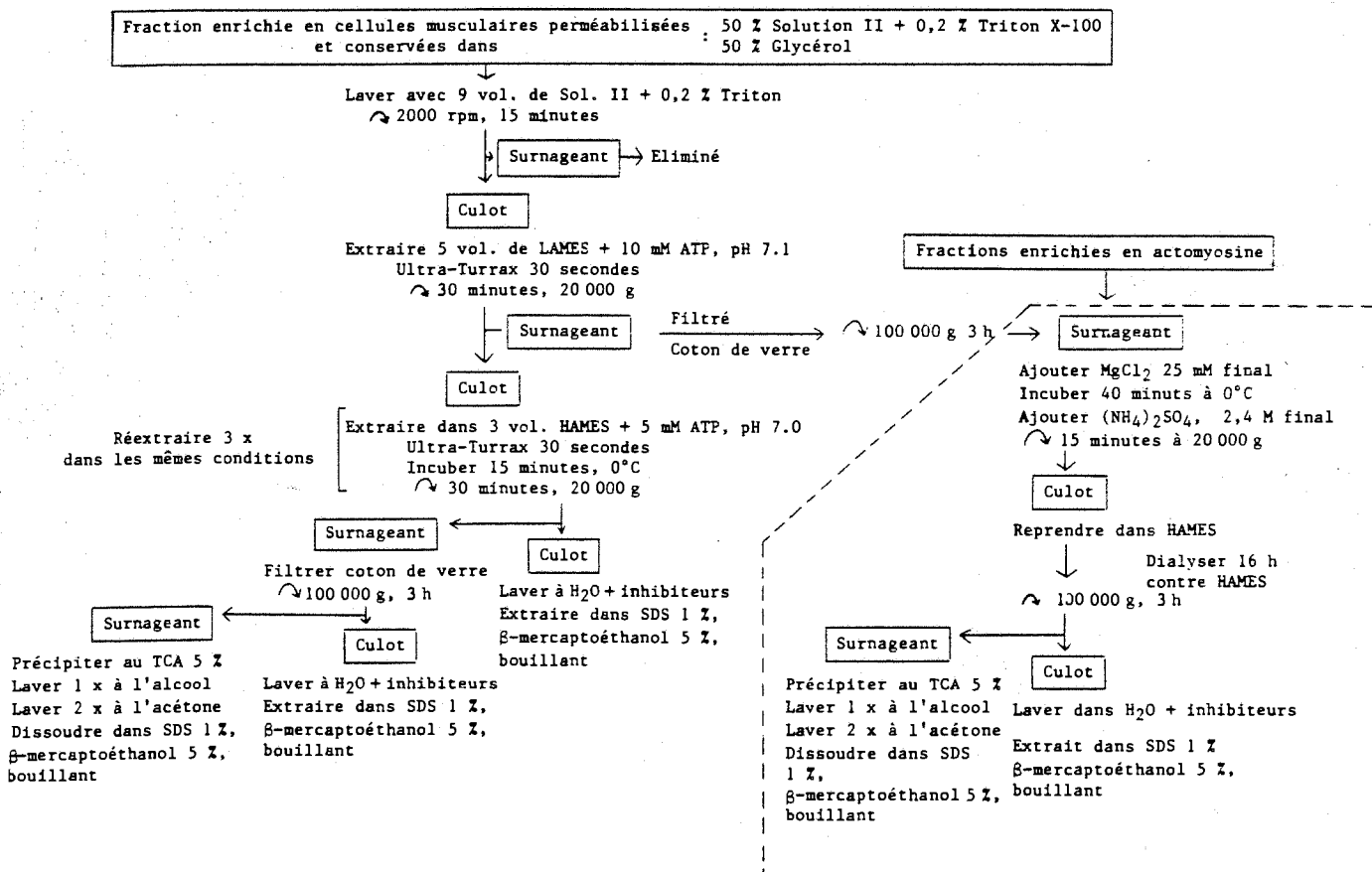
EXTRACTION DE L'ACTOMYOSINE A PARTIR DU MUSCLE DE L'INTESTIN DE RAT

Schéma N° 2

EXTRACTION DE L'ACTOMYOSINE A PARTIR DU MUSCLE DE L'INTESTIN D'OURSIN

l'extraction contient une importante quantité d'actine par rapport à la myosine.

La myosine et la tropomyosine résiduelles sont extraites à haute force ionique en solution contenant KCl 0.6 M (HAMES). Voir figure 3.A, lignes d, e et f pour le rat et figure 3.B, lignes g, h et i pour l'oursin.

Le résidu de cette extraction est lavé à l'eau distillée pour éliminer l'excès de KCl, puis extrait en SDS β -mercaptoéthanol bouillant. La comparaison des profils électrophorétiques de ces fractions insolubles en KCl 0.6 M à partir des muscles de rat et d'oursin montre une différence de comportement de solubilité pour les protéines de 54000-56000 daltons.

Dans le cas du rat, ce résidu, représentant 133 mg de protéines à partir de 12 g de tissu humide, est enrichi en protéines de 54000-56000 daltons, insolubles dans la solution de KCl 0.6 M (figure 3.A, ligne k). Seule une fraction de ces protéines est préalablement extratable en KCl 60 mM et précipite avec l'actomyosine en présence de $MgCl_2$ 30 mM final (figure 3.A, lignes g et i).

Chez l'oursin, par contre, la majorité des protéines de 54000-56000 daltons est déjà extraite à faible force ionique (KCl 60 mM) et reste en solution même après centrifugation à 100000 g (figure 3.B, ligne d). Ces protéines précipitent néanmoins avec l'actomyosine par addition de $(NH_4)_2SO_4$ 2,3 M final (figure 3.B, ligne f). Le résidu final des extractions dans KCl 0,6 M ne contient pratiquement pas les protéines en question, comme le montre la figure 3.B, ligne j.

Cette différence dans le comportement de solubilité de protéines de même poids moléculaire du muscle lisse d'un vertébré et d'un invertébré marin suggère une différence liée soit aux propriétés chimiques de ces molécules, soit aux interactions avec les autres constituants structuraux de la cellule.

Nous avons remarqué, en absence d'inhibiteurs de protéases, une forte

tendance à la dégradation protéolytique tout au long du processus d'obtention et d'extraction des protéines des muscles du rat et de l'oursin. Cette dégradation, particulièrement importante chez l'oursin est présente pendant toutes les étapes de la préparation, comme on pouvait s'y attendre avec des tissus spécialisés dans la fonction digestive. Pour éviter cette activité nous utilisons un mélange d'inhibiteurs de protéases (benzamidine 1mM, PMSF 1mM, 10 µg/ml du mélange d'inhibiteurs : chymostatine, pepstatine, leupeptine et antipaïne) dans toutes les étapes d'obtention et de fractionnement des tissus.

3. ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES PROTEINES DE 54000-56000 DALTONS DU MUSCLE LISSE DE RAT

Les protéines du type filament intermédiaire ont été décrites dans les cellules musculaires de différentes espèces de vertébrés.

La skeletine (100) ou desmine (132), isolée pour la première fois à partir de gésier de poulet, a un poids moléculaire estimé entre 50000 et 55000 daltons par SDS-PAGE (100,132), et, comme toutes les protéines du type filament intermédiaire, est insoluble à haute force ionique. Cependant, Hubbard et Lazarides (133) ont observé que lors de l'extraction de l'actomyosine à faible force ionique (TRIS-HCl 10 mM, pH 7.5 ; EGTA 10 mM) à partir de gésier de poulet, une partie de la desmine était soluble dans ce milieu. Geisler et Weber (134) ont extrait les protéines du type filament intermédiaire à partir de gésier de poulet et de l'estomac de porc, directement à haute force ionique, en exploitant le comportement de solubilité de ces protéines.

Nous avons utilisé une procédure semblable pour isoler les protéines de 54000-56000 daltons du muscle lisse d'intestin du rat. Le tissu est extrait directement dans une solution contenant de KCl 1M à pH 7.5, comme décrit en détail dans la section 4.6 du chapitre Matériels et Méthodes, pour éviter la solubilisation d'une fraction de ces protéines à faible force ionique. Les protéines de 54000-56000 daltons de l'intestin du rat, soumises à ce traitement, se sont montrées

complètement insolubles, étant récupérées dans le résidu de l'extraction à haute force ionique. Ce comportement sera illustré plus loin dans la figure 8.A, lignes a, b, c et d.

Il a été montré qu'à partir de la fraction insoluble à haute force ionique les protéines des filaments intermédiaires peuvent être facilement extraites par des agents comme l'acide acétique 1M (100) ou l'urée 6M (120). Les protéines des filaments intermédiaires, surtout la vimentine et la desmine, sont très sensibles à la dégradation protéolytique, comme cela a été remarqué par Small et Sobieszek (100). L'utilisation de l'acide acétique 1M comme milieu d'extraction provoque la dégradation lente de la desmine (133).

Nous avons utilisé dans nos premiers essais une solution contenant de l'urée 6M, selon Huiatt et col. (120) comme milieu d'extraction des protéines de 54000-56000 daltons à partir du résidu des traitements à haute force ionique. Nous avons obtenu par cette procédure les protéines en question, avec un faible rendement, après l'élimination de l'urée par dialyse. L'analyse par SDS-PAGE du matériel extrait par l'urée a montré qu'une partie des protéines de 54000-56000 daltons avait été dégradée. Cette dégradation est peut-être due à l'action d'enzymes protéolytiques abondantes dans l'intestin, malgré la présence des inhibiteurs de protéases tout au long du processus d'extraction. Ceci nous a amené à faire l'extraction de la fraction insoluble à haute force ionique contenant ces protéines par du SDS 1 % ; β -mercaptoéthanol 5 % bouillant. Cette procédure s'est montrée la plus rapide et adéquate pour obtenir les protéines sans dégradation.

Le profil électrophorétique en SDS-PAGE de la fraction insoluble dans du KCl 1M, puis extraite par le SDS ; β -mercaptoéthanol, représente la totalité des protéines de 54000-56000 daltons, l'actine résiduelle, une bande de 45000 daltons et des protéines de haut poids moléculaire (figure 4).

L'isolement de ces polypeptides a été fait par électrophorèse préparative. Les peptides de 54000-56000 daltons ainsi séparés ont été excisés du gel, puis extraits dans la solution contenant de l'urée 7M,

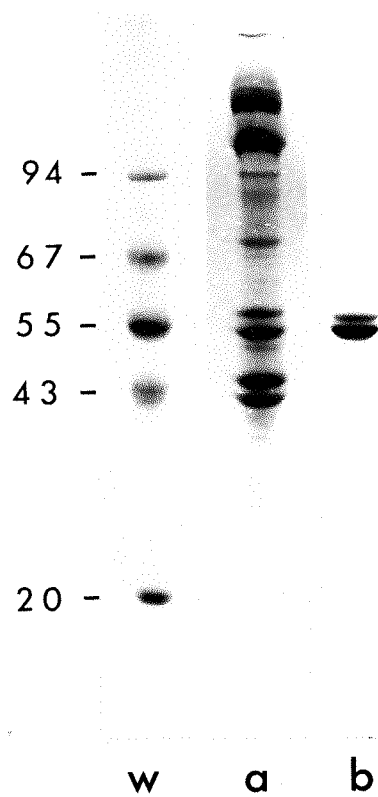


Figure 4. Electrophorèse en gel de polyacrylamide à 10% en présence de SDS: (a) fraction insoluble dans le KCl 1 M, sédimentable à 20000 g (80 μ g); (b) desmine et vimentine isolées par électrophorèse préparative (15 μ g). (w) Etalons de poids moléculaires. Coloration au bleu de Coomassie.

comme décrit en détail dans la section 5 du chapitre Matériels et Méthodes. Après dialyse contre du tampon TRIS-HCl 10 mM, pH 8.0, les protéines ont été concentrées, puis précipitées par huit volumes d'acétone froid pour éliminer le bleu de Coomassie résiduel. La poudre acétonique séchée, puis resolubilisée dans le SDS ; β -mercaptoéthanol, contient le doublet de protéines sans aucune dégradation ni traces de contamination (figure 4, ligne b). A partir de 10 ml de tissu musculaire tritoné (19 rats de 30 jours), nous avons isolé 4,2 mg du doublet de 54000-56000 daltons.

Cette méthode, qui a été utilisée aussi par Franke et col. (135) pour isoler des cytokératines bovines, est rapide et efficace. Les protéines ainsi isolées sont capables de se renaturer et de reconstituer in vitro des filaments présentant la morphologie typique des filaments intermédiaires trouvés in situ (135).

Les protéines de 54000-56000 daltons isolées et soumises ensuite à la focalisation isoélectrique (IEF), présentent des points isoélectriques très proches de ceux décrits pour la desmine (134) et pour la vimentine (136) des muscles lisses de vertébrés (figure 5).

La coexistence de desmine et de vimentine dans certaines des cellules du muscle lisse de l'aorte de poulet et de différentes espèces de mammifères a été démontrée par Schmid et col. (136), par immunofluorescence sur des coupes congelées et par focalisation isoélectrique sur des cytosquelettes extraits à haute force ionique. Ces auteurs ont vérifié que dans ce tissu la vimentine et la desmine se trouvent en proportions variables selon l'espèce animale étudiée. Ils ont démontré que dans le muscle lisse de l'aorte du rat la vimentine prédomine par rapport à la desmine. Ce résultat ne se retrouve pas dans le muscle de l'intestin pour lequel nous avons estimé, par densitométrie à partir des protéines isolées par l'électrophorèse préparative, une proportion desmine/vimentine de l'ordre de 2 : 1.

L'identité de la vimentine du muscle de l'intestin de rat a également été démontrée par réaction immunologique croisée sur filtre de nitrocellulose, en utilisant comme anticorps l'antivimentine de

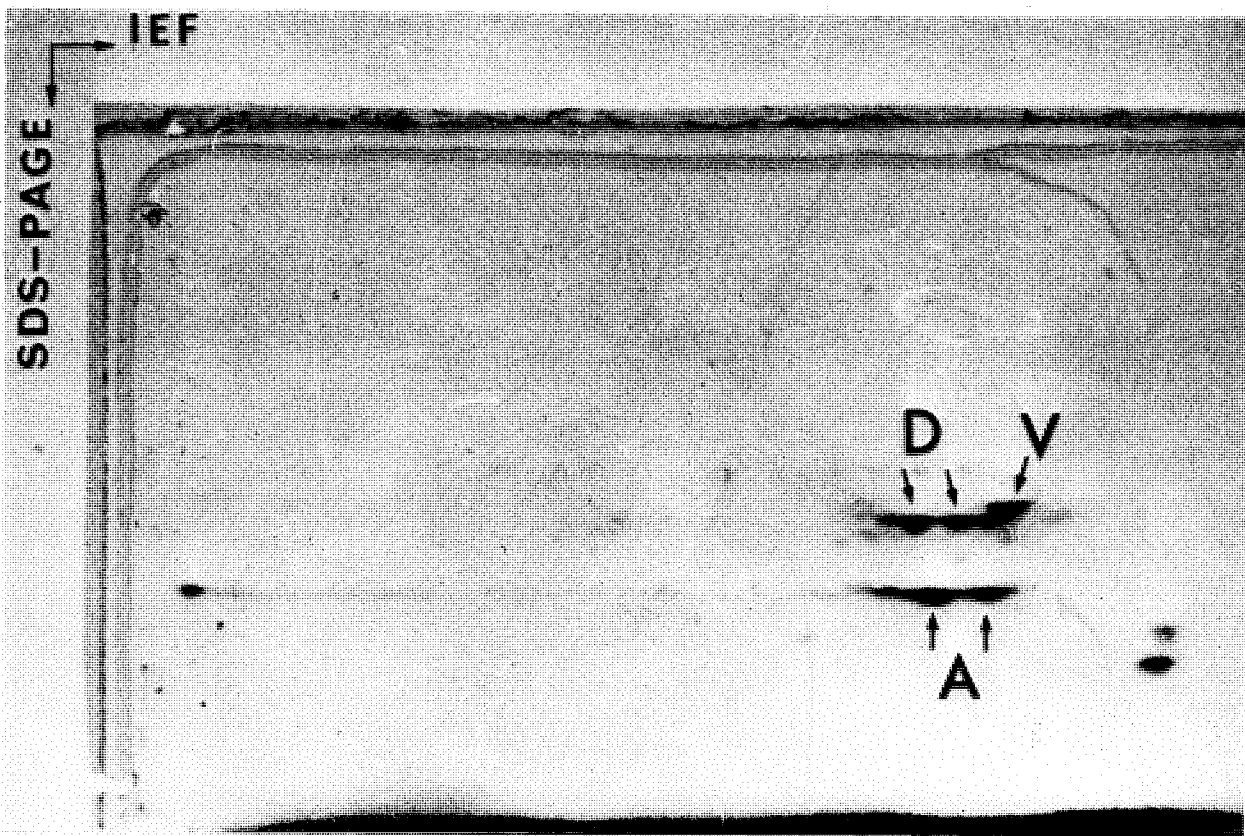


Figure 5. Electrophorèse bidimensionnelle de la desmine (D) et de la vimentine (V) de muscle lisse de rat (30 μg), et de l'actine (A) du muscle squelettique de lapin (30 μg). Coloration au bleu de Coomassie.

fibroblaste de rat (gentiment offerte par Madame Anne Marie Hill). Le même anticorps, par contre, n'a pas donné de réaction croisée avec le doublet de même poids moléculaire de la fraction insoluble dans le KCl 1 M et sédimentable à 100000 g à partir de l'intestin d'oursin, comme montre la figure 6.

Lorsqu'on les soumet à des cycles de polymérisation in vitro dans des conditions classiques pour les protéines du type filament intermédiaire (pH entre 7.0 et 8.0 en présence de sel, comme décrit dans la section 6 du chapitre Matériels et Méthodes) , la desmine et la vimentine que nous avons isolées co-polymérisent sous forme de filaments de 10 nm de diamètre, anastomosés et flexibles, ayant un aspect typique des filaments intermédiaires (120) comme le montre la figure 7.

Ces résultats indiquent, donc, que les protéines de 54000-56000 daltons isolées à partir du muscle lisse de l'intestin du rat sont des protéines du type filament intermédiaire, identifiées comme la desmine et la vimentine.

Des études réalisées par Small et Sobieszek (100) sur l'intestin grêle de cochon d'Inde ont révélé la présence de la desmine comme seule représentant des protéines capables de former des filaments de 10 nm in vivo et in vitro.

4. ETUDE DES PROTEINES DE 54000-56000 DALTONS DES CELLULES DU MUSCLE LISSE DE L'INTESTIN D'OURSIN

Lors du fractionnement des protéines des cellules musculaires d'oursin à faible et haute force ionique pour extraire l'actomyosine (selon la méthode de Sobieszek et Small (119), comme décrit dans la section 4.4.A du chapitre Matériels et Méthodes), nous observons que la totalité des protéines de 54000-56000 daltons semble être soluble en KCl 60 mM (LAMES). Ceci est montré dans la figure 3.B, ligne b. De plus, dans le cas de l'oursin, les protéines de 54000-56000 daltons extraites à faible force ionique ne sont pas sédimentables à 100000 g (figure 3.B, ligne d) ; toutefois, l'addition de sulfate d'ammonium 2,3 M final à ce

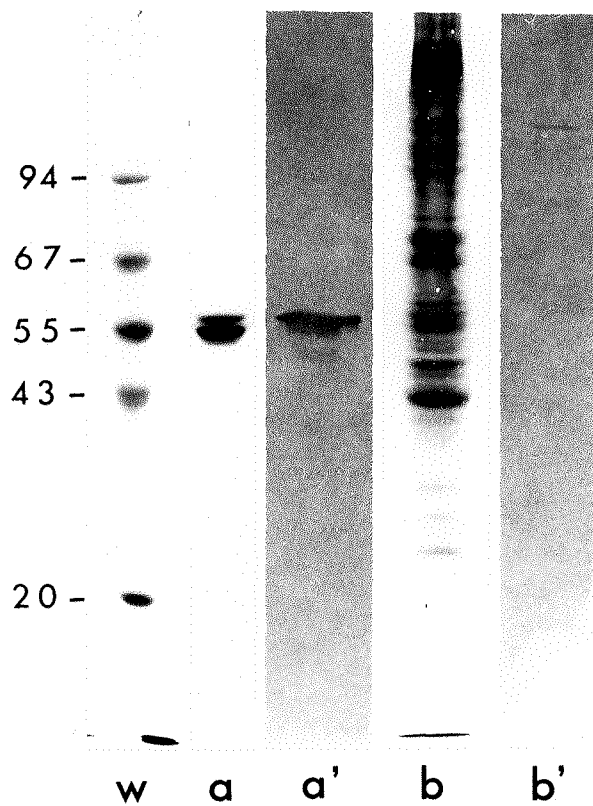


Figure 6. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (10%) en présence de SDS et réaction immunologique sur filtre de nitrocellulose avec l'antisérum dirigé contre la vimentine de fibroblaste de rat (dilution 1:500). (a) SDS-PAGE de la desmine et vimentine isolées de muscle de rat; (b) SDS-PAGE de la fraction du muscle d'oursin, insoluble dans le KCl 1 M et sédimentable à 100000 g. (w) Etalons de poids moléculaire. Coloration au bleu de Coomassie. (a', b') Réaction immunologique des échantillons (a) et (b), respectivement.

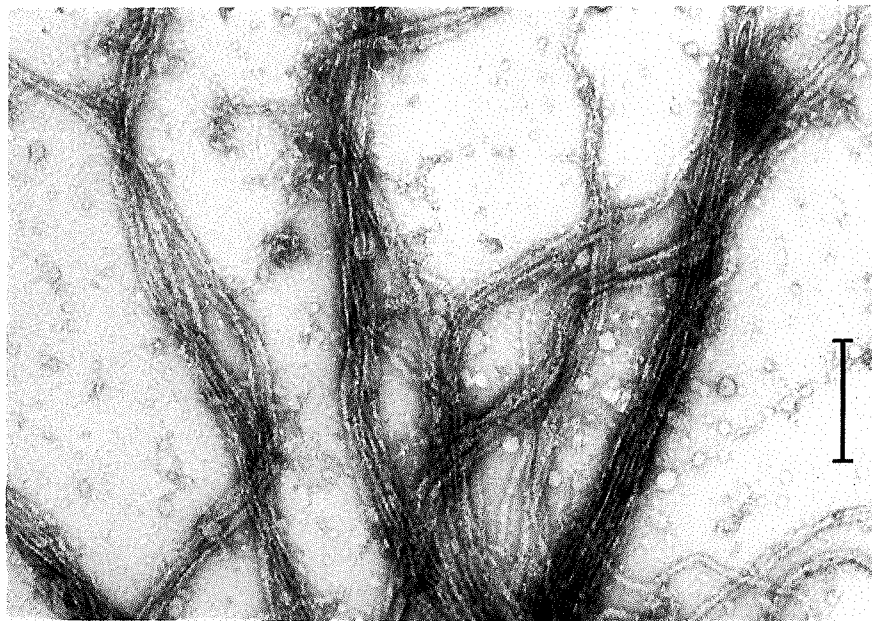


Figure 7. Coloration négative à l'acétate d'uranyle à 1% de la desmine et vimentine de rat co-polymerisées in vitro à une concentration de 600 $\mu\text{g/ml}$. Bar = 0,2 μm .

surnageant provoque la précipitation des protéines en question, que l'on sédimente ensuite par centrifugation. Le culot est repris en KCl 0,6 M (HAMES), puis dialysé contre la même solution pour éliminer le sulfate d'ammonium. Après centrifugation à 100000 g les protéines de 54000-56000 daltons restent encore dans la fraction non sédimentable à haute vitesse (figure 3.B, ligne f).

Cette procédure de fractionnement montre que le doublet de 54000-56000 daltons ne présente pas le même comportement que la desmine et la vimentine, car dans le cas de l'oursin ces protéines sont entièrement extraites à faible force ionique. De plus, nous ne pouvons pas les sédimenter à partir du surnageant d'extraction par centrifugation à haute vitesse.

Le muscle lisse d'oursin a donc été extrait directement dans une solution contenant du KCl 1M, selon la méthode de Geisler et Weber (134) utilisée aussi pour l'extraction de la desmine et de la vimentine de l'intestin du rat.

Dans la figure 8, nous pouvons comparer les profils électrophorétiques des muscles lisses de rat et d'oursin traités directement en solution de haute force ionique. Dans le cas du muscle du rat, le tissu extrait dans du KCl 1M, puis centrifugé à 20000 g contient la majorité des protéines de 54000-56000 daltons (figure 8., ligne d). Le surnageant d'extraction centrifugé ensuite à haute vitesse ne contient que des traces de ces protéines (figure 8., lignes b et c).

Par contre, quand le muscle d'oursin est homogénéisé directement en présence de KCl 1M, les protéines de 54000-56000 daltons sont extraites et ne sédimement pas à 20 000 g, comme le montre la figure 8. Nous observons sur cette figure (ligne j), que le résidu du tissu extrait, puis centrifugé à 20000 g ne contient plus les protéines en question. Celles-ci, contenues dans le surnageant 20000 g, ne sédimement que par centrifugation à 100000 g (figure 8., ligne h).

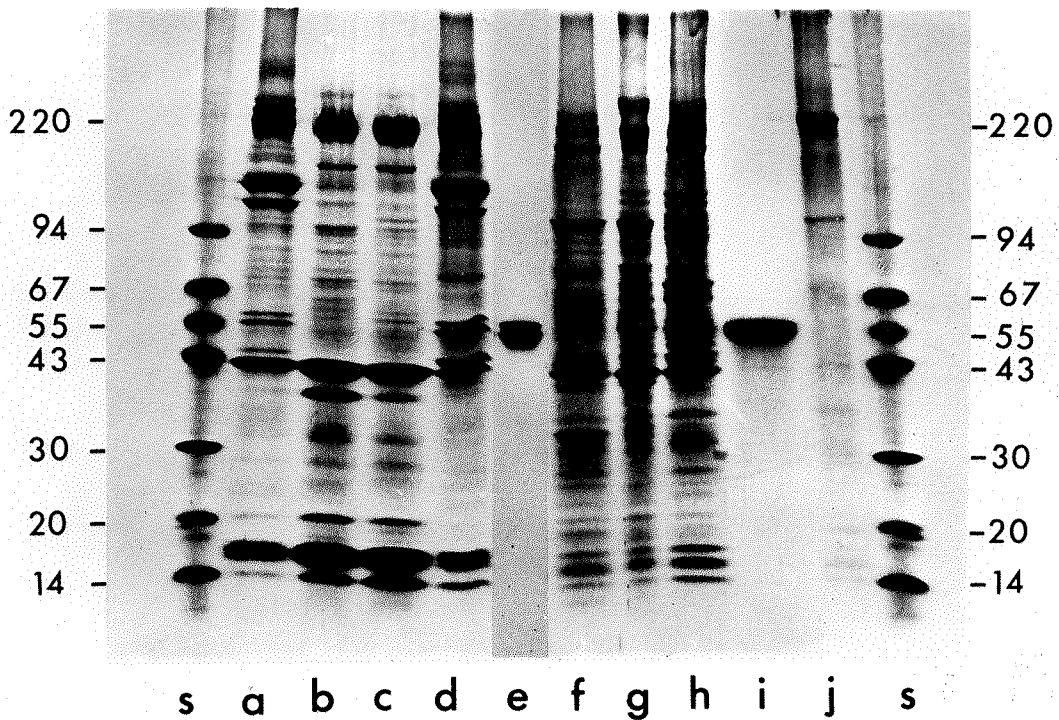


Figure 8. Electrophorèse en présence de SDS, en gradient de concentration d'acrylamide (5 - 20%) des protéines des muscles lisses de rat (a-e) et d'oursin (f-j), fractionnés dans du KCl 1M. (a,f) Protéines totales des muscles lisses; (b,g) surnageants 100000 g; (c,h) culot 100000g; (d,j) culots 20000 g; (e) desmine et vimentine isolées (14 µg); (i) protéines 54000-56000 daltons isolées (25 µg). Les fractions (a-d) correspondent à des dépôts de 80 µg; (s) étalons de poids moléculaire.

4.1 Extraction et isolement des protéines de 54000-56000 daltons à partir de la fraction insoluble dans KCl 1M, sédimentable à 100000 g

Nous avons essayé d'extraire ces protéines à partir du culot 100000 g par l'action soit de l'acide acétique 1M soit de l'urée 7M, en utilisant des procédures classiques pour les protéines du type filament intermédiaire.

L'acide acétique 1M, utilisé par Hubbard et Lazarides (133), s'est montré inefficace pour l'extraction. D'autre part, l'urée 7M, employée par Huiatt et col. (120) a provoqué la dégradation des protéines lors de son élimination par dialyse, malgré la présence des inhibiteurs de protéases.

L'extraction dans du SDS 1 % ; β -mercaptoéthanol 5 %, bouillant, est parmi les méthodes essayées la plus efficace, la température élevée étant indispensable pour inactiver les protéases. Les protéines ainsi extraites peuvent se conserver plusieurs mois à -30°C .

L'isolement des protéines de 54000-56000 daltons à partir de l'extrait SDS ; mercaptoéthanol est fait par électrophorèse préparative, comme décrit dans la section 5 du chapitre Matériels et Méthodes. Les protéines sont excisées du gel, extraites dans une solution d'urée 7M, contenant les inhibiteurs de protéases, dialysées contre tampon TRIS-HCl 10 mM, pH 8.0, pour éliminer l'urée, concentrées dans ce tampon puis précipitées dans l'acétone pour éliminer le SDS résiduel et le colorant. La poudre acétonique séchée, contenant les protéines est reprise en SDS 1 % ; β -mercaptoéthanol. Nous avons remarqué que les protéines isolées du gel ne sont plus dégradées lors de l'élimination de l'urée par dialyse dans du tampon TRIS-HCl 10 mM, pH 8.0 comme cela arrivait lors de l'extraction en urée à partir de la fraction insoluble dans du KCl et sédimentable à 100000 g. Ceci fait penser que la dégradation n'est pas due à des propriétés intrinsèques de ces molécules, mais plutôt à des enzymes protéolytiques présentes dans la préparation, auxquelles ces protéines sont particulièrement sensibles.

A partir de 10 ml de tissu tritoné (correspondant à 100 oursins) nous avons isolé 1,4 mg du doublet de 54000-56000 daltons. Le profil électrophorétique des protéines isolées est montré sur la figure 8, ligne i.

4.2 Identification immunologique des protéines de 54000-56000 daltons

La spécificité de l'antisérum dirigé contre les protéines de 54000-56000 daltons de l'intestin d'oursin, produit chez des lapins (comme décrit dans la section 7 du chapitre Matériels et Méthodes) a été testée sur filtre de nitrocellulose avec différentes fractions des muscles lisses de rat et d'oursin extraits à haute force ionique (figure 9).

La fraction extraite dans du KCl 1M à partir des cellules musculaires d'oursin perméabilisées, puis sédimentée à 100000 g, contient les protéines de 54000-56000 daltons, lesquelles ont été utilisées comme antigène. Cette fraction soumise au SDS-PAGE, puis transférée sur filtre de nitrocellulose et enfin incubée en présence de l'antisérum (comme décrit dans la section 7.2 du chapitre Matériels et Méthodes) montre une réaction positive spécifique au niveau des protéines de 54000-56000 daltons (figure 9, lignes a et a'). Grâce à la spécificité de cette réaction immunologique présentée par l'antisérum, nous avons estimé inutile la purification des immunoglobulines.

La réaction positive est également détectable pour les protéines isolées à partir du culot 100000 g (figure 9, lignes b et b'). Cependant, le résidu des cellules musculaires traité au KCl 1M puis sédimenté à 20000 g ne montre pas de réaction positive avec l'antisérum (figure 9, lignes c et c'). Ceci montre que dans nos conditions de traitement à haute force ionique, les protéines en question sont entièrement extraites. Les mêmes fractions incubées en présence du sérum préimmun à une dilution identique, ne présentent pas de réaction positive (résultats non montrés).

Le muscle lisse de rat fractionné selon la même procédure ne présente

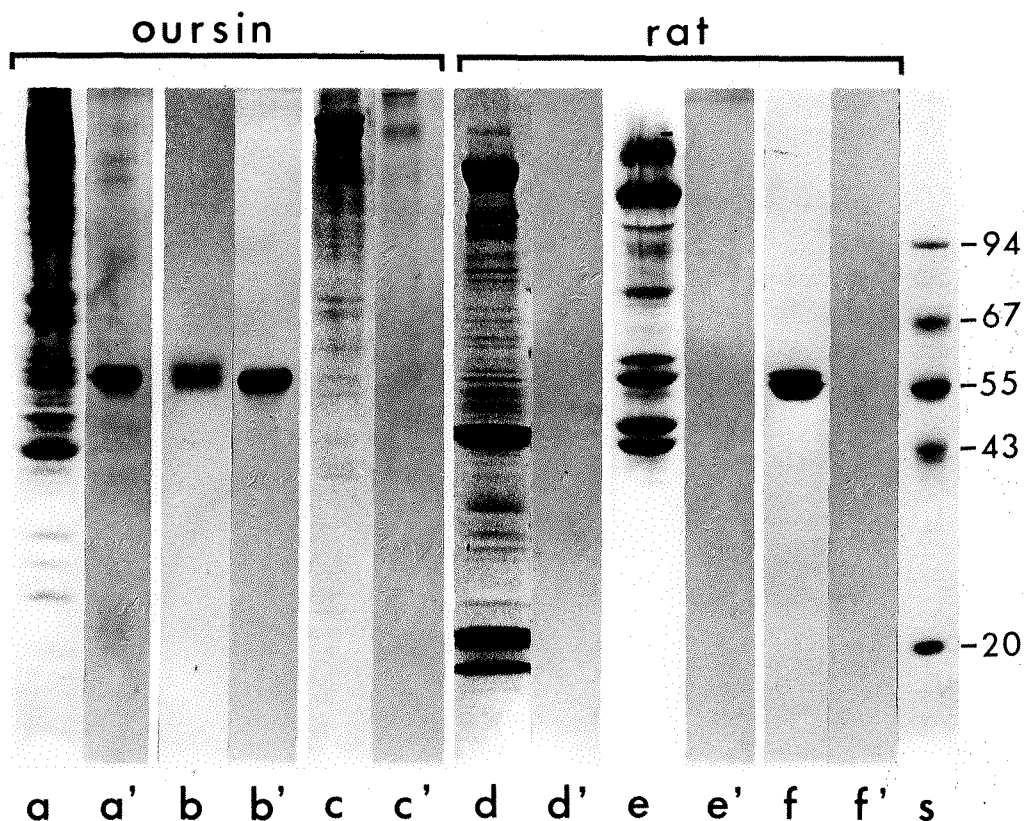


Figure 9. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (10%) en présence de SDS et réaction immunologique sur filtre de nitrocellulose avec l'anticorps dirigé contre le doublet de 54000-56000 daltons du muscle d'oursin.

(a,b,c) et (d,e,f) fractions protéiques des muscles d'oursin et de rat, respectivement; (s) étalons de poids moléculaires. Coloration au bleu de Coomassie. (a',b',c') et (d',e',f') réaction immunologique sur filtre de nitrocellulose des fractions décrites ci-dessus. (a,a') et (d,d') fractions insolubles au KCl 1 M et sédimentables à 100000 g; (b,b') protéines de 54000-56000 daltons isolées; (f,f') desmine et vimentine isolées; (c,c') et (e,e') fractions insolubles au KCl 1 M et sédimentables à 20000 g.

pas de réaction croisée en présence de l'antisérum (figure 9, lignes d et f'). Ce résultat suggère que dans le muscle lisse d'intestin de rat, fractionné à haute force ionique, il n'existe pas de protéines immunologiquement semblables à celles de 54000-56000 daltons isolées des cellules musculaires d'intestin d'oursin.

La qualité du transfert sur le filtre de nitrocellulose a été vérifiée par coloration du gel transféré, aussi bien que de la réplique du filtre de nitrocellulose (non montré), comme décrit au chapitre Matériels et Méthodes, sections 7.2.A et B.

4.3 Focalisation isoélectrique des protéines de 54000-56000 daltons

L'analyse par focalisation isoélectrique de la fraction insoluble dans du KCl 1M, sédimentable à 100000 g, révèle un groupe hétérogène de protéines de poids moléculaires entre 54000-56000 daltons constitué de plusieurs groupes d'isoformes (figure 10.A). Lorsque les protéines de 54000-56000 daltons, isolées par électrophorèse préparative, sont soumises à la focalisation isoélectrique, il en résulte un enrichissement des groupes d'isoformes plus basiques par rapport à ceux plus acides (figure 10.B). Pour des raisons inconnues, ces profils ne sont révélés que par coloration au nitrate d'argent. La méthode classique, qui emploie le bleu de Coomassie et qui donne de bons résultats pour ces mêmes protéines après l'électrophorèse monodimensionnelle, n'est pas capable de détecter la même quantité de matériel après focalisation isoélectrique.

4.4 Essai de polymérisation IN-VITRO des protéines de 54000-56000 daltons

Les protéines isolées par électrophorèse préparative ont subi des cycles de polymérisation in vitro dans des conditions décrites pour les protéines du type filament intermédiaire, c'est-à-dire, pH entre 7.0 et 8.0 en présence de sel (131) (comme décrit dans la section 6. du chapitre Matériels et Méthodes). Lorsqu'elles sont soumises à ces

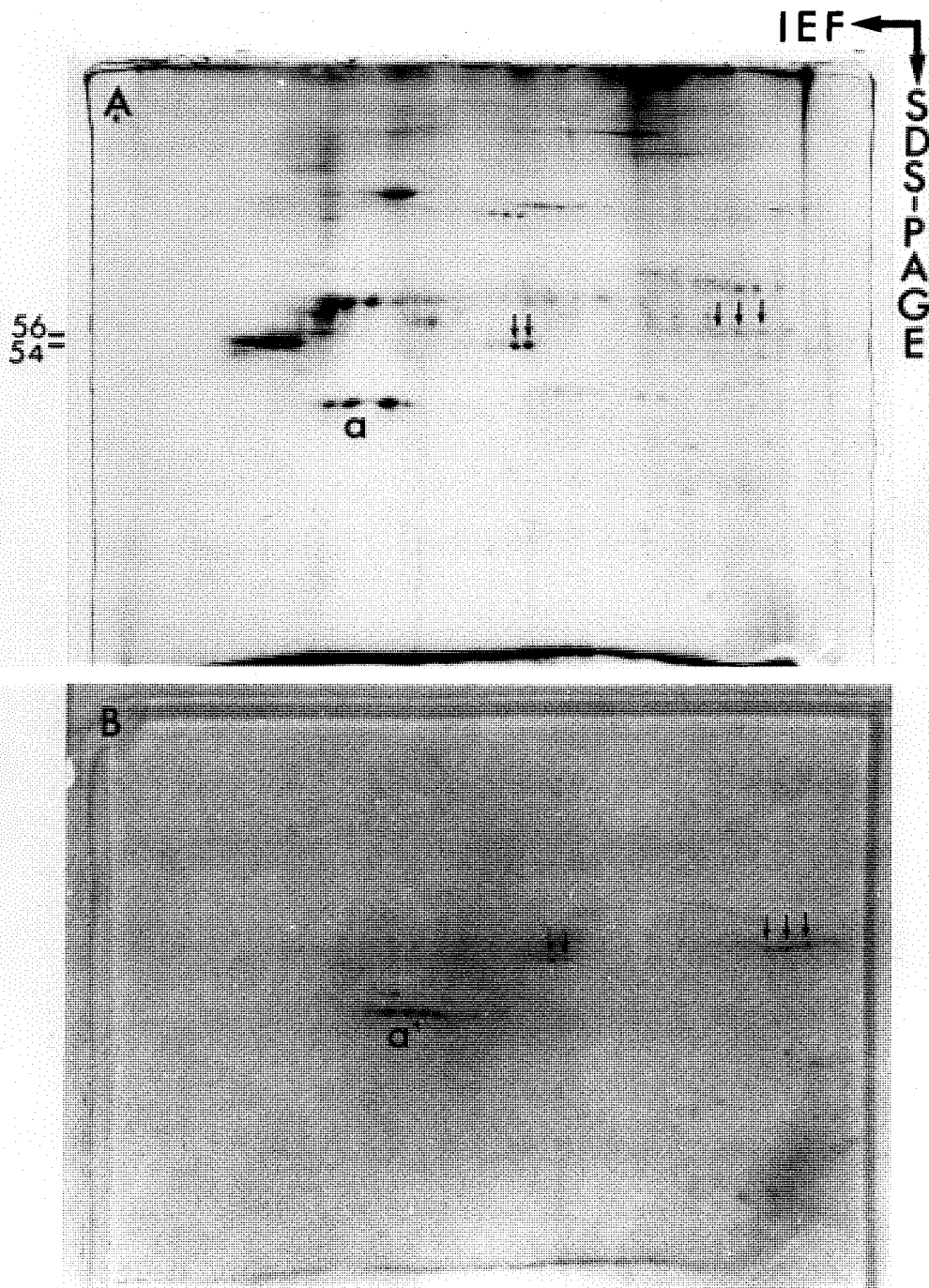


Figure 10. Electrophorèse bidimensionnelle de la fraction insoluble au KCl 1 M et sédimentable à 100000 g du muscle d'oursin (A), et des protéines de 54000-56000 daltons isolées (B). (a) actine endogène ; (a') actine du muscle squelettique de lapin. Les groupes d'isoformes sont signalés par de flèches. Coloration par le nitrate d'argent.

conditions de polymérisation, la desmine et la vimentine que nous avons isolées, forment des filaments de 10 nm de diamètre, flexibles, anastomosés, ayant l'aspect typique des filaments intermédiaires de différentes origines, comme nous pouvons l'observer dans la figure 11.a.

Par contre, les protéines de 54000-56000 daltons de l'oursin soumises soit aux conditions de polymérisation selon Huiatt et col. (120) pour la desmine et la vimentine, soit à celles décrites par Aebi et col. (41) (qui se déroulent à 4°C ou à température ambiante) ne sont pas capables de former des filaments. Au cours du deuxième cycle de polymérisation, ces protéines à une concentration de 500 µg/ml dans du tampon TRIS-HCl 10 mM, pH 8.0 ; EGTA 1mM ; β-mercaptoéthanol 10 mM, à 4°C, se présentent sous forme de structures globulaires ayant un diamètre variable entre 10 et 26 nm et sont dispersées de façon aléatoire sur le champ du microscope, comme nous pouvons l'observer dans la figure 11.b. L'addition d'une solution contenant du KCl concentré en présence ou non de tampon TRIS, de façon à obtenir une concentration finale de KCl 15 mM à pH 7.5 ou à pH 8.0, n'est pas capable de déclencher un processus de réorganisation des structures globulaires.

4.5 Localisation des protéines de 54000-56000 daltons dans le muscle lisse d'oursin par des méthodes immunocytochimiques

Des cellules musculaires perméabilisées, fraîches ou conservées dans du glycérol 50 % en solution II contenant du Triton X-100, obtenues comme décrit dans la section 7.3.A du chapitre Matériels et Méthodes, ont été utilisées pour des réactions d'immunofluorescence avec l'antisérum dirigé contre les protéines de 54000-56000 daltons de l'oursin. Les cellules perméabilisées obtenues en présence de concentrations croissantes de Triton X-100 se trouvent en état dit de rigueur à cause de la perméabilisation des membranes par l'action du détergent dans un milieu sans ATP et sans calcium (100).

Les cellules musculaires de rat et d'oursin soumises à la même procédure d'obtention présentent un aspect différent au microscope optique. Celles d'oursin sont allongées et fusiformes, tandis que celles

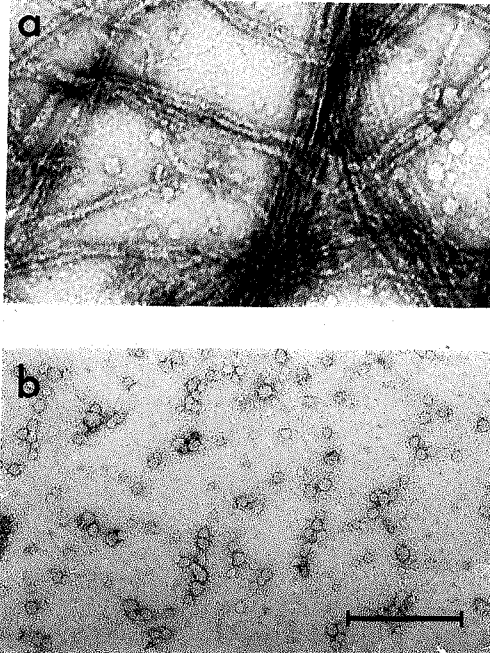


Figure 11. Ultrastructure des protéines de 54000-56000 daltons des muscles lisses de rat et d'oursin soumises à la polymérisation in vitro. (a) filaments formés par co-polymérisation de la desmine et de la vimentine de muscle lisse de rat; la microphotographie a été prise 60 minutes après l' addition de KCl 15 mM au tampon de polymérisation;

(b) particules globulaires obtenues par les protéines de 54000-56000 daltons d'oursin soumises aux mêmes conditions de co-polymérisation décrites ci-dessus. Ces particules globulaires sont observées avant ou après l'addition de KCl (60 minutes). Les échantillons ont été contrastés à l'acétate d'uranyle à 1%. Grossissement: X 75000. Bar = 0,2 μ m.

de rat sont courtes et arrondies comme nous pouvons l'observer sur les figures 12 et 13. Small (96) avait déjà remarqué que les cellules musculaires d'intestin grêle et de vas deferens de cochon d'Inde se présentent aussi sous une forme très courte et arrondie quand elles sont isolées par une digestion enzymatique assez longue, tandis que celles de gésier de poulet soumises au même traitement présentent un aspect fusiforme.

Les cellules musculaires de rat, étant fortement accrochées sur le tissu connectif, nous obligent à homogénéiser rapidement le muscle avec un ULTRA-TURRAX, afin d'avoir une suspension de cellules musculaires. Cette procédure, utilisée aussi par Granger et Lazarides (125) pour isoler des cellules musculaires de gésier de poulet, produit un pourcentage de cellules endommagées, mais il reste une quantité suffisante de cellules musculaires intactes en suspension sur lesquelles nous pouvons mener l'expérience.

Dans le cas de l'oursin, des aspirations mécaniques répétées à l'aide d'une pipette Pasteur, sont suffisantes pour libérer la quantité nécessaire de cellules musculaires. Ces cellules incubées en présence de différentes dilutions de l'antisérum, puis de l'anti IgG couplé au FITC, présentent une réaction positive sur la périphérie de la cellule (présentant parfois des points brillants sur les bords) lorsqu'elles sont observées en épifluorescence. A l'intérieur, le cytoplasme moins fluorescent apparaît à peu près homogène (figure 12.a et b).

Les cellules musculaires isolées, immergées pendant 5 minutes dans du PBS contenant du KCl 0,6 M pour extraire les protéines contractiles, possèdent une apparence très peu contrastée au microscope optique (figure 12.c). Ces cellules musculaires ainsi extraites, appelées fantômes par Small et Sobieszek (100), présentent une fluorescence hétérogène et plus nette à l'intérieur du cytoplasme, comme cela se voit sur la figure 12.d. Les points brillants sur les bords de la cellule sont encore visibles. Les cellules incubées en présence du sérum préimmun aux mêmes dilutions, ne sont pas fluorescentes (figure 12.f). Des structures rondes, fluorescentes, qui sont parfois proches des cellules, constituent des débris de la préparation.

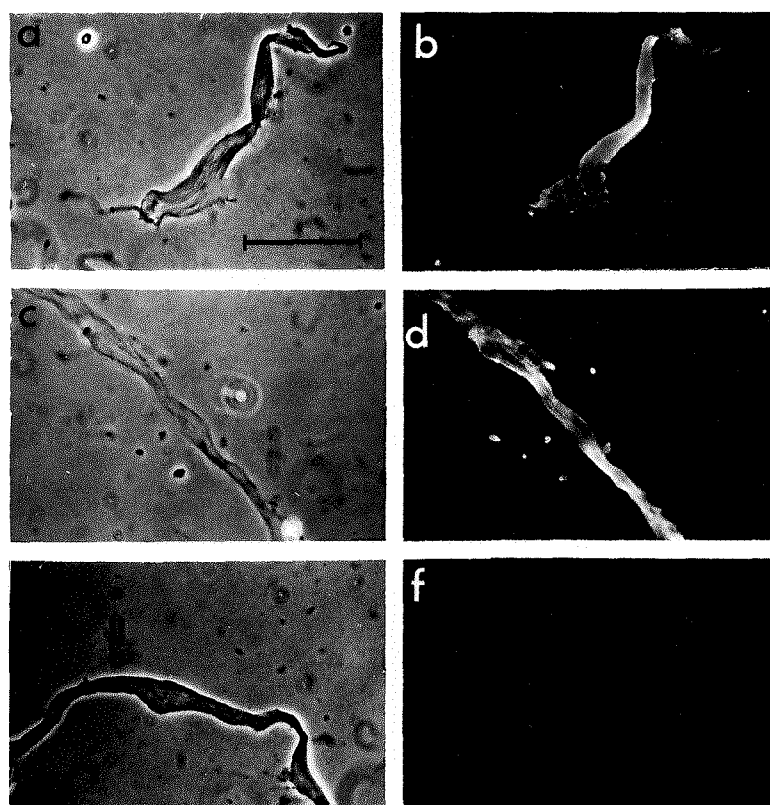


Figure 12. Microscopie en contraste de phase et immunofluorescence indirecte sur des cellules isolées du muscle lisse d'oursin. (a) Contraste de phase et (b) immunofluorescence des cellules incubées avec l'antisérum (1:100) dirigé contre les protéines de 54000-56000 daltons, puis incubés avec l'anti IgG de lapin, couplé à la FITC. (c) Contraste de phase et (d) immunofluorescence des cellules extraites au préalable par le KCl 0,6 M, puis incubées avec l'antisérum comme décrit ci-dessus. (e) Contraste de phase et (f) immunofluorescence des cellules incubées avec le sérum pré-immun (1:100), puis incubés avec l'anti IgG de lapin couplé à la FITC. Bar = 25 μ m.

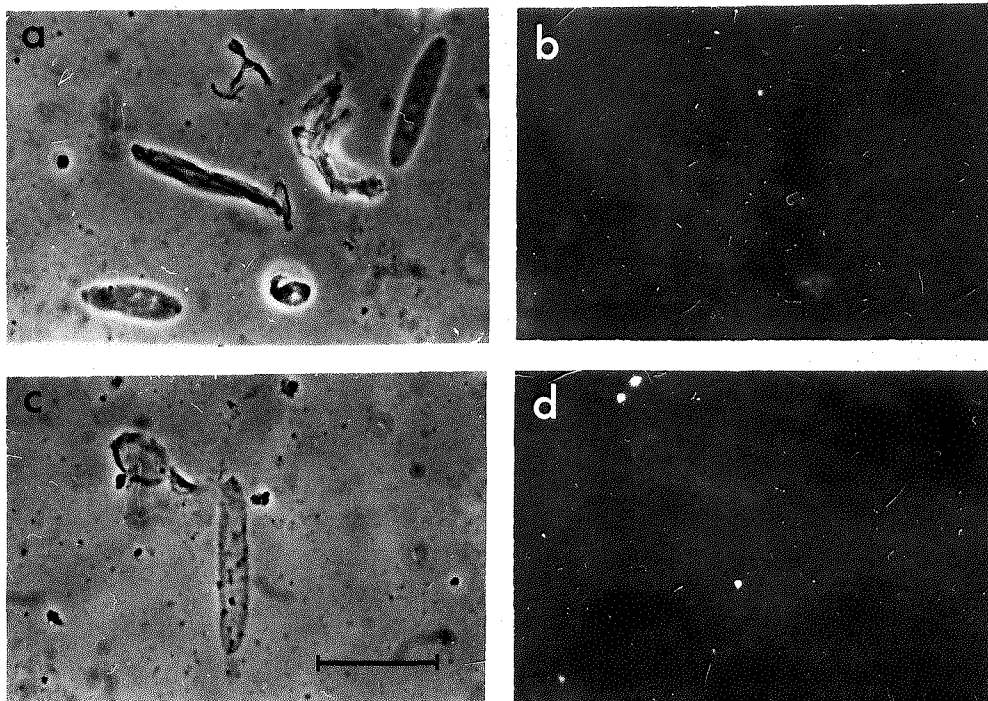


Figure 13. Microscopie en contraste de phase et immunofluorescence indirecte sur des cellules isolées de muscle lisse de rat. (a) Contraste de phase et (b) immunofluorescence des cellules incubées avec l'antisérum (1:100) dirigé contre les protéines de 54000-56000 daltons, puis incubées avec l'anti IgG de lapin, couplé à la FITC. (c) Contraste de phase et (d) immunofluorescence des cellules extraites au préalable par le KCl 0,6 M, puis incubées avec l'antisérum (1:100), comme décrit ci-dessus. Bar = 25 μ m.

Les cellules musculaires isolées de rat puis incubées avec les mêmes dilutions de l'antisérum ne présentent pas de réaction positive, même après l'extraction des protéines contractiles, comme l'indique la figure 13.

L'étude ultrastructurale sur coupes ultrafines du muscle lisse d'oursin, préfixé dans un milieu glutaraldéhyde-paraformaldéhyde (section 9 du chapitre Matériels et Méthodes) immédiatement après dissection, présente une organisation typique des filaments contractiles des muscles lisses, décrite par Heumann (137) dans l'intestin grêle du rat et du muscle lisse de Mytillus edulis.

Sur des coupes longitudinales de muscle préfixé (figure 14.a) nous pouvons observer des faisceaux de filaments de différents diamètres. Sur des coupes transversales (partie supérieure de la même figure) des filaments épais de 18 nm de diamètre sont identifiés, ainsi que des filaments d'actine d'un diamètre de l'ordre de 6-7 nm.

Le muscle perméabilisé par le Triton X-100 obtenu comme décrit dans la section 4.4 du chapitre Matériels et Méthodes, puis incubé en présence de HMM (Matériels et Méthodes, section 8) montre une décoration typique en pointe de flèche, résultant de l'interaction de la méromyosine lourde avec les filaments d'actine distribués à l'intérieur du cytoplasme (figure 14.b).

Des études ultrastructurales in situ de différents muscles lisses de vertébrés utilisant différentes procédures de fixation (99), aussi bien que des études sur muscle lisse tritonné (100), montrent la présence de filaments de 10 nm de diamètre, identifiés par leur taille et leur profil non rectiligne bien défini. Ces filaments sont distribués de façon désordonnée entre les faisceaux de filaments contractiles.

Small et Sobieszek (100) ont observé sur des fantômes de muscle lisse d'intestin grêle de cochon d'Inde, extraits à faible et haute force ionique, la présence d'un réseau de filaments de 10 nm de diamètre, visibles en microscopie électronique.

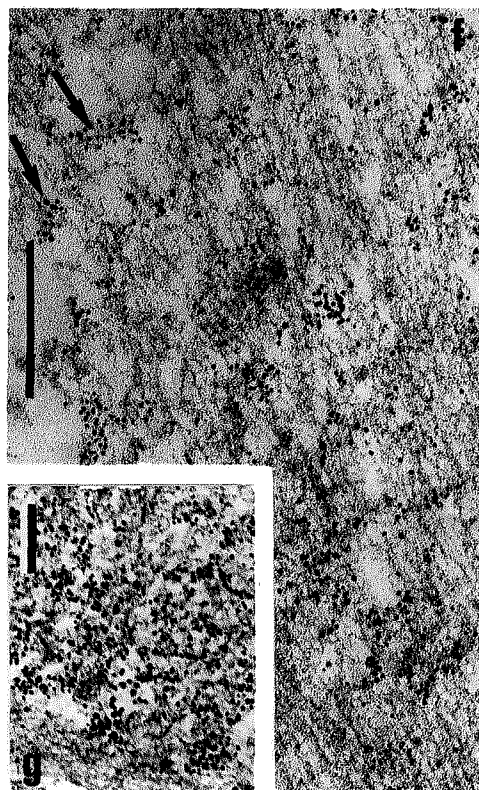
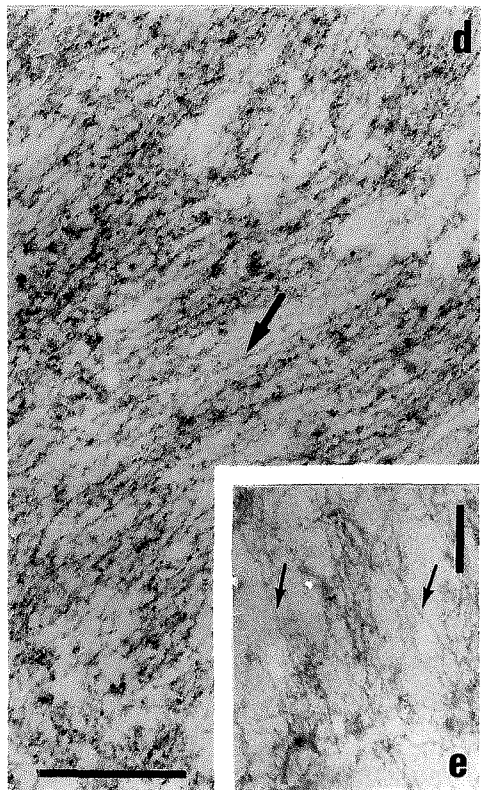
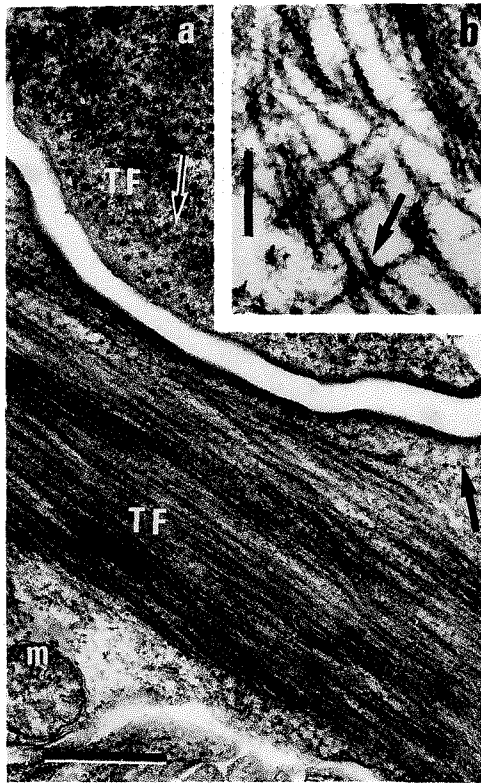
Figure 14. Microscopie électronique et immunocytochimie à l'or colloïdal sur le muscle lisse d'intestin d'oursin. A l'exception de (a), toutes les microphotographies ont été prises sur des tissus perméabilisés par le Triton X-100:

(a) coupe ultra-fine longitudinale et transversale (partie supérieure) montrant les filaments épais de 18 nm (TF) et les filaments d'actine (flèche); (b) filaments d'actine décorés par la HMM (flèche); (c) le tissu tritonné a été incubé avec l'antisérum (dilué 1:100) dirigé contre les protéines de 54000-56000 daltons du muscle d'oursin, puis incubé avec l'anti IgG de lapin couplé à des particules d'or colloïdal (5 nm); la décoration des filaments de 3-4 nm par les particules d'or colloïdal est indiquée par de flèches; (e) le tissu a été soumis à la même extraction que en (d), puis incubé avec la HMM; les filaments de 3-4 nm sont visibles, mais aucun marquage n'est détectable; (f) et (g) coupes ultra-fines du tissu extrait par le KCl 0,6 M, comme en (d) et (e), puis incubé avec l'antisérum comme en (c): les filaments de 3-4 nm sont marqués par des particules d'or colloïdal (flèche); (f) et (g) sont des coupes ultra-fines longitudinale et transversale, respectivement.

Bar: a, b = 0,5 μ m; c, d, e, f, g = 0,2 μ m.

(a) X 28000; (b) X 44000; (c) X 100000; (d) et (e) X 75000;

(f) et (g) X 78000.



Cependant, en utilisant la même méthode, nous n'avons pas pu mettre en évidence de filaments de 10 nm de diamètre ni sur des cellules musculaires tritonnées, ni sur des fantômes extraits dans du KCl 0,6 M, préparés comme décrit dans la section 7.4 du chapitre Matériels et Méthodes. Par contre, nous mettons en évidence dans ces fantômes de cellules musculaires d'oursin, la présence d'un réseau de filaments fins de 3-4 nm de diamètre, anastomosés, formant une espèce de maille à l'intérieur du cytoplasme et rendu visible après l'extraction des protéines contractiles, comme le montre la figure 14.d.

Lors du traitement du tissu tritonné en immunocytochimie à l'or colloïdal, en utilisant comme premier anticorps l'antisérum contre les protéines de 54000-56000 daltons (Matériels et Méthodes, section 7.4) nous observons un faible marquage sur les bords des cellules, comme cela se distingue sur la figure 14.c. Toutefois, le même traitement effectué sur le muscle extrait dans du KCl 0,6 M montre un marquage intense sur les filaments de 3-4 nm exposés après l'extraction des protéines contractiles, comme montré dans la figure 14 f et g.

Parallèlement, ce réseau de filaments fins n'est pas capable d'interagir avec la HMM, ce qui montre qu'il n'est pas constitué de filaments d'actine résiduels (figure 14.e).

Ces résultats d'immunocytochimie à l'or colloïdal sont en accord avec ceux obtenus par les expériences d'immunofluorescence décrites auparavant, quand nous observions un marquage intense sur les bords des cellules tritonnées, puis plus net à l'intérieur des cellules extraites dans du KCl 0,6 M.

Nos résultats expérimentaux suggèrent donc que les protéines de 54000-56000 daltons constituent une nouvelle catégorie de protéines associées aux filaments de 3-4 nm de diamètre, que nous avons mis en évidence dans les cellules musculaires lisses d'oursin in vivo.

5. DISCUSSION

L'étude ultrastructurale que nous venons de présenter montre que l'organisation des filaments contractiles dans le muscle lisse d'intestin d'oursin est très proche de celle décrite pour les muscles lisses de vertébrés (138). Toutefois, le muscle lisse d'oursin ne présente pas de filaments intermédiaires (100) et un nouveau réseau cytosquelettique est par contre révélé. Cette organisation est constituée de filaments de 3-4 nm de diamètre, que nous appellerons échinonématique.

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide montre des analogies entre les protéines des muscles lisses de rat et d'oursin, surtout au niveau de la myosine, de l'actine et dans la région des protéines ayant un poids moléculaire apparent de 54000-56000 daltons. C'est à ce niveau que devraient se trouver les protéines des filaments intermédiaires, comme la desmine (54000 daltons) ou la vimentine (56000 daltons).

La desmine et la vimentine ont été co-isolées à partir de la fraction insoluble à haute force ionique du muscle lisse de rat. Leur identité a été déterminée par leur profil en électrophorèse bidimensionnelle et par la formation de filaments de 10 nm in vitro (131).

Nous avons co-isolé, à partir de la fraction insoluble à haute force ionique du muscle lisse d'oursin, des protéines de poids moléculaires apparents de 54000-56000 daltons, dont la mobilité par électrophorèse bidimensionnelle diffère de celle de la desmine et de la vimentine. Les protéines co-isolées d'oursin ne sont pas capables de former des filaments de 10 nm quand elles sont soumises aux mêmes conditions de polymérisation que celles décrites pour la desmine et la vimentine.

Ces différences ont été confirmées immunologiquement par l'absence de réaction croisée, soit sur filtre de nitrocellulose, soit par immunofluorescence indirecte en utilisant l'antisérum dirigé contre le doublet de l'oursin.

La présence des protéines de 54000-56000 daltons dans le cytoplasme

des cellules du muscle lisse d'oursin a été démontrée par immunofluorescence indirecte ; toutefois, leur organisation in vivo n'a pas pu être révélée par cette méthode. Cependant, il a été démontré par immunocytochimie à l'or colloïdal que les filaments de 3-4 nm semblent être les structures spécifiquement décorées par l'anticorps.

Il est important de noter que l'augmentation de l'accessibilité des filaments d'échinonématique, par extraction des protéines contractiles dans du KCl 0,6 M, est corrélée à l'augmentation du marquage par les anticorps dans les cellules perméabilisées. Ces résultats suggèrent que les protéines de 54000-56000 daltons doivent être des constituants des filaments d'échinonématique.

Toutefois, comme ces deux protéines ne forment pas de filaments in vitro, il est possible que quelques facteurs importants pour la reconstitution des filaments in vitro soient absents, ou que ces protéines ne soient pas capables de renaturer dans les conditions de polymérisation utilisées. Ces deux possibilités ne sont pas mutuellement exclusives et la suite du travail en cours dans notre laboratoire apportera une réponse à cette question.

Les ressemblances qui paraissent exister entre les filaments d'échinonématique et les filaments de tektine doivent être soulignées. Ces derniers sont des filaments de 2-3 nm de diamètre, associés aux microtubules flagellaires de spermatozoïdes d'oursin (82,139). Les filaments de tektine sont insolubles à haute force ionique et semblent être constitués par des protéines de poids moléculaires apparents 47, 51 et 55 kdaltons (82,139). Toutefois, contrairement à l'échinonématique les filaments de tektine se trouvent in situ sous forme de ruban de l'ordre de 10 nm de diamètre (82).

Une autre catégorie analogue de filaments de 2-4 nm a été révélée dans la cytomatrice de l'oeuf d'oursin (88) et également en association avec des microtubules dans l'appareil mitotique (140).

Linck (139) a suggéré que les filaments de tektine dans le flagelle de spermatozoïdes d'oursin semblent remplir le même rôle que celui

attribué aux filaments intermédiaires en ce qui concerne leur association avec les microtubules.

Par analogie il paraît probable que dans le muscle lisse d'oursin, les filaments d'échinonématine doivent remplir un rôle similaire à celui joué par les filaments intermédiaires dans le muscle lisse des vertébrés.

CHAPITRE IV

LE CYTOSQUELETTE DE L'OEUF D'OURSIN NON FECONDE

1. OBTENTION DE LA CYTOMATRICE DE L'OEUF D'OURSIN NON FECONDE ET FRACTIONNEMENT DES PROTEINES A HAUTE FORCE IONIQUE
2. IDENTIFICATION IMMUNOLOGIQUE DES PROTEINES DE 54000-56000 DALTONS DE LA CYTOMATRICE DE L'OEUF NON FECONDE
3. ETUDE COMPARATIVE ENTRE LES PROTEINES DE 54000-56000 DALTONS DE L'OEUF ET CELLES DU MUSCLE LISSE D'OURSIN
4. IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE AU COURS DU CYCLE MITOTIQUE
5. ULTRASTRUCTURE ET IMMUNOCYTOCHIMIE A L'OR COLLOIDAL
6. DISCUSSION

L'oeuf d'oursin non fécondé se présente sous forme d'une cellule sphérique de diamètre moyen de 90 μm , ayant une membrane plasmique et une couche vitelline de nature glycoprotéique. Cette cellule est entourée d'une épaisse couche gélatineuse. Le cytoplasme de l'oeuf d'oursin est constitué de deux régions distinctes : une région plus interne appelée endoplasme et une région périphérique appelée ectoplasme ou cortex. Le cortex occupe une zone de 3 μm d'épaisseur à partir du bord de la cellule, vers l'intérieur.

Nous avons isolé pour la première fois la cytomatrice de l'oeuf non fécondé de P. lividus, en utilisant un milieu de lyse contenant de l'hexylène glycol 1M et du Triton X-100 1 % (118). Cette cytomatrice observée à l'aide du microscope électronique montre la présence d'un réseau de filaments de 3-4 nm dans sa région corticale ; par contre nous n'avons trouvé ni microtubules, ni filaments de 10 nm, ni faisceaux de microfilaments.

Dans ce chapitre, nous présentons des études biochimiques et immunocytochimiques réalisées sur la cytomatrice de l'oeuf non fécondé. Notre objectif est de vérifier la présence de protéines du type échinonématine dans l'oeuf d'oursin et leur éventuelle association aux filaments de 3-4 nm de la cytomatrice.

Les résultats présentés montrent que les protéines de 54000-56000 daltons du muscle lisse d'oursin sont pré-existantes dans l'oeuf non activé et qu'apparemment ces protéines sont associées aux filaments corticaux de 3-4 nm.

1. OBTENTION DE LA CYTOMATRICE DE L'OEUF D'OURSIN NON FECONDE ET FRACTIONNEMENT DES PROTEINES A HAUTE FORCE IONIQUE

Il a été démontré par Coffe et col. (118) que les oeufs de P. lividus activés parthénogénétiquement par des bases faibles comme la procaine à la concentration de 2,5 mM ou le NH_4Cl 10 mM, présentent des cycles de résistance du cytoplasme vis-à-vis du traitement dans le milieu de lyse contenant de l'hexylène glycol 1M et du Triton 1%. Ces structures résistantes ont été isolées par homogénéisation à l'aide du Vortex, pendant une minute dans le milieu hexylène glycol/Triton. Ces structures cytoplasmiques contiennent des cables de filaments d'actine et des microtubules dans leur région corticale et sous-corticale, ainsi qu'un réseau de filaments de 3 nm de diamètre non décorés par la HMM dans une région plus interne (88). La cohésion du cytoplasme de ces structures est attribuée à la présence des microfilaments et des microtubules.

En ce qui concerne les oeufs non activés, le traitement par le milieu de lyse contenant de l'hexylène glycol/Triton (comme décrit dans la section 4.3 du chapitre Matériels et Méthodes), suivi d'homogénéisation à l'aide du Vortex, pendant une minute, ne permet d'isoler que des fragments cytoplasmiques. Par contre, quand le traitement dans ce milieu de lyse est fait par faible agitation manuelle, nous isolons une matrice cytoplasmique. Cette cytomatrice est une structure fragile d'environ 90 μm de diamètre ayant l'aspect d'un oeuf entier privé de sa membrane, comme nous pouvons l'observer en microscopie optique par contraste de phase (figure 15).

Les cytomatrices isolées à partir de 1 ml d'oeufs sédimentés correspondent à 12 mg de protéines (13% des protéines totales de l'oeuf). Nous avons fractionné les protéines de cette cytomatrice selon leur insolubilité vis à vis du KCl 1M, comme décrit dans la section 4.6 du chapitre Matériels et Méthodes. Le profil électrophorétique des fractions résultantes de ce traitement est représenté dans la figure 16.A. La cytomatrice isolée par le traitement hexylène glycol/Triton X-100, puis extraite par le SDS ; β -mercaptoéthanol bouillant (figure 16.A, ligne a) présente en électrophorèse plusieurs bandes de différents

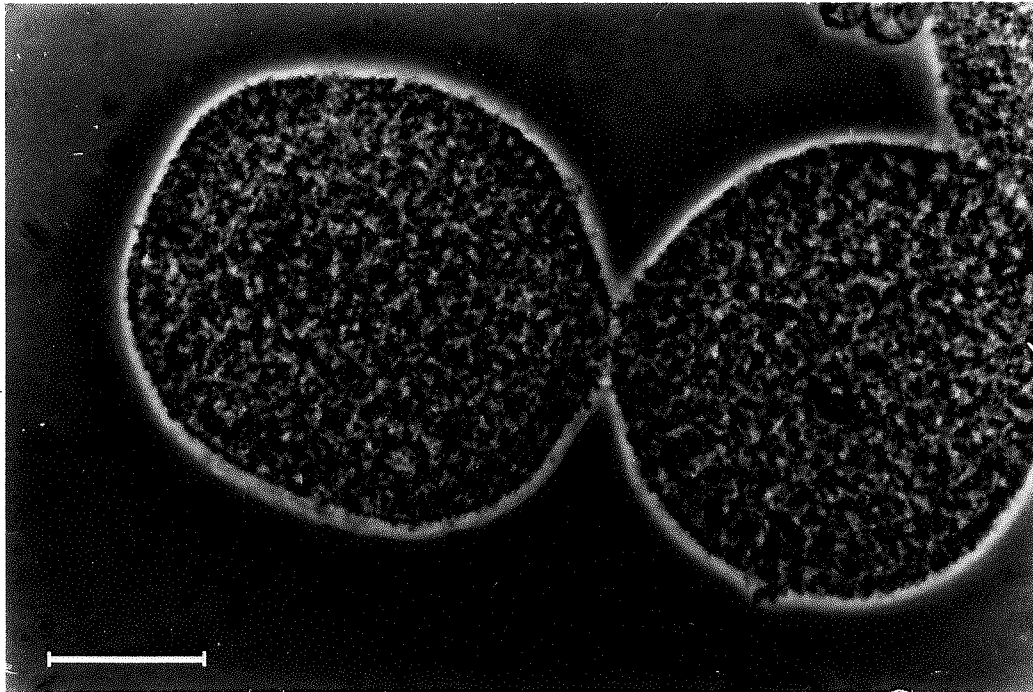


Figure 15. Microscopie optique en contraste de phase de la cytomatrice résistante au traitement hexylène glycol / Triton X-100, isolée de l'oeuf d'oursin non fécondé. Bar = 32 μ .

poids moléculaires. Parmi les bandes majoritaires nous en trouvons une de poids moléculaire apparent de 220000 daltons, une autre de 94000 daltons et enfin d'autres de 54000-56000, de 50000 et de 43000 daltons. Lors du fractionnement des protéines de la cytomatrice par traitement à haute force ionique, la majorité (60 %) des protéines est extraite. La fraction insoluble dans le KCl 1M et sédimentable à 20000 g correspond à 40 % des protéines de la cytomatrice. Les bandes protéiques majoritaires de cette fraction insoluble dans le KCl correspondent à des poids moléculaires apparents de 54000-56000 et de 50000 daltons, ainsi qu'à des bandes de poids moléculaires situés au-dessous de 43000 daltons (figure 16.B, ligne a). Lorsque le surnageant de centrifugation à 20000 g est recentrifugé pendant deux heures à 100000 g (figure 16.A, lignes b et c), la fraction sédimentable à haute vitesse correspond à 50 % des protéines extraites par le KCl. Les protéines majoritaires du culot 100000 g correspondent aux poids moléculaires apparents de 54000-56000, 50000, 43000 daltons, ainsi qu'à des poids moléculaires inférieurs à 43000 daltons.

2. IDENTIFICATION IMMUNOLOGIQUE DES PROTEINES DE 54000-56000 DALTONS DE LA CYTOMATRICE DE L'OEUF NON FECONDE

Les protéines de la cytomatrice et les différentes fractions résultantes du traitement à haute force ionique ont été, après électrophorèse, transférées et incubées sur filtre de nitrocellulose en présence de l'antisérum contre les protéines de 54000-56000 daltons du muscle lisse d'oursin (section 7.2 du chapitre Matériels et Méthodes).

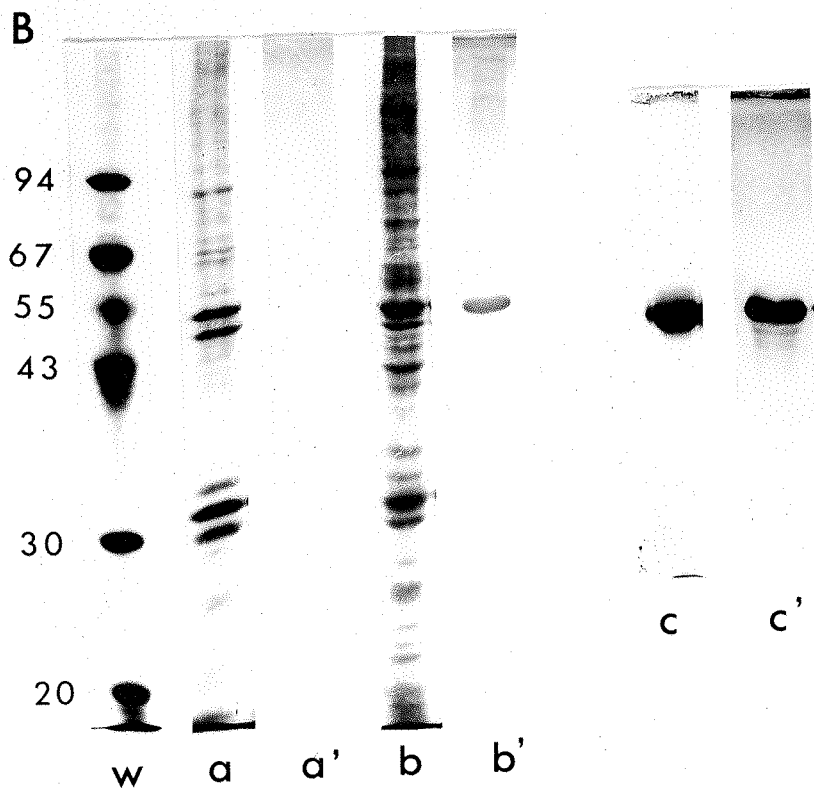
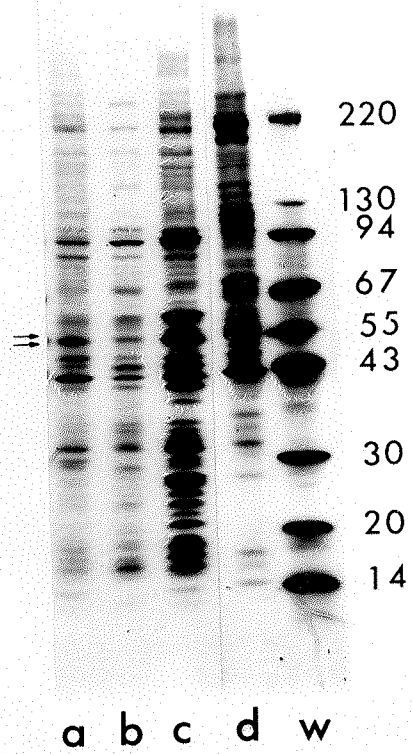
Nous observons que la cytomatrice présente une réaction croisée avec l'antisérum au niveau des bandes de poids moléculaire apparent de 54000-56000 daltons (non montré). La fraction insoluble dans le KCl 1M, sédimentable à 20000 g ne présente pas de réaction croisée (figure 16.B, lignes a et a'). Par contre, le culot 100000 g présente une réaction croisée au niveau des protéines de poids moléculaires apparents de 54000-56000 daltons (figure 16.B, lignes b et b'). Les protéines de 54000-56000 daltons isolées à partir du culot 100000 g, comme décrit

Figure 16. (A) Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) en gradient de concentration d'acrylamide (5-20%) des fractions de la cytomatrice extraite par le KCl 1 M (a-c) et de la fraction insoluble dans le KCl et sédimentable à 100000 g du muscle d'oursin (d).

(a) protéines totales de la cytomatrice (20 μ g); (b) surnageant de centrifugation à 100000g (20 μ g); (c) fraction sédimentable à 100000 g (60 μ g). Le gel surchargé permet d'identifier l'existence d'un doublet de 54000-56000 daltons; (w) étalons de poids moléculaires. Les flèches indiquent le doublet de 54000-56000 daltons. Coloration par le bleu de Coomassie.

(B) SDS-PAGE des fractions de la cytomatrice extraites par le KCl 1 M (a,b,c) et réaction immunologique sur filtre de nitrocellulose de ces fractions (a', b',c').

(a) fraction insoluble et sédimentable à 20000 g; (b) fraction insoluble et sédimentable à 100000 g; (c) protéines de 54000-56000 daltons isolées à partir de (b). Les fractions transférées sur filtre de nitrocellulose ont été incubées avec l'antiserum (dilué au 1:100) dirigé contre le doublet de 54000-56000 daltons du muscle d'oursin, puis incubées avec l'anti IgG de lapin couplé à la peroxidase et révélées au DAB. Les gels en SDS-PAGE ont été colorés au bleu de Coomassie.



plus loin, présentent aussi une réaction croisée avec l'anticorps (figure 16.B, lignes c et c'). Ces résultats montrent que les protéines de la cytomatrice qui donnent réaction croisée avec l'anti 54000-56000 daltons du muscle lisse d'oursin présentent le même poids moléculaire apparent que celles du muscle et le même comportement vis-à-vis du traitement par le KCl 1M.

3. ETUDE COMPARATIVE ENTRE LES PROTEINES DE 54000-56000 DALTONS DE L'OEUF ET CELLES DU MUSCLE LISSE D' OURSIN

Les protéines de 54000-56000 daltons ont été extraites par le SDS 1 % ; 5 % β -mercaptoéthanol 5 %, bouillant, à partir de la fraction sédimentable à 100 000 g. Ces protéines ont été isolées à partir de l'extrait SDS ; β -mercaptoéthanol par électrophorèse préparative, comme décrit dans la section 5. du chapitre Matériels et Méthodes. A partir de 10 ml de cytomatrice (14 ml d'oeufs), nous avons isolé 2,4 mg du doublet de 54000-56000 daltons. Le profil électrophorétique des protéines isolées est montré dans la figure 16.B, ligne c.

L'analyse par IEF de la fraction insoluble dans le KCl 1M, sédimentable à 100000 g montre au niveau des protéines de 54000-56000 daltons de l'oeuf un profil très proche de celui de la même fraction obtenue à partir du muscle lisse d'oursin. Nous identifions dans les deux cas la présence de groupes de polypeptides de poids moléculaires entre 54000 et 56000 daltons, distribués de façon semblable entre les pH 5 et 7, comme représenté sur la figure 17.A (comparer avec la figure 10.A du chapitre précédent). Dans le culot 100000 g de l'oeuf, le groupe d'isoformes les plus basiques est difficilement visible, même par coloration, au nitrate d'argent. Lorsque les protéines de 54000-56000 daltons isolées de la cytomatrice de l'oeuf sont soumises à la focalisation isoélectrique, nous observons la présence d'un composant acide majoritaire par rapport aux deux groupes d'isoformes plus basiques. Cependant, les groupes d'isoformes plus basiques présentent des points isoélectriques très proches de ceux des protéines de 54000-56000 daltons du muscle. Quand le gel est surchargé nous pouvons mieux observer la présence de ces composants basiques (figure 17.B).

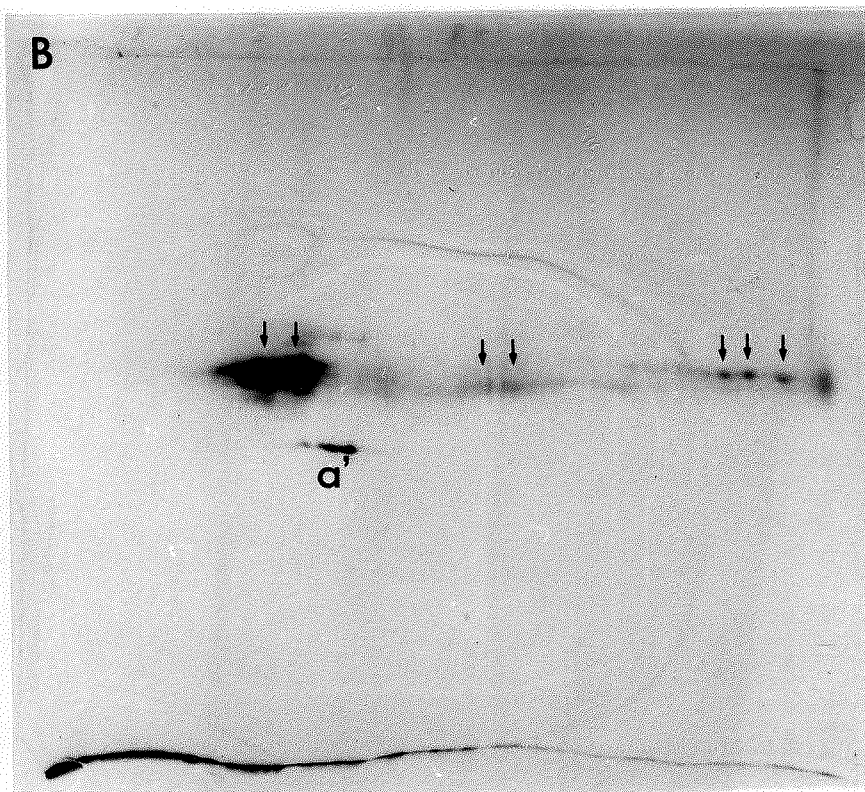
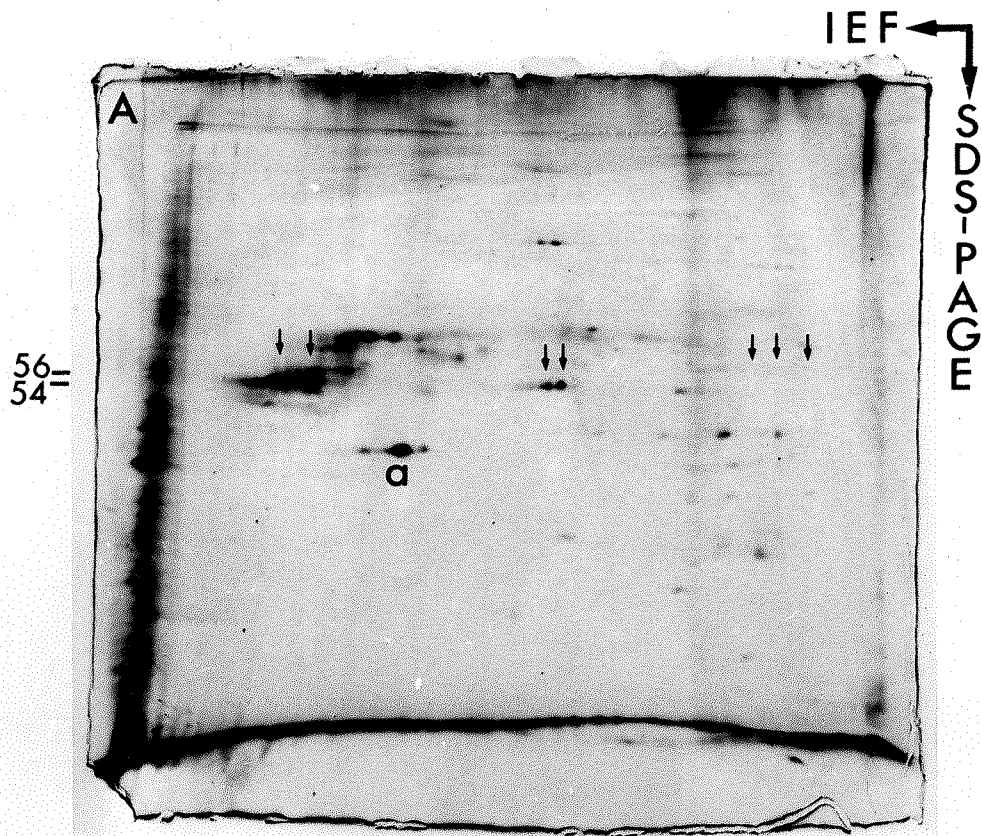


Figure 17. Electrophorèse bidimensionnelle de la fraction insoluble au KCl 1 M et sédimentable à 100000g, de la cytomatrice de l'oeuf non activé (A), et des protéines de 54000-56000 daltons isolées (B). (a) actine endogène; (a') actine du muscle squelettique de lapin. Les groupes d'isoformes sont signalés par des flèches. Coloration par le nitrate d'argent.

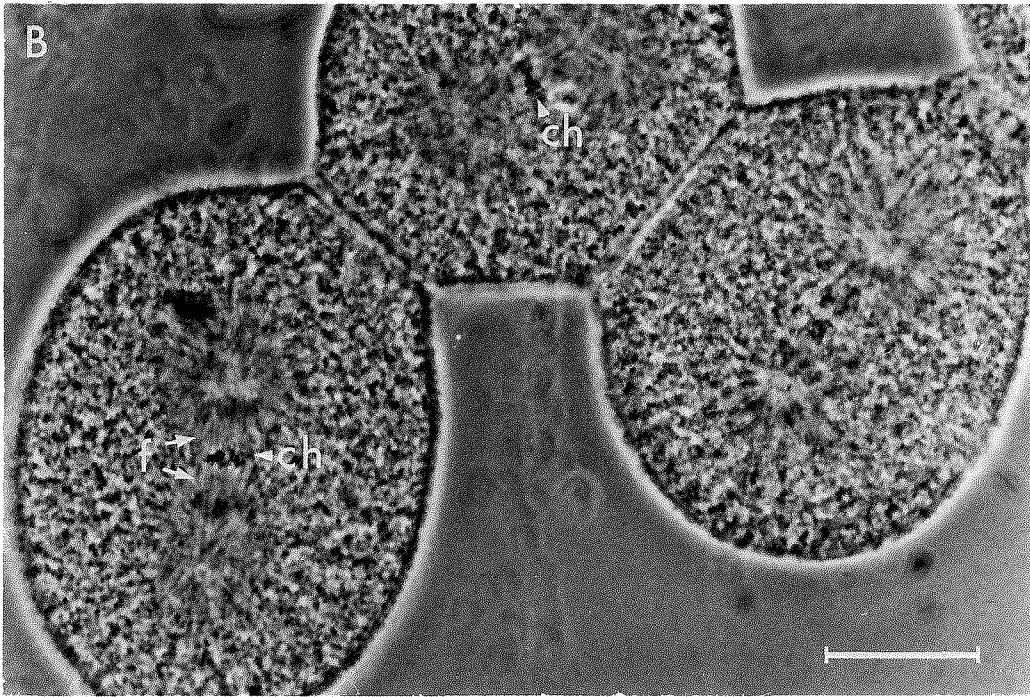
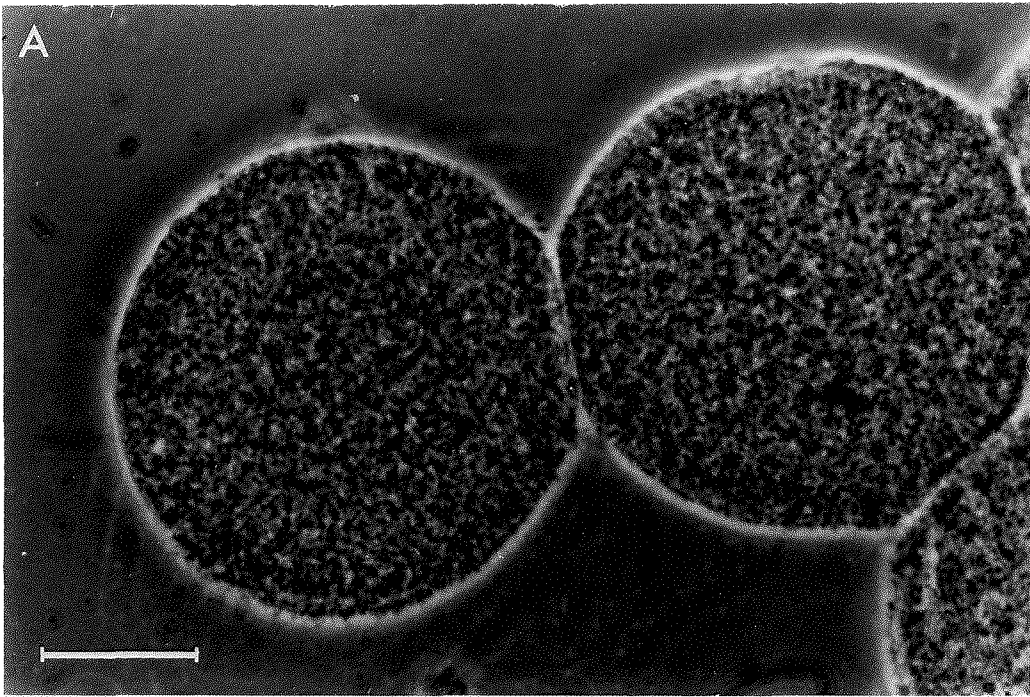
Un autre point en commun entre les protéines isolées du muscle lisse d'oursin et celles isolées de l'oeuf est le comportement vis-à-vis de la méthode classique de coloration qui utilise le bleu de Coomassie. Comme dans le cas du muscle, les protéines de 54000-56000 daltons isolées de l'oeuf sont difficilement détectables par le bleu de Coomassie après la focalisation isoélectrique. Par contre, les méthodes de coloration qui utilisent le nitrate d'argent sont efficaces pour leur détection. Les raisons qui déterminent ce comportement sont jusqu'à présent inconnues.

Les protéines de 54000-56000 daltons isolées à partir du culot 100 000 g de l'oeuf par électrophorèse préparative ont été soumises à des essais de polymérisation in vitro dans les mêmes conditions que celles utilisées pour les protéines isolées du muscle lisse. Comme dans le cas du muscle, l'incapacité des protéines de l'oeuf à former des filaments in vitro peut être une conséquence du traitement par le SDS bouillant lors de leur isolement. D'autres possibilités à considérer sont : i) le fait que nous ne sommes pas dans les conditions idéales de polymérisation; ii) l'absence d'autres composants nécessaires à la polymérisation.

4. IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE AU COURS DU CYCLE MITOTIQUE

Nous avons réalisé l'immunofluorescence indirecte sur les cytomatrices résistantes au milieu de lyse contenant de l'hexylène glycol/Triton X-100. Nous avons remarqué que les cytomatrices extraites par le KCl 1M pendant cinq minutes, à 0°C, sous agitation manuelle très douce, gardent encore leur forme. Toutefois, la fragilité de ces structures ne nous a pas permis de réaliser des études immunocytochimiques.

Les oeufs fécondés ont été traités par le DTT/pronase, comme décrit dans la section 4.3 du chapitre Matériels et Méthodes, pour enlever la membrane de fécondation et faciliter la pénétration de l'anticorps. Les structures cytoplasmiques isolées après traitement dans l'hexylène glycol/Triton X-100 à partir des oeufs non fécondés (figure 18.A) ainsi que celles isolées à différents temps après fécondation (figure 18.B),



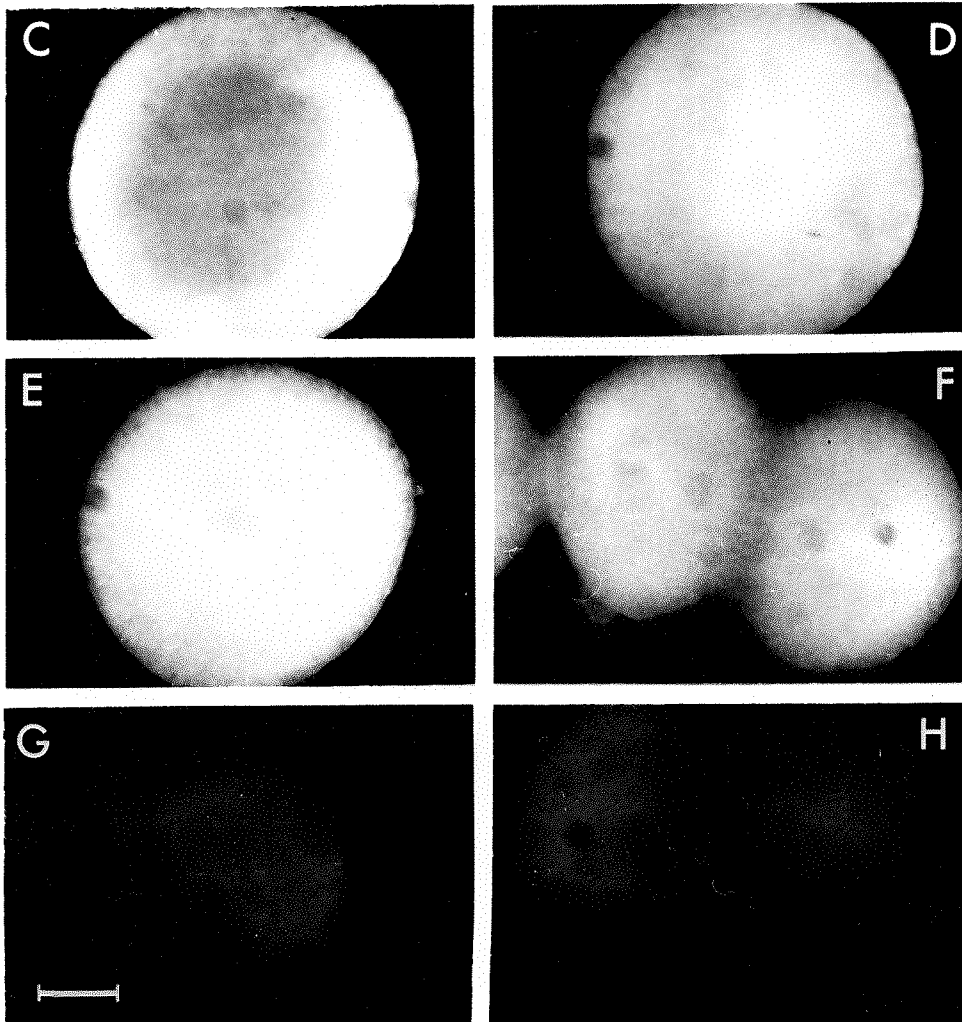


Figure 18. Microscopie en contraste de phase (A,B) et immunofluorescence indirecte (C-H), de la cytomatrice résistante au traitement hexylène glycol / Triton X-100, isolée de l'oeuf d'oursin non fécondé et au cours du premier cycle mitotique.

(A) Contraste de phase de la cytomatrice de l'oeuf non fécondé; (B) contraste de phase de la cytomatrice de l'oeuf fécondé en fin de métaphase (80 minutes); (f) fuseau mitotique, (ch) chromosomes, (C) cytomatrice de l'oeuf non fécondé incubée avec l'antisérum (dilué au 1:100) dirigé contre les protéines de 54000-56000 daltons du muscle d'oursin, puis incubée avec l'anti IgG de lapin couplé au FITC; (D,E,F) cytomatrices de l'oeuf à différents temps après fécondation, traités comme décrit ci-dessus; (D) 35 minutes; (E) 42 minutes; (F) 84 minutes; (G) immunofluorescence indirecte de la cytomatrice de l'oeuf non fécondé, incubée avec le sérum pré-immun (dilué au 1:100), puis traitée comme décrit en (C); (H) immunofluorescence de la cytomatrice de l'oeuf après 84 minutes de fécondation, incubée avec le sérum pré-immun (dilué au 1:100).

Bar: A = 32 μ ; B = 40 μ ; C,D,E,F,G,H = 23 μ .

ont été incubées en présence de l'antisérum préparé contre les protéines de 54000-56000 daltons du muscle d'oursin (section 7.3 du chapitre Matériels et Méthodes).

La fluorescence présentée par les cytomatrices isolées des oeufs non fécondés est diffuse et homogène, comme le montre la figure 18.C. Ce résultat suggère que les protéines de 54000-56000 daltons doivent être distribuées de façon homogène dans l'oeuf. Les cytomatrices isolées à différents temps après fécondation, jusqu'à la première division cellulaire, présentent aussi une fluorescence diffuse et homogène (figure 18.D,E,F). Ces résultats suggèrent qu'apparemment il n'existe pas de changement de l'organisation des protéines de 54000-56000 daltons dans l'oeuf, jusqu'à la première division cellulaire.

5. ULTRASTRUCTURE ET IMMUNOCYTOCHIMIE A L'OR COLLOIDAL

Nous avons observé en microscopie électronique des coupes ultrafines de la cytomatrice isolée des oeufs d'oursin non fertilisés. Dans la région corticale de cette cytomatrice, il existe un réseau de filaments fins de 3-4 nm de diamètre. Ces filaments qui sont courts et anastomosés se trouvent distribués entre les vésicules et les granules dispersés à l'intérieur du cortex (figure 19.A et B). Le nombre de ces filaments est réduit dans la partie la plus interne de la cytomatrice. Certains filaments corticaux sont attachés sur le bord de la cytomatrice, d'autres apparaissent entourant les vésicules de nature inconnue. Dans ces structures, nous n'avons identifié ni la présence de microtubules, ni celle de cables de microfilaments.

L'immunocytochimie à l'or colloïdal réalisée sur les cytomatrices a utilisé comme premier anticorps l'anti 54000-56000 daltons de muscle lisse d'oursin, comme décrit dans la section 7.4 du chapitre Matériels et Méthodes. Par cette méthode, nous avons observé la présence de particules d'or distribuées de façon irrégulière sur les filaments de 3-4 nm. Dans certains endroits, nous observons un alignement de granules d'or sur des filaments, par contre, à d'autres endroits ces granules apparaissent plutôt groupés, la structure sur laquelle ils se sont

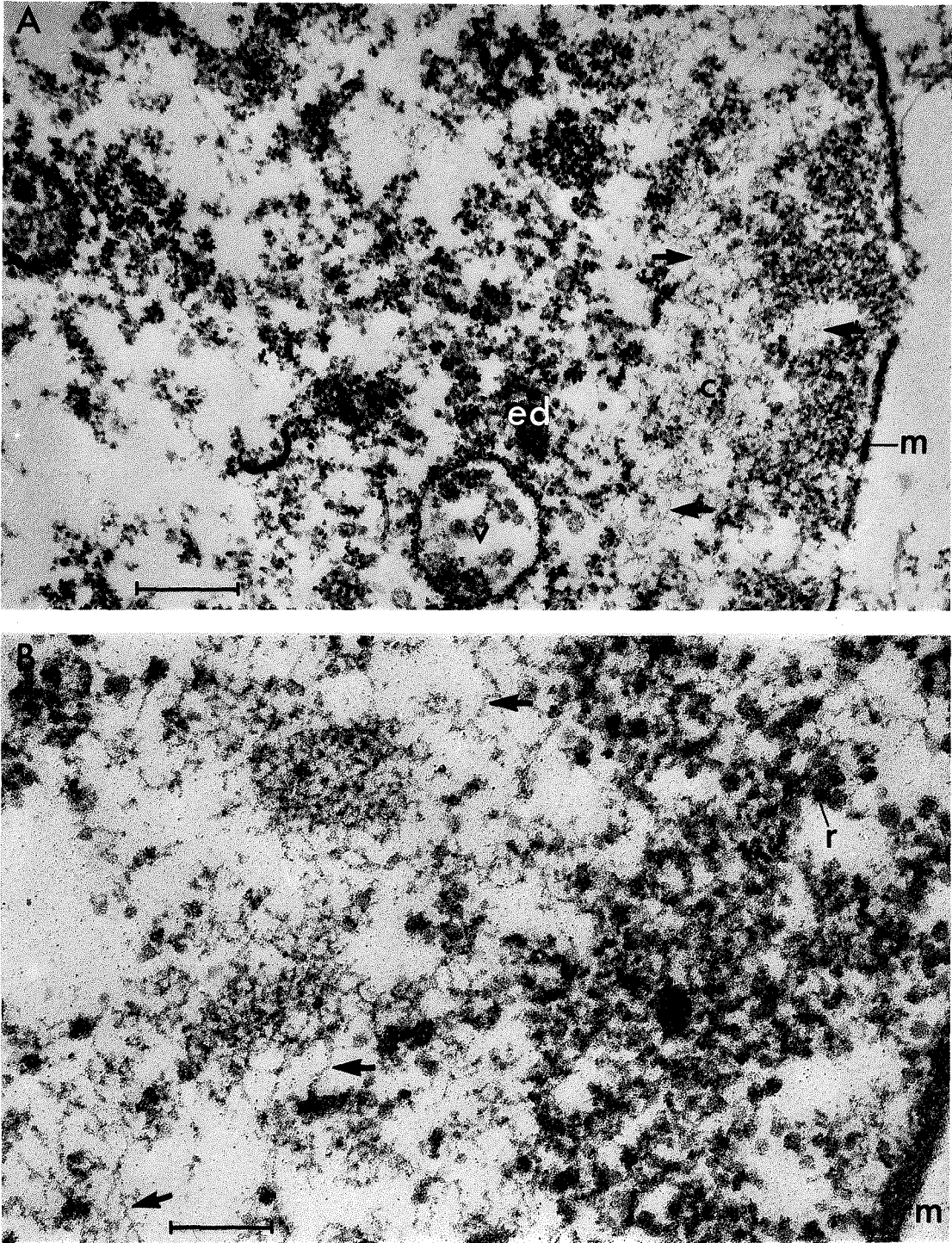


Figure 19. Ultrastructure et immunocytochimie à l'or colloïdal de la cytomatrice isolée de l'oeuf non activé. (A) Coupe ultra-fine à faible grossissement d'une région de la cytomatrice entourée par une membrane (m), montrant le cortex (c); des vésicules de nature inconnue (v); des masses denses aux électrons (ed); des filaments de 3-4 nm dispersés dans le cortex (flèches); (r) des particules ayant l'apparence de ribosomes; (B) coupe ultra-fine à plus fort grossissement de la région corticale où se trouvent les filaments de 3-4 nm. (A) Grossissement X 30000; bar = 0,5 μ ; (B) Grossissement X 75000; bar = 0,2 μ .

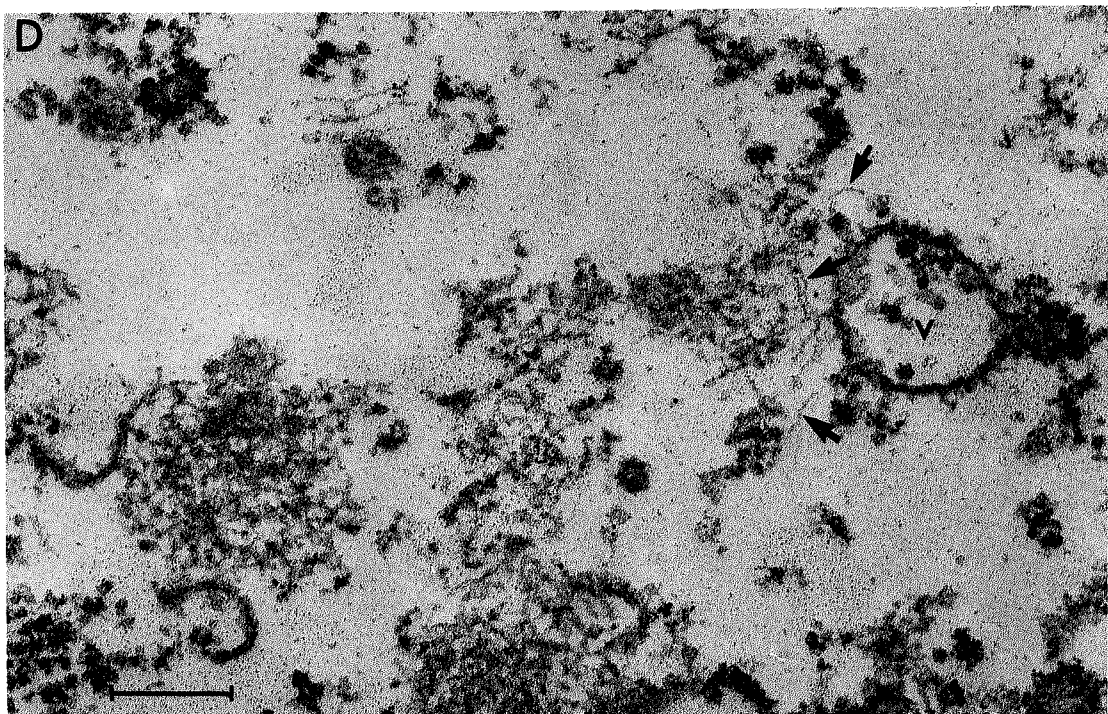
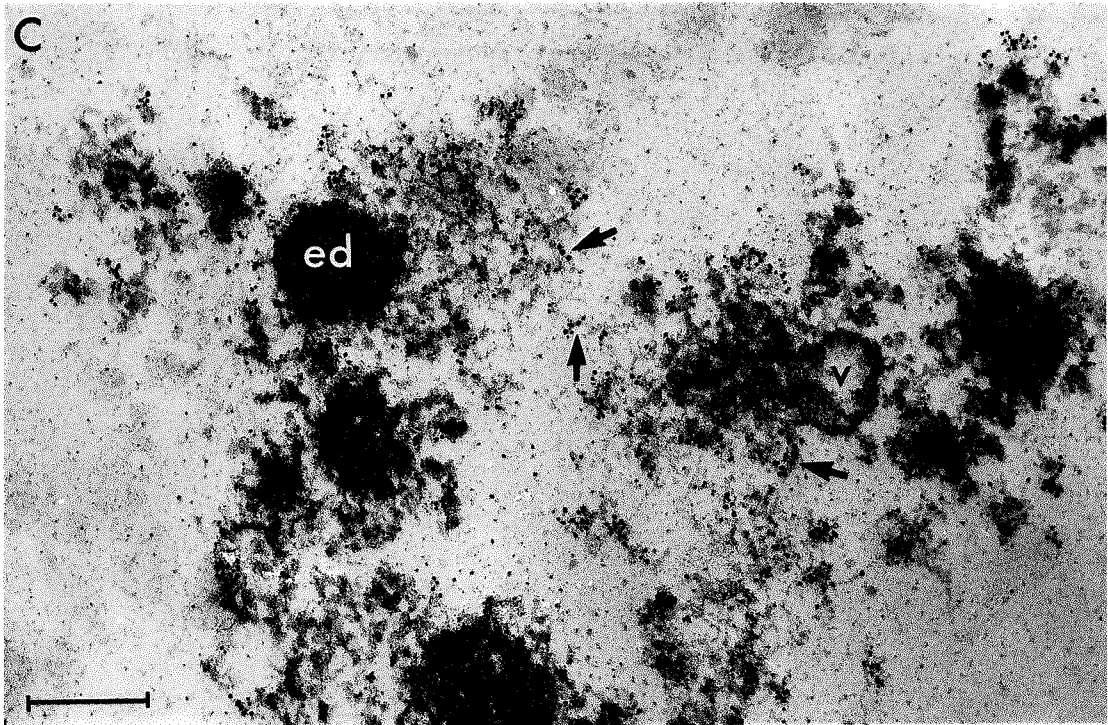


Figure 19. (C) Coupe ultra-fine montrant la région corticale d'une cytomatrice incubée avec l'antisérum dilué au 1:100, dirigé contre les protéines de 54000-56000 daltons du muscle d'oursin, puis incubée avec l'anti IgG de lapin couplé à l'or colloïdal (5 nm). La décoration des filaments de 3-4 nm par les particules d'or est indiquée par des flèches; (D) la cytomatrice a été incubée avec le sérum pré-immun dilué au 1:100, puis traitée comme en (C). Les filaments corticaux de 3-4 nm sont visibles (flèches); par contre, il n'y a pratiquement pas de marquage détectable. Grossissement: X 75000; bar = 0,2 μ .

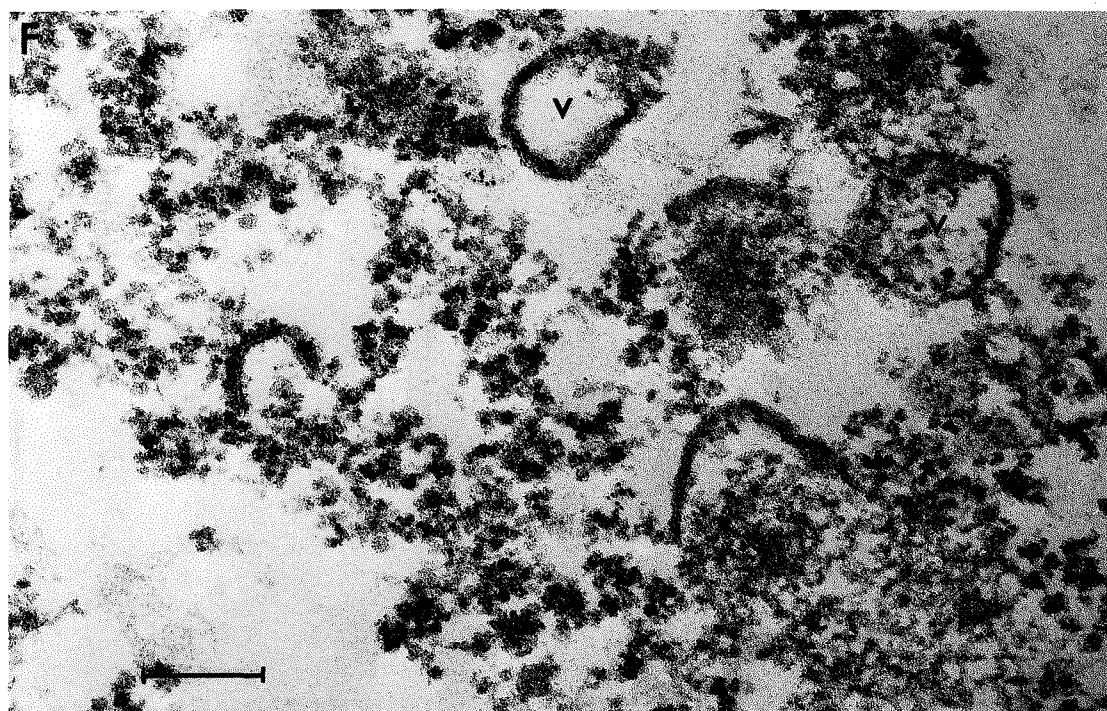
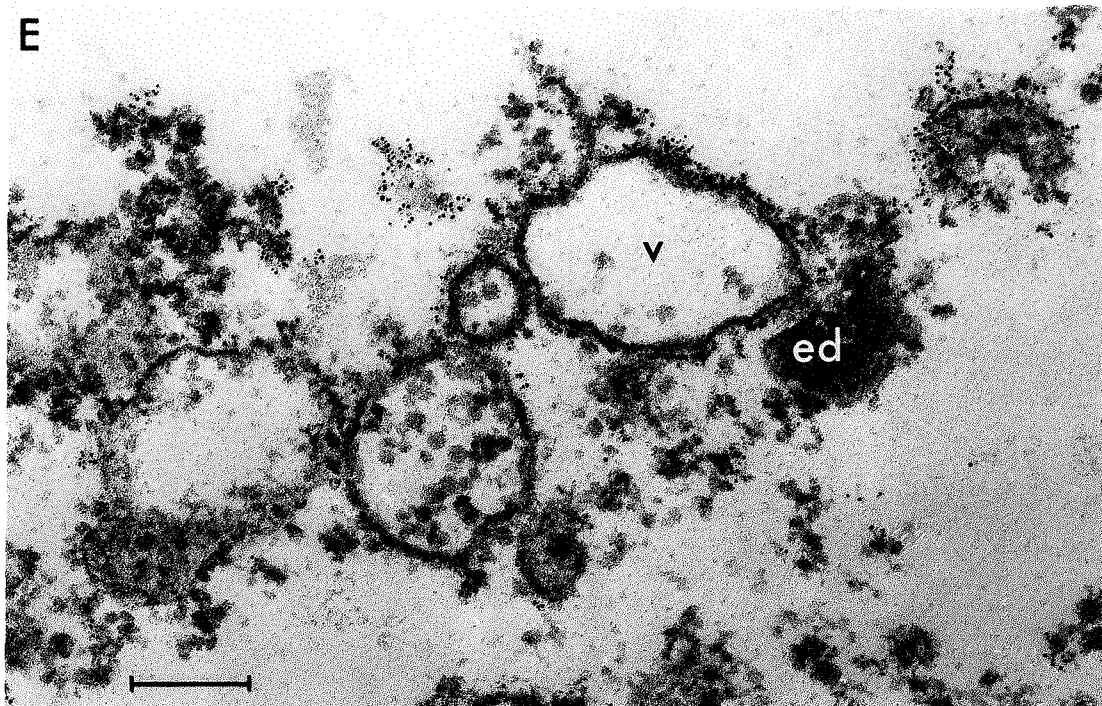


Figure 19. (E) Coupe ultra-fine montrant la région corticale d'une cytomatrice incubée avec l'antisérum dilué au 1:100, dirigé contre les protéines de 54000-56000 daltons du muscle d'oursin, puis incubées avec l'anti IgG de lapin couplé à l'or colloïdal. Cette cytomatrice a perdu sa région périphérique, se trouvant dépourvue du réseau filamenteux. Nous observons un marquage assez intense entourant les vésicules cytoplasmiques. (F) Coupe ultra-fine de la région corticale d'une cytomatrice qui a perdu sa région périphérique, incubée avec le sérum pré-immun (1:100) et traitée comme décrit en (E). Grossissement: X 75000; bar = 0,2 μ .

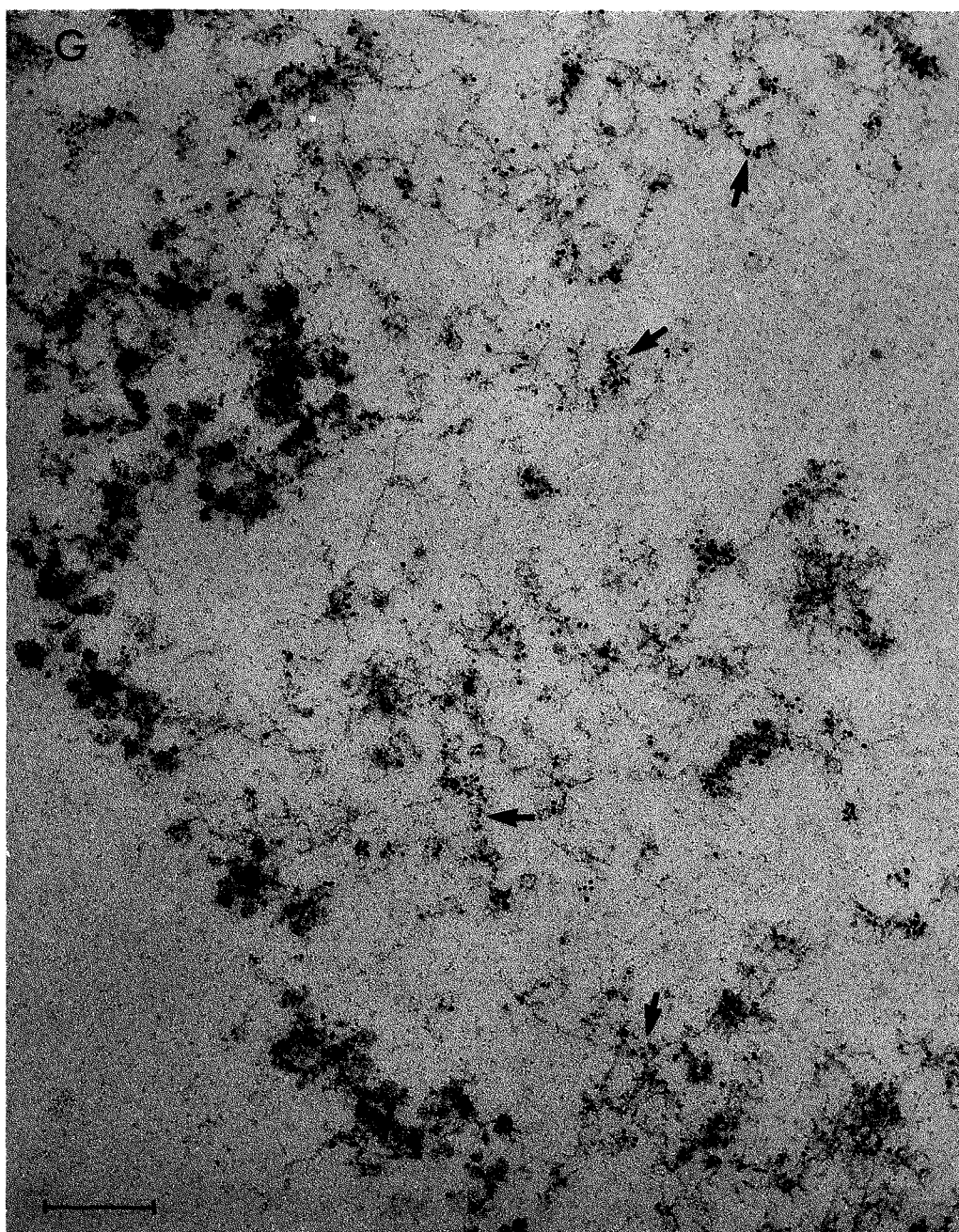


Figure 19. (G) Coupe ultra-fine montrant la région périphérique contenant le réseau de filaments de 3-4 nm qui a été arrachée de la cytomatrice au cours du traitement. La cytomatrice a été incubée avec l'antisérum (dilué au 1:100) contre les protéines de 54000-56000 daltons de muscle d'oursin et traitée comme décrit dans (C-F). Les granules d'or sur les filaments sont signalés par des flèches. Le bord de la structure est visible dans la partie inférieure gauche de la figure.

Grossissement: X 75000; bar = 0,2 μ .

attachés étant difficile à identifier (figure 19.C). Le marquage n'est pas exhaustif, il reste toujours une certaine quantité de filaments non marqués. Ce fait peut être une conséquence soit des limitations de la méthode de marquage généralement utilisée pour décorer des structures de plus grande taille, soit du fait que parmi ce réseau il existe des filaments de nature différente, constitués de protéines qui ne partagent pas les déterminants antigéniques des protéines de 54000-56000 daltons du muscle d'oursin. La longue manipulation impliquée dans cette procédure détériore parfois les cytomatrices qui sont très fragiles. Ceci se traduit par la perte éventuelle de sa région périphérique arrachant ainsi une partie du réseau de filaments. Les filaments enlevés deviennent plus exposés à l'anticorps et sont plus fortement marqués par les particules d'or colloïdal (figure 19.G). Les cytomatrices qui ont perdu leur région périphérique se trouvent souvent dépourvues du réseau de filaments de 3-4 nm. Dans ce cas les vésicules cytoplasmiques de nature inconnue peuvent se présenter entourées d'un marquage assez intense (figure 19.E).

Les cytomatrices incubées avec le sérum pré-immun se présentent souvent plus détériorées que celles traitées par l'antisérum. Aussi, nous avons observé qu'il existe souvent un certain niveau de marquage non spécifique dans les structures incubées avec le sérum pré-immun (figure 19.D et E). Cependant, nous estimons significative la différence entre la quantité de marquage présentée par les cytomatrices incubées avec le sérum pré-immun et celles incubées avec l'antisérum.

Les résultats de l'immunocytochimie à l'or colloïdal suggèrent que les protéines de 54000-56000 daltons de la cytomatrice sont associées à des filaments de 3-4 nm qui font partie du réseau cortical des oeufs non fécondés. Des expériences sont en cours dans notre laboratoire pour essayer de perfectionner cette méthode, ce qui permettra sans doute de répondre aux questions qui se posent encore sur ce sujet.

6. DISCUSSION

Nos résultats montrent que nous avons isolé pour la première fois la cytomatrice de l'oeuf d'oursin non fécondé. Nous avons mis en évidence dans cette structure l'existence d'un réseau de filaments corticaux de 3-4 nm de diamètre. Ces filaments présentent le même diamètre que ceux mis en évidence dans les cellules musculaires lisses d'oursin, tritonnées puis extraites à haute force ionique. Les protéines de 54000-56000 daltons semblent être associées à ces filaments.

Les études ultrastructurales sur la cytomatrice n'ont pas révélé la présence de microfilaments, ni de microtubules ou de filaments de 10 nm. Nos résultats sont en accord avec ceux de Begg et Rebhum (87), et de Bestor et Schatten (141) qui n'ont trouvé ni microfilaments, ni microtubules dans les oeufs d'oursin non fécondés.

Apparemment, le réseau cortical de filaments de 3-4 nm doit être impliqué dans la cohésion du cytoplasme de l'oeuf non activé. Cette cohésion maintenue principalement par ce réseau cortical pourrait expliquer la fragilité de ces structures.

La résistance à la déformation présentée par le cortex de l'oeuf d'oursin est une propriété connue depuis plusieurs années. Mitchison et Swann, en 1955 (142) ont mesuré les propriétés viscoélastiques du cortex de l'oeuf d'oursin non fertilisé à l'aide d'un élastimètre. D'après ces mesures, la résistance de la surface de l'oeuf non fertilisé est de l'ordre de $2,5 \text{ dynes/cm}^2/\mu\text{m}$. Hiramoto (89) a démontré aussi l'élasticité du cortex de l'oeuf d'oursin.

Maruyama et col. (85) ont attribué cette élasticité du cortex à la présence d'une protéine élastique. Ces auteurs ont isolé à partir des oeufs fertilisés de H. pulcherrimus et de A. crassispina, une fraction insoluble après des traitements successifs dans du KCl 0,6 M, du KI 0,6 M / $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,06 M, de l'acide acétique 1M et de la soude 0,1 M. La fraction insoluble était encore traitée par le phénol 50 %, à chaud. Le résidu final constituait, selon lui, la protéine élastique responsable de l'élasticité du cortex. Ce résidu n'était soluble ni dans du SDS 1 %,

ni dans de l'urée 6M, même en présence de β -mercaptoéthanol. Cette insolubilité n'a permis aucun type d'isolement ni d'identification des constituants du résidu. Pendant toutes les étapes de fractionnement des protéines, Maruyama et col. (85) n'ont pas utilisé d'inhibiteurs de protéases. L'analyse des acides aminés a été effectuée sur le matériel insoluble. Cette analyse a révélé une composition en acides aminés proche de celle de la connectine, une protéine élastique du muscle squelettique de vertébrés (86). Le résidu des extractions incubé avec l'anticorps contre la connectine, puis avec une anti Ig G fluorescente a donné une réaction positive. Celle-ci a été attribuée à la présence d'une protéine du type connectine pouvant expliquer les propriétés élastiques du cortex. Il est fort possible que l'origine de la fluorescence positive soit liée à une adsorption non spécifique liée aux conditions d'isolement du matériel observé, ce qui n'est pas considéré par les auteurs. Nous prenons ces résultats avec réserve. Aucune donnée de microscopie électronique n'a été présentée. Il est peu probable que les filaments de 3-4 nm que nous avons mis en évidence dans le cortex de l'oeuf soient de même nature que la protéine élastique de Maruyama et col. (85). Les différences considérables des propriétés de solubilité entre les protéines que nous avons isolées et la protéine élastique isolée par Maruyama et col. montrent, à priori, que nous avons des protéines différentes.

Hays et Salmon (140) ont isolé une protéine de 55000 daltons associée au fuseau mitotique des oeufs de S. droebachiensis. Quand les microtubules du fuseau mitotique sont dépolymérisés par le Ca^{++} ou l'ATP, il reste une structure qui garde la forme du fuseau et les positions des chromosomes. Cette structure observée en microscopie électronique montre la présence de filaments fins de 5 nm de diamètre qui interconnectent des particules globulaires de 15-20 nm. L'analyse électrophorétique a montré que cette structure est enrichie en une protéine de 55000 daltons qui ne présente pas de réaction croisée avec l'antitubuline.

Nos données expérimentales ne nous permettent pas d'exclure l'éventuelle interaction avec le fuseau mitotique, des filaments de 3-4 nm que nous avons mis en évidence dans le cortex. Néanmoins, il est

possible que la protéine de 54000-56000 daltons que nous avons isolé de l'oeuf soit la même protéine que celle présentée par Hays et Salmon (140). Mais, comme ces auteurs n'ont pas présenté les propriétés physicochimiques de la protéine de 55000 daltons et ne possèdent aucune donnée immunocytochimique qui démontre l'association de cette protéine avec les filaments, nous ne pouvons pas établir de comparaison.

L'étude ultrastructurale sur la cytomatrice de l'oeuf non activé montre que les filaments de 3-4 nm se trouvent surtout sous forme d'un réseau cortical. De rares filaments sont trouvés plus à l'intérieur de la cellule.

Les expériences d'immunocytochimie à l'or colloïdal réalisées sur la cytomatrice de l'oeuf non fécondé suggèrent que les protéines de 54000-56000 daltons sont associées aux filaments de 3-4 nm. Toutefois, nous avons encore des problèmes techniques au niveau de ces expériences. Le premier problème qui se pose est la conservation des filaments dans la cytomatrice. Parmi les différentes méthodes de fixation essayées, celle qui utilise l'action combinée du glutaraldéhyde et du paraformaldéhyde semble être la plus adéquate. Seulement dans ces conditions, le réseau de filaments de 3-4 nm est visible dans le cortex. Par contre, après fixation nous avons visiblement un problème de pénétration des anticorps dans la cytomatrice. Ceci peut être une conséquence de cette méthode de fixation qui provoquerait une réticulation trop serrée de la surface, ce qui empêcherait la pénétration des anticorps ou, plutôt, du deuxième anticorps couplé à l'or colloïdal. Les résultats présentés proviennent d'une série d'essais et s'appuient sur de longues observations. Ils suggèrent que les protéines de 54000-56000 daltons sont associées à des filaments 3-4 nm. Les expériences se poursuivent dans notre laboratoire dans le but de trouver de meilleures conditions de fixation des structures ainsi que la bonne pénétration des anticorps.

Nos résultats d'immunofluorescence ont montré qu'au cours de la fertilisation de l'oeuf, la distribution des filaments de 3-4 nm ne se modifie pas, du moins de façon détectable par cette méthode, malgré les altérations de l'organisation des microtubules sous-corticaux (143). Les études ultrastructurales et immunocytochimiques sur des oeufs fécondés,

en cours dans notre laboratoire, nous apporteront des informations plus précises sur l'organisation de ces filaments après fertilisation et sur son éventuelle interaction avec les microtubules.

Les résultats que nous avons présentés montrent que les protéines de 54000-56000 daltons isolées du muscle lisse d'oursin sont pré-existantes dans l'oeuf. Ces protéines isolées de l'oeuf présentent les mêmes propriétés physiochimiques et immunologiques que celles du muscle lisse. Nous avons démontré la présence d'un réseau de filaments de 3-4 nm dans le cortex de l'oeuf non activé et parmi ces filaments il y en a qui semblent être de même nature que les filaments d'échinonématine identifiés dans le muscle lisse d'oursin. Nous proposons que ce réseau de filaments de 3-4 nm joue un rôle de cytosquelette dans l'oeuf non fécondé.

CHAPITRE V

ULTRASTRUCTURE DU MUSCLE LISSE D'HOLOTHURIE

1. LE SYSTEME DIGESTIF
2. L'HISTOLOGIE DE L'INTESTIN
3. FRACTIONNEMENT DES PROTEINES DU MUSCLE LISSE D'HOLOTHURIE. ETUDE BIOCHIMIQUE ET IMMUNOCYTOCHIMIQUE DE LA PROTEINE DE 56000 DALTONS
4. ETUDE STRUCTURALE DES CELLULES DU MUSCLE LISSE D'HOLOTHURIE
 - 4.1 Microscopie optique
 - 4.2 Microscopie électronique
5. DISCUSSION

Dans ce chapitre nous étudions le muscle lisse d'intestin d'Holothuria tubulosa, un échinoderme qui appartient à la classe des holothuroïdes. Notre objectif est de vérifier dans cet échinoderme, la présence d'un réseau de filaments de 3-4 nm de diamètre analogue à celui mis en évidence dans le muscle lisse d'oursin et d'identifier, dans ce réseau, la présence de protéines qui présentent les mêmes déterminants antigéniques que celles de 54000-56000 daltons du muscle d'oursin.

Nos résultats montrent la présence d'un réseau de filaments de 3-4 nm dans les cellules du muscle lisse d'holothurie extraites dans du KCl 0,6 M. Ce réseau présente une grande ressemblance avec celui du muscle lisse d'oursin. Comme dans le cas du muscle d'oursin, nous n'avons trouvé de filaments de 10 nm dans le muscle lisse d'holothurie.

Il n'existe pas dans le muscle lisse d'holothurie de protéines qui présentent les mêmes déterminants antigéniques que celles de 54000-56000 daltons du muscle lisse d'oursin. Cependant, la fraction insoluble dans du KCl 1M et sédimentable à 100000 g est enrichie en une protéine de 56000 daltons qui présente un point isoélectrique très basique.

Les résultats que nous présentons dans ce chapitre confirment donc l'existence d'une nouvelle catégorie de filaments de 3-4 nm qui constituent le cytosquelette du muscle lisse d'échinodermes. Apparemment, ces filaments sont constitués d'une famille de protéines qui ne partagent pas forcément les mêmes déterminants antigéniques.

La suite de ce travail dans notre laboratoire nous permettra de vérifier si la protéine de 56000 daltons du muscle lisse de l'holothurie est associée aux filaments de 3-4 nm, quand nous aurons l'anticorps contre cette protéine.

1. LE SYSTEME DIGESTIF

Le système digestif de *Holothuria tubulosa* est constitué d'un long canal qui se plie et occupe toute la longueur de la cavité coelomique. Il est composé d'une bouche circulaire contenant cinq tentacules ; d'un pharynx de l'ordre de 3,5 cm de long, suivi d'un oesophage de 6 cm de long. Après une constriction, celui-ci débouche dans une région élargie et recourbée de l'ordre de 5 cm de long, qui constitue l'estomac. Finalement, l'estomac est suivi par l'intestin. Ils sont séparés par une constriction. L'intestin fait 42 cm de long, trois fois la longueur de l'animal, avant de se vider à travers l'anus (figure 20) (144).

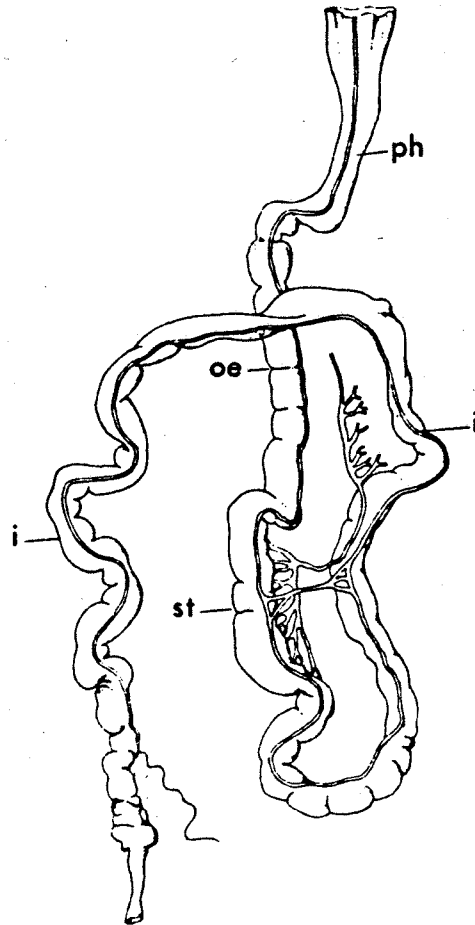


Fig. 1 -- Schematic representation of the alimentary canal of *Holothuria tubulosa*
 ph: pharynx, oe: oesophagus, st: stomach, i: intestine.

Figure 20. F. Rosati,

Monitore ZOOL. ITAL. (N.S.) 2 : 49-86, 1968.

2. L'HISTOLOGIE DE L'INTESTIN

La structure histologique générale des différentes parties du tube digestif est la même. Elle consiste en un épithélium digestif interne qui repose sur du tissu connectif, suivi de deux couches musculaires puis d'un épithélium péritonéal (144).

L'épithélium digestif est formé de plusieurs couches de cellules. Cet épithélium repose sur une membrane qui le sépare du tissu connectif. Le tissu connectif est constitué d'une couche de fibres de collagène très serrées, noyées dans une matrice glycidique.

La couche musculaire est formée de fibres musculaires circulaires plus extérieures et de fibres longitudinales intérieures. Les cellules musculaires circulaires sont disposées côte à côte et sont interconnectées par des desmosomes. Ces cellules contiennent des mitochondries, un réticulum sarcoplasmique et des filaments contractiles parallèles à l'axe longitudinal de la cellule (144). Finalement l'épithélium péritonéal est en contact avec la cavité coelomique. Il est constitué d'une couche unique de cellules. Celles-ci contiennent des vésicules remplies de mucopolysaccharides. La surface extérieure de ces cellules présente des microvillosités et des cils (144).

La partie expérimentale de notre travail a été réalisée sur la région du tube digestif qui correspond à l'intestin. Dans la figure 21.A nous présentons une coupe transversale semi fine de l'intestin de l'holothurie, où nous pouvons identifier les quatre différents tissus décrits ci-dessus. La figure 21.B montre une coupe ultra-fine de la couche musculaire.

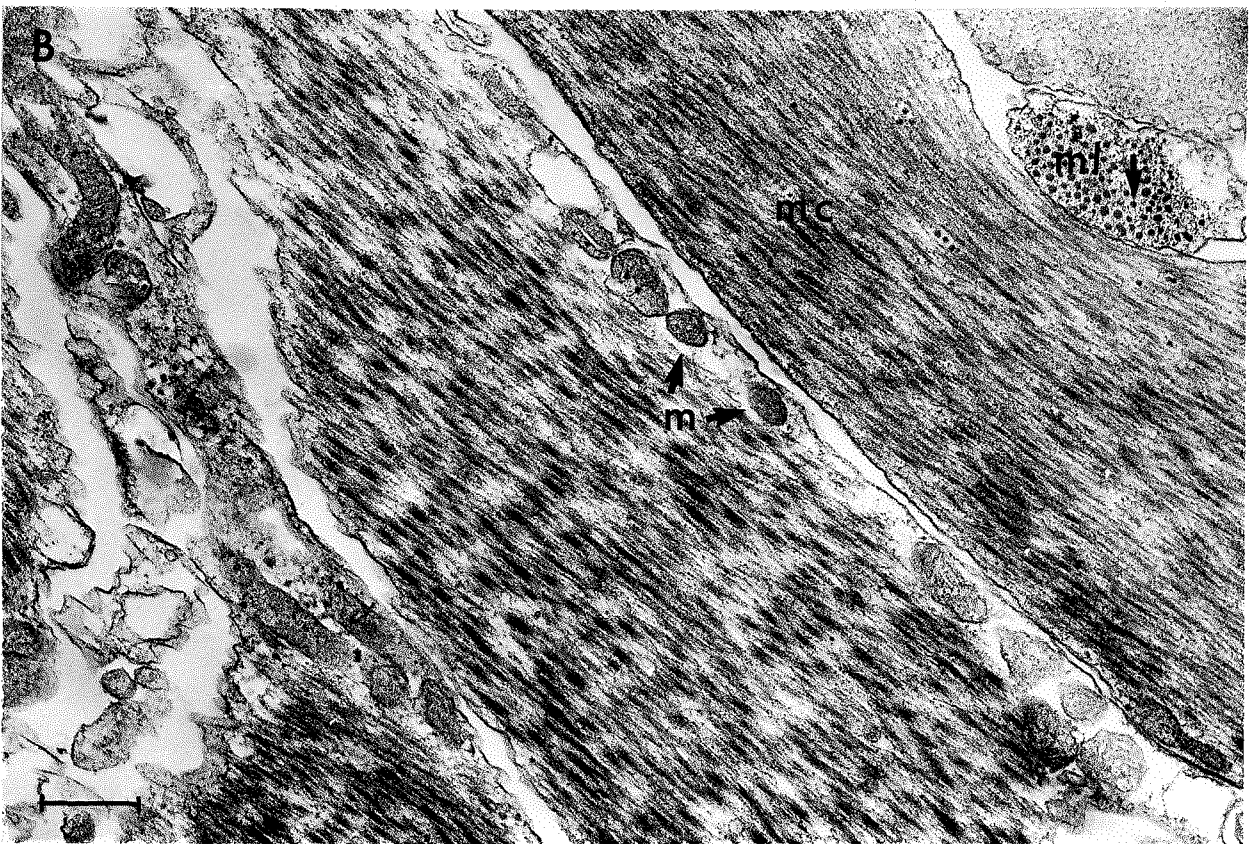
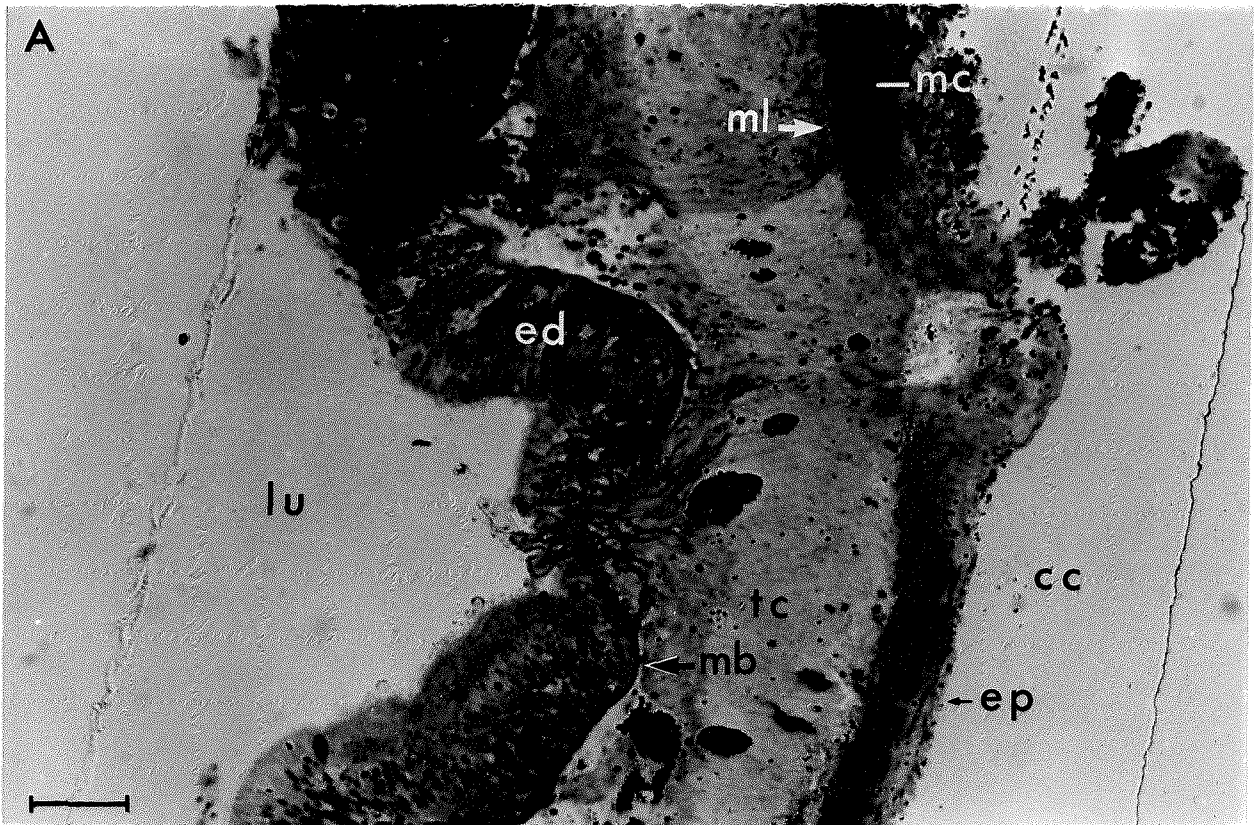
3. FRACTIONNEMENT DES PROTEINES DU MUSCLE LISSE D'HOLOTHURIE. ETUDE BIOCHIMIQUE ET IMMUNOCYTOCHIMIQUE DE LA PROTEINE DE 56000 DALTONS

Le tissu enrichi en cellules de muscle lisse d'intestin d'holothurie a été obtenu comme décrit dans la section 4.4 du chapitre Matériels et

Figure 21. Coupes transversales de l'intestin de H. tubulosa

(A) Coupe semi-fine (1 μ) colorée à l'azur II et au bleu de méthylène, observée au microscope optique, montrant les différentes couches de cellules qui composent le tissu. (lu) lumen digestif; (ed) épithélium digestif; (mb) membrane séparant l'épithélium digestif du tissu connectif (tc); (ml) muscle longitudinal; (mc) muscle circulaire; (ep) épithélium péritonéal; (cc) cavité coelomique. Grossissement: X 1100; bar = 20 μ .

(B) Coupe ultra-fine contrastée à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb, observée au microscope électronique. (mc) muscle circulaire où nous pouvons observer les filaments contractiles alignés dans le sens longitudinal de la cellule et les mitochondries périphériques (m); (ml) muscle longitudinal, montrant les filaments épais (20 nm) indiqués par une flèche. Grossissement: X 30000; bar = 0,4 μ .



Méthodes. Le profil électrophorétique des protéines du muscle d'holothurie extrait dans du SDS ; β -mercaptoéthanol, bouillant est présenté dans le figure 22, ligne a. Ce profil montre, parmi plusieurs chaînes polypeptiques de différents poids moléculaires, la présence de bandes majoritaires dont les poids moléculaires apparents correspondent à ceux de polypeptides trouvés dans le muscle lisse de rat. Ces analogies correspondent aux polypeptides suivantes : une bande de 220000 daltons, le poids moléculaire des chaînes lourdes de la myosine (145); une bande de poids moléculaire de l'ordre de 130000 daltons de nature inconnue. Ce poids moléculaire a été décrit pour la kinase de la chaîne légère de la myosine (MLC) de dinde (145). Nous trouvons ensuite une bande de 94000 daltons non encore décrite chez le rat ; une bande de 56000 daltons qui correspond au poids moléculaire des protéines des filaments intermédiaires du muscle de rat. Ce poids moléculaire correspond aussi à celui du doublet de 54000-56000 daltons de l'oursin ; la bande de 43000 daltons correspond au poids moléculaire de l'actine (100). Ensuite nous trouvons une bande de poids moléculaire de 37000 daltons, proche de celui des chaînes polypeptiques de la tropomyosine (130,146). Finalement, nous trouvons des bandes de poids moléculaires entre 15000 et 18000 daltons, dont des poids moléculaires peuvent être ceux des chaînes légères de la myosine (147). Parmi ces bandes il peut également y avoir des produits de dégradation de polypeptides de plus haut poids moléculaire, malgré la présence des inhibiteurs de protéases pendant toutes les étapes de la préparation du tissu musculaire.

Le muscle lisse d'holothurie a été homogénéisé à pH 7,5 dans une solution contenant du KCl 1M, comme décrit dans la section 4.5 du chapitre Matériels et Méthodes. Nous observons dans la figure 22.A, ligne b, que la majorité des protéines du muscle ont été extraites à haute force ionique. Le résidu de cette extraction, récupéré à 20000 g ne contient que des quantités résiduelles des protéines de 120000, 94000 et 43000 daltons. Les bandes de bas poids moléculaires sont majoritaires dans cette fraction (figure 22.A, ligne e).

Quand le surnageant de l'extraction à haute force ionique est centrifugé à 100000 g pendant 2 H 30, nous retrouvons dans la fraction sédimentable la totalité du polypeptide de 220000 daltons, la majorité

des bandes de 94000 et de 56000 daltons, ainsi que des quantités résiduelles des bandes de 120000 et de 43000 daltons (figure 22.A, ligne d). Nous pouvons faire la comparaison du profil électrophorétique de cette fraction extraite dans du KCl 1M et sédimentable à 100000 g avec celle obtenue par le même traitement à partir de l'oursin (figure 22.A, ligne f). Les analogies se retrouvent au niveau de l'actine résiduelle, de la bande de 56000 daltons qui correspond au doublet de 54000-56000 daltons de l'oursin et de la bande de 120000 daltons qui correspond à un doublet de même poids moléculaire chez l'oursin.

La bande de 220000 daltons, majoritaire chez l'holothurie, se trouve aussi chez l'oursin. La différence la plus importante se trouve au niveau de la bande de 94000 daltons, majoritaire chez l'holothurie et inexistante chez l'oursin. Ces résultats montrent qu'il existe dans le muscle lisse d'holothurie, une protéine de 56000 daltons, ayant le même poids moléculaire apparent que celui du doublet des protéines impliquées dans la constitution des filaments de 3-4 nm du muscle d'oursin. La protéine d'holothurie est extraite dans du KCl 1M et sédimentée à 100000 g. Toutefois, il reste une fraction de cette protéine dans le surnageant 100000 g (figure 22.A, ligne c), après 2 H 30 de centrifugation. Nous attribuons ce fait à la haute viscosité de l'extrait qui empêcherait la sédimentation complète de la protéine.

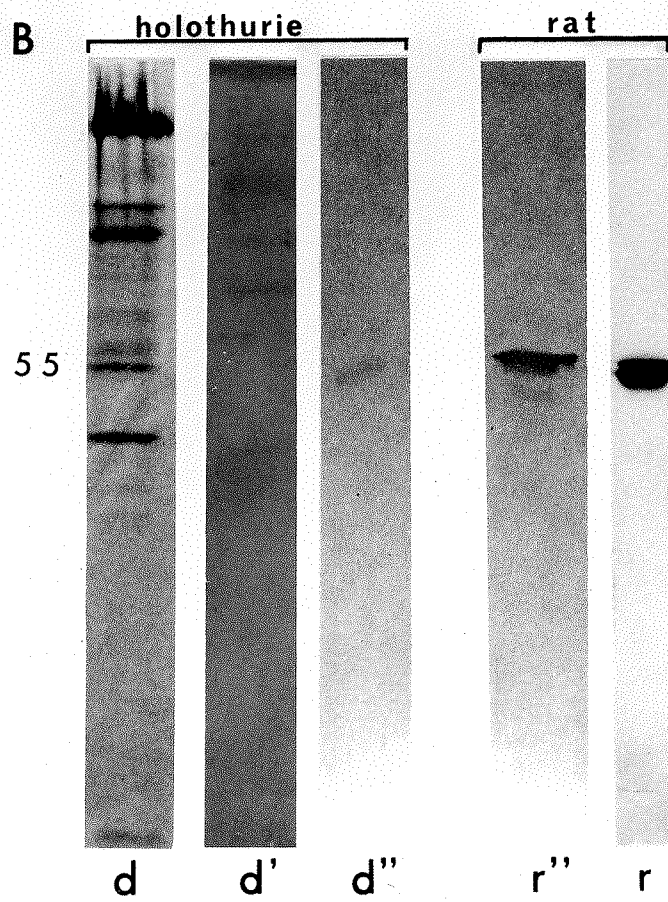
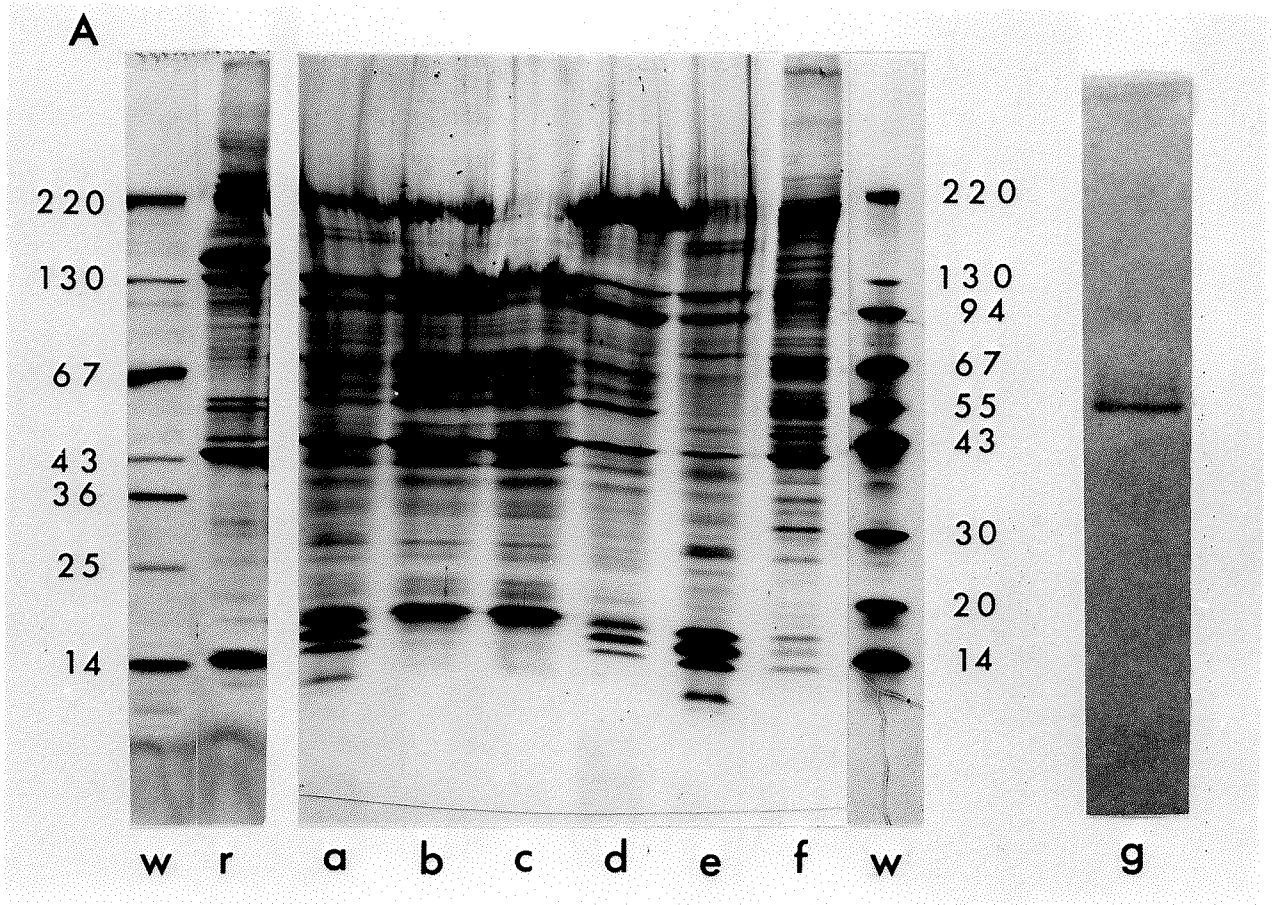
La fraction extraite dans du KCl 1M, sédimentable à 100000 g a été après électrophorèse, transférée sur filtre de nitrocellulose, incubée avec l'antisérum spécifique contre le doublet de 54000-56000 daltons d'intestin d'oursin, puis avec l'anti IgG de lapin couplé à la peroxydase et révélée ensuite par le réactif 4-chlore-1-naphtol. Aucune réaction positive n'a été détectée au niveau de la bande de 56000 daltons du muscle d'holothurie (figure 22.B, lignes d et d'). La protéine de 56000 daltons ne présente pas non plus de réaction positive quand le filtre de nitrocellulose est incubé en présence de l'antivimentine de fibroblaste de rat (figure 22.B, lignes d et d'). Ces résultats montrent que la protéine de 56000 daltons du muscle lisse d'holothurie ne présente de déterminants antigéniques communs ni avec la vimentine ni avec les protéines de 54000-56000 daltons de l'oursin.

Figure 22. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) et réaction immunologique sur filtre de nitrocellulose.

(A) SDS-PAGE en gradient de concentration d'acrylamide (5-20%) des différentes fractions du muscle lisse d'holothurie traité par le KCl 1 M (a-e, 80µg de dépôt); (r) muscle tritoné de rat (120 µg); (f) fraction insoluble dans le KCl et sédimentable à 100000 g du muscle d'oursin.

(a) muscle tritoné; (b) surnageant de centrifugation à 20000 g; (c) surnageant de centrifugation à 100000 g; (d) fraction sédimentable à 100000 g; (e) fraction sédimentable à 20000 g; (g) protéine de 56000 daltons de l'holothurie isolée à partir de (d); (w) étalons de poids moléculaires.

(B) SDS-PAGE et réaction immunologique sur filtre de nitrocellulose. (d) SDS-PAGE de la fraction insoluble dans le KCl et sédimentable à 100000 g à partir du muscle d'holothurie; (d') réaction immunologique de la fraction (d) incubée avec l'antiserum (dilué au 1:100) dirigé contre le doublet de 54000-56000 daltons du muscle d'oursin, puis traitée comme décrit dans le texte; (d'') réaction immunologique de la fraction (d) incubée avec l'antiserum dirigé contre la vimentine (dilué au 1:500), puis traitée comme en (d'); (r) et (r') SDS-PAGE et réaction immunologique de la desmine et vimentine de rat incubées avec l'antiserum (dilué au 1:500) dirigé contre la vimentine, puis traitée comme décrit dans le texte.



La protéine de 56000 daltons du muscle d'holothurie a été extraite dans du SDS ; β -mercaptoéthanol bouillant à partir de la fraction insoluble dans du KCl 1M, sédimentable à 100000 g ; elle a ensuite été isolée par électrophorèse préparative, comme décrit dans la section 5 du chapitre Matériels et Méthodes (figure 22.A, ligne g).

La protéine isolée a été soumise à la focalisation isoélectrique. Les isoformes n'ont été détectées que dans des conditions de non équilibre (NEPHGE) comme décrit dans la section 3.2 du chapitre Matériels et Méthodes. Le profil de cette protéine soumise au NEPHGE est représenté dans la figure 23.A et B.

Cette protéine a également été soumise à des cycles de polymérisation dans les mêmes conditions que celles décrites pour le doublet de 54000-56000 daltons de l'oursin. Les résultats montrent que la protéine isolée du muscle lisse de l'holothurie n'est pas non plus capable de former de filaments in vitro dans ces conditions.

4. ETUDE STRUCTURALE DES CELLULES DU MUSCLE LISSE D'HOLOTHURIE

4.1 Microscopie optique

Les cellules du muscle lisse ont été isolées à partir du tissu musculaire conservé dans la solution II contenant 50 % de glycérol et 0.2 % de Triton X-100.

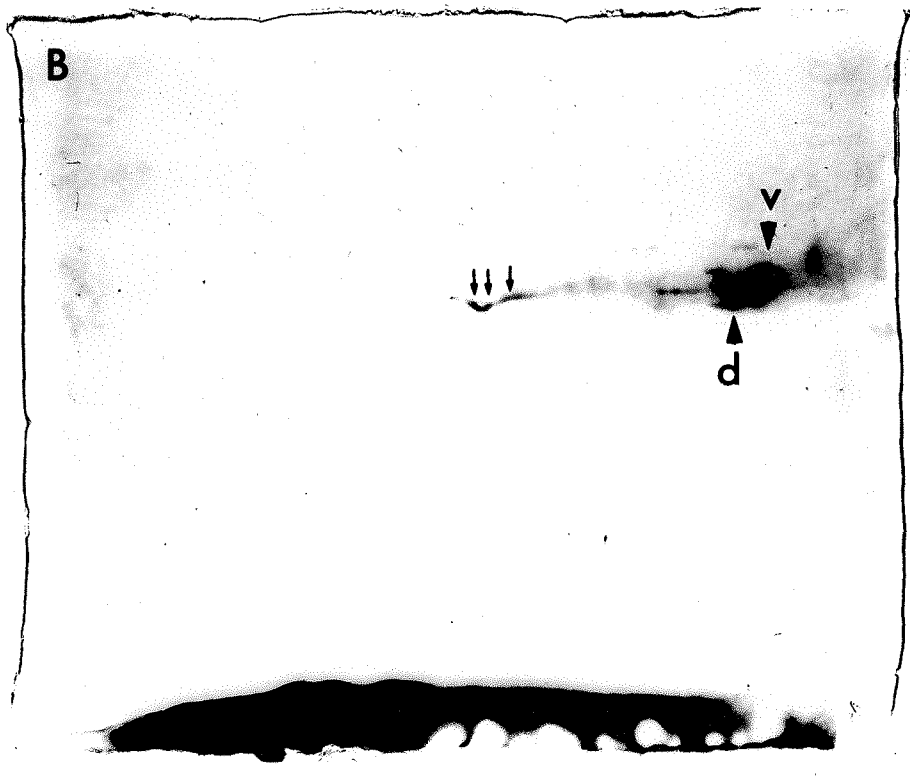
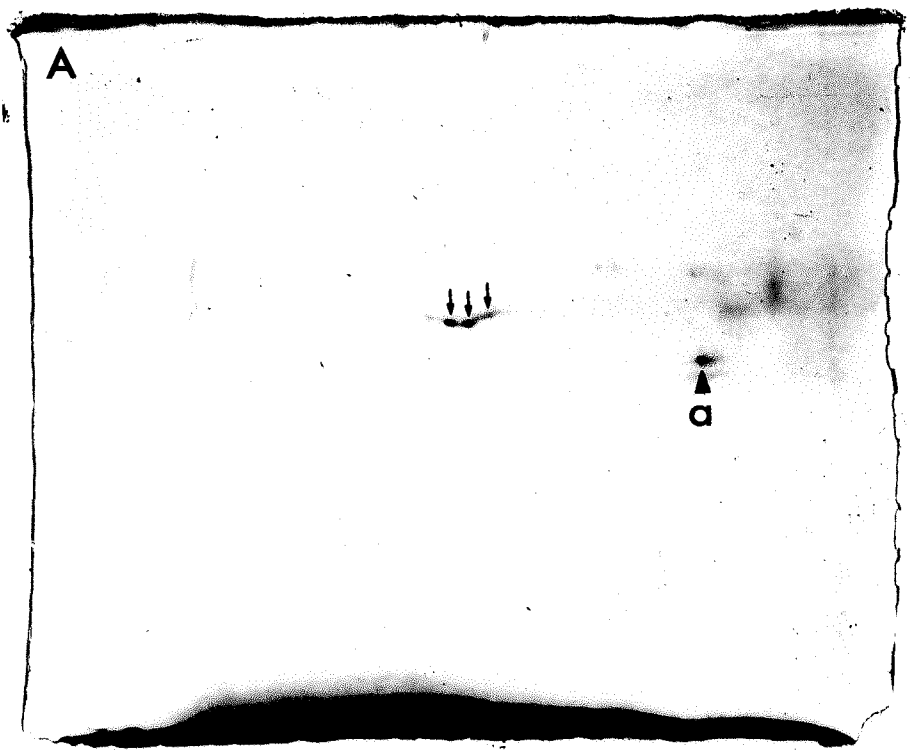
Ces cellules ont été détachées à partir du tissu tritonné par traitement mécanique, ou enzymatique avec 500 U.I./ml de collagénase, comme décrit dans la section 7.3.A du chapitre Matériels et Méthodes. Le cytoplasme des cellules observées en microscopie optique par contraste de phase est constitué de structures filamenteuses orientées longitudinalement. Les cellules soumises à l'action de la collagénase ont un aspect fusiforme semblable à celui des cellules détachées du tissu connectif uniquement par traitement mécanique. Leur dimension est variable, ayant en moyenne 70 μm de long et 4 μm de largeur (figure

Figure 23. Electrophorèse bidimensionnelle en conditions de non équilibre (NEPHGE) de la protéine de 56000 daltons isolée du muscle lisse d'holothurie.

(A) Les trois isoformes de la protéine de 56000 daltons (12 μ g) sont indiquées par des flèches; (a) actine de muscle squelettique de lapin (4 μ g).

(B) Les trois isoformes de la protéine de 56000 daltons isolée (12 μ g); vimentine (v) et desmine (d) (40 μ g les deux ensemble) du muscle de rat. La migration a duré 4 heures sous une tension de 400 V (de la droite vers la gauche sur les photos). L'échelle de pH est indiquée au dessous. Coloration par le bleu de Coomassie.

NEPHGE
↓
SDS-PAGE



9.6 9 8 7 6 5 4.7

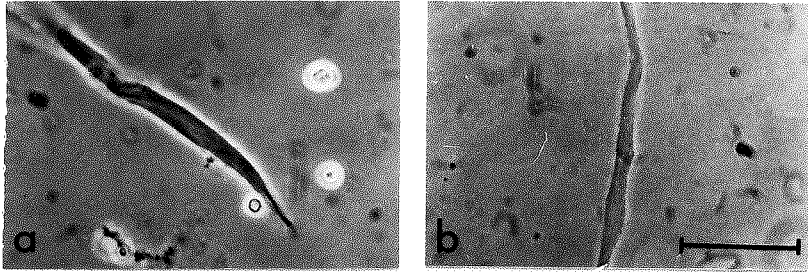


Figure 24. Microscopie en contraste de phase sur des cellules isolées du muscle lisse d'holothurie.

(a) cellule isolée par l'action de la collagenase;

(b) cellule isolée par l'action de la collagenase, puis extraite dans du KCl 0,6 M. Bar = 25 μ .

24.A). Dans certains cas, les cellules ont été extraites dans du KCl 0.6 M pendant cinq minutes pour éliminer les protéines contractiles. Les "fantômes" ainsi obtenus se présentent moins contrastés en microscopie optique, gardant la forme et les dimensions des cellules non traitées par le KCl (figure 24.b).

4.2 Microscopie électronique

L'étude ultrastructurale du tissu musculaire montre la présence de filaments contractiles alignés longitudinalement dans le cytoplasme. Le marquage avec la méromyosine lourde (section 8 du chapitre Matériels et Méthodes) montre le profil typique en pointe de flèche, provenant de l'interaction avec des filaments d'actine (figure 25.b). L'extraction du tissu musculaire par le KCl 0.6 M n'a pas révélé l'existence de filaments de 10 nm. Par contre, nous avons mis en évidence l'existence d'un réseau cytoplasmique de filaments de 3-4 nm analogues à ceux mis en évidence dans le muscle lisse d'oursin. Ces filaments de 3-4 nm n'interagissent pas avec la HMM (figure 25.a), ce qui indique qu'il ne s'agit pas de filaments d'actine résiduels après l'extraction par le KCl 0.6 M. L'immunocytochimie à l'or colloïdal avec l'anticorps dirigé contre le doublet de 54000-56000 du muscle d'oursin ne présente pas non plus de marquage, confirmant l'inexistence de protéines ayant les mêmes déterminants antigéniques dans ces deux tissus (figure 25.c). Ces filaments peuvent se présenter attachés à des structures denses aux électrons dispersés dans le cytoplasme, lesquelles doivent jouer un rôle d'ancrage analogue à celui des corpuscules denses ("dense bodies") (138) des muscles lisses des vertébrés.

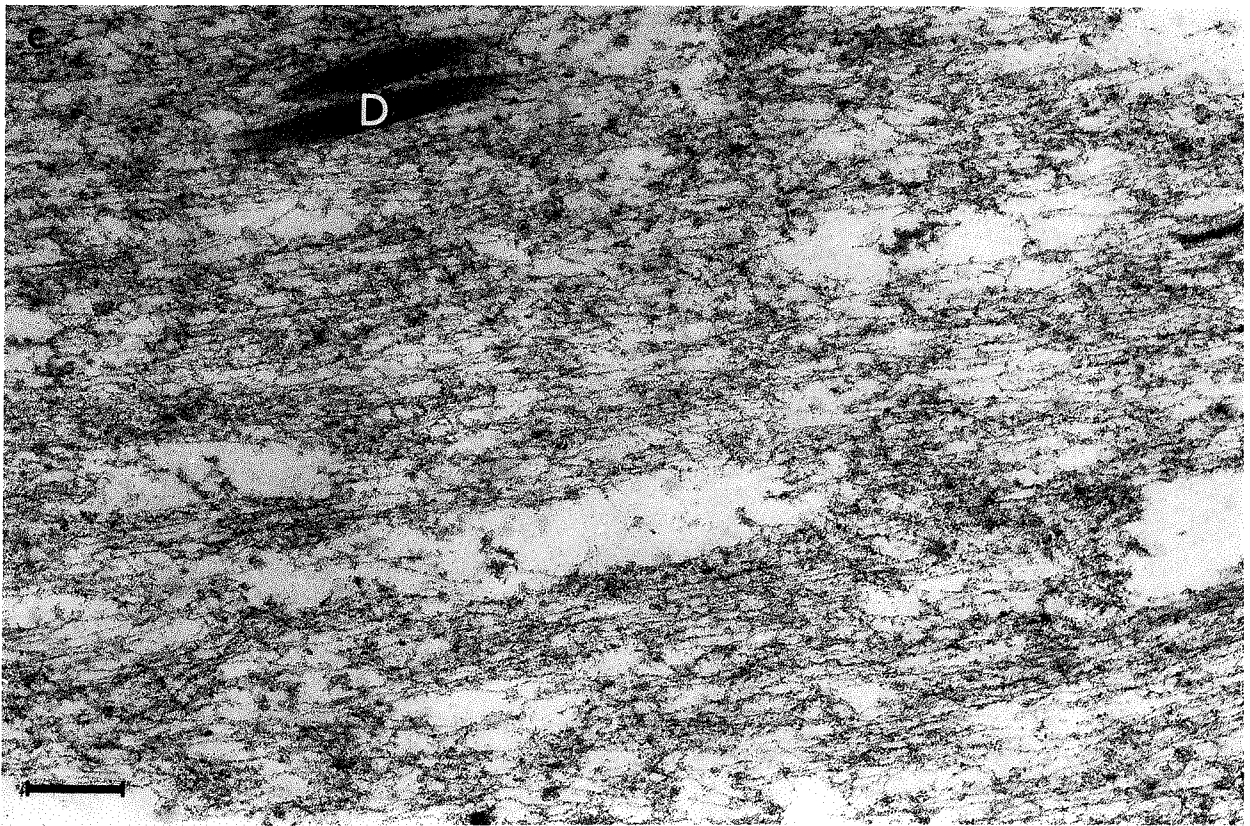
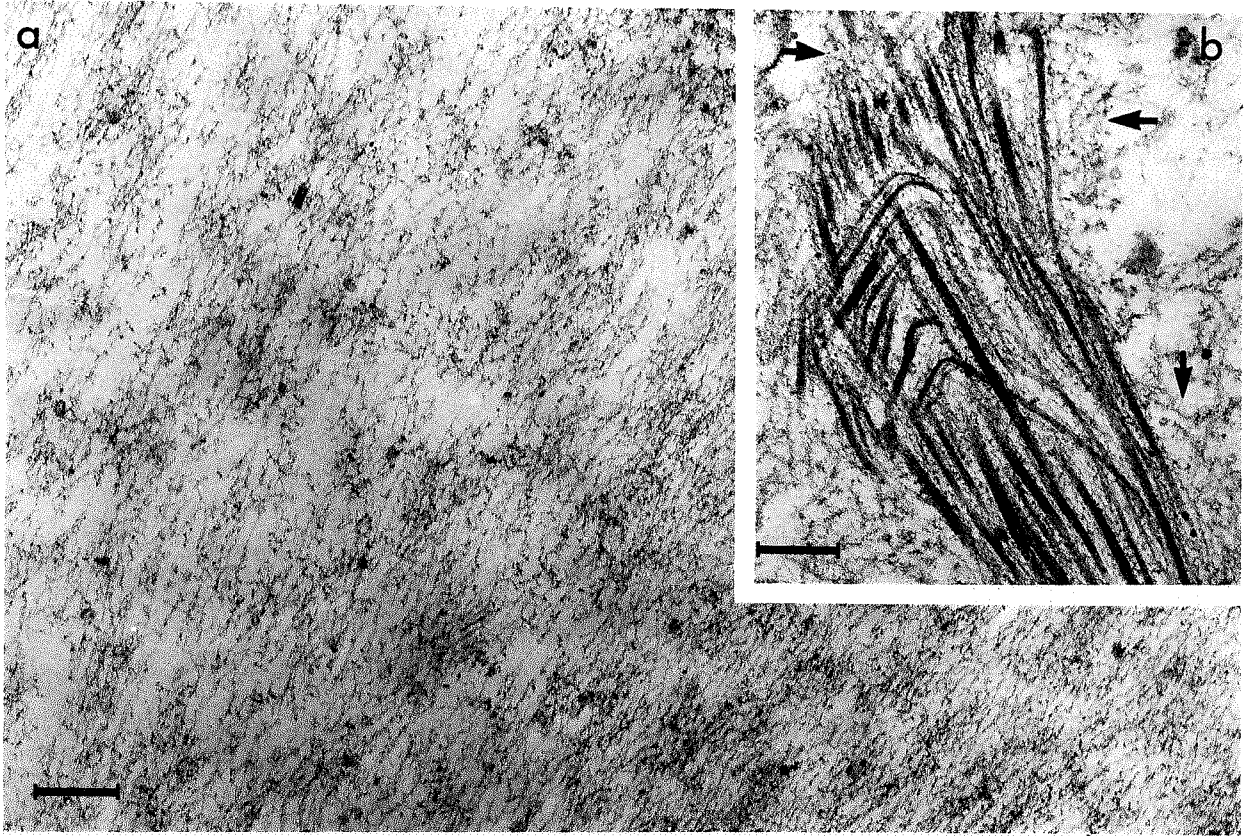
5. DISCUSSION

L'étude ultrastructurale du muscle lisse de l'intestin d'holothurie montre que l'organisation des filaments contractiles est typique des muscles lisses de vertébrés. Par contre, lors de l'extraction de ces protéines contractiles par du KCl 0.6 M, nous n'identifions pas la présence de filaments de 10 nm. Toutefois, nous avons mis en évidence

Figure 25. Microscopie électronique et immunocytochimie à l'or colloïdal du muscle lisse d'intestin d'holothurie.

(a) Coupe ultra-fine longitudinale du tissu extrait dans du KCl 0,6 M et traité par la HMM. Nous observons le réseau de filaments de 3-4 nm qui ne présentent pas de marquage; (b) coupe ultra-fine du tissu non extrait par le KCl et traité par la HMM. Le marquage sur les filaments d'actine est indiqué par des flèches; (c) coupe ultra-fine longitudinale du tissu extrait dans du KCl 0,6 M, incubé avec l'antisérum (dilué au 1:100) dirigé contre le doublet de 54000-56000 daltons du muscle d'oursin, puis incubé avec l'anti IgG de lapin couplé à l'or colloïdal. Nous n'identifions pas de marquage sur les filaments de 3-4 nm. Nous observons des structures denses aux électrons (D) qui semblent être des points d'ancrage des filaments de 3-4 nm.

(a) Grossissement: X 50000; bar = 0,2 μ ; (b) grossissement: X 42500; bar = 0,23 μ ; (c) grossissement: X 75000; bar = 0,2 μ .



l'existence d'un réseau de filaments de 3-4 nm de diamètre qui ressemblent à celui identifié dans le muscle lisse d'oursin.

Le profil électrophorétique des protéines du muscle lisse d'holothurie présente des analogies avec ceux des muscles de rat et d'oursin, surtout au niveau des protéines contractiles et des protéines de 54000-56000 daltons. Cependant, la protéine de 56000 daltons de l'holothurie ne présente ni les propriétés physico-chimiques de la desmine, ni celles de la vimentine. La protéine du muscle d'holothurie présente le même comportement vis-à-vis du KCl 1M que le doublet 54000-56000 daltons d'oursin. Toutefois, ces deux protéines ne possèdent pas les mêmes points isoélectriques. En outre, l'anticorps dirigé contre les protéines d'oursin ne présente pas de réaction croisée avec la protéine d'holothurie. Tout de même, cette protéine de 56000 daltons du muscle lisse d'holothurie apparaît comme le meilleur candidat à être un constituant des filaments de 3-4 nm du muscle de cet échinoderme. La préparation de l'anticorps dirigé contre cette protéine, qui est en cours dans notre laboratoire devra apporter la réponse à cette question.

Comme dans le cas du muscle lisse d'oursin, nous suggérons que la nouvelle catégorie de filaments de 3-4 nm que nous venons de mettre en évidence dans le muscle lisse d'holothurie constitue, avec les protéines contractiles, le cytosquelette de ces cellules. Les filaments de 3-4 nm remplaceraient les filaments de 10 nm du muscle lisse de vertébrés.

DISCUSSION GENERALE

Introduction et synthèse des résultats

Etude comparative entre des protéines du cytosquelette du muscle lisse de rat et d'échinodermes

L'ultrastructure des muscles lisses d'échinodermes

Identification des protéines constituant les filaments de 3-4 nm du muscle lisse d'oursin

Le cytosquelette de l'oeuf d'oursin non fécondé

Les filaments de 2-4 nm des cellules eucaryotes

Conclusion

DISCUSSION GENERALE

Introduction et synthèse des résultats

Le cytosquelette des muscles lisses de vertébrés est constitué de trois catégories de filaments : les filaments d'actine et ceux de myosine qui constituent les protéines contractiles et enfin les filaments intermédiaires qui semblent avoir un rôle de maintien de la forme de la cellule. Les filaments intermédiaires sont les constituants les plus insolubles du cytosquelette et se caractérisent par leur résistance à l'extraction dans des milieux de haute force ionique. Si la connaissance des propriétés physico-chimiques et immunologiques des protéines a beaucoup progressé ces dernières années, il n'y a que peu de données sur ces protéines dans les muscles d'invertébrés marins.

Dans cette thèse nous avons présenté une étude sur des protéines du cytosquelette du muscle lisse de deux échinodermes, le P. lividus et l'H. tubulosa. Il a été démontré que le cytosquelette du muscle de ces échinodermes ne contient pas de filaments intermédiaires. Par contre, il a été mis en évidence l'existence d'une nouvelle catégorie de filaments de 3-4 nm. Nous avons démontré que dans le muscle d'oursin ces filaments sont constitués par des protéines qui présentent le même poids moléculaire et un comportement de solubilité analogue à celui des protéines des filaments intermédiaires, dans un milieu de haute force ionique.

Nous avons étudié aussi l'expression de ces protéines dans l'oeuf d'oursin non fécondé et au cours du premier cycle mitotique. Les résultats indiquent que la cytomatrice de l'oeuf d'oursin non fécondé est constituée d'un réseau cortical de filaments de 3-4 nm et que parmi ceux-ci il y en a qui sont probablement de même nature que les filaments du muscle lisse d'oursin. Apparemment, la distribution de ces filaments dans le cytoplasme de l'oeuf ne change pas au cours du premier cycle mitotique.

Etude comparative entre des protéines du cytosquelette du muscle
lisse de rat et d'échinodermes

Le profil électrophorétique de la fraction résistante au traitement par le Triton X-100 des muscles lisses de rat, d'oursin et d'holothurie montre une analogie au niveau des chaînes polypeptiques majoritaires. Cette analogie est particulièrement importante au niveau des poids moléculaires de la myosine (220000 daltons), de la vimentine (56000 daltons), de la desmine (54000 daltons) et de l'actine (43000 daltons). Ces protéines constituent les trois systèmes de filaments présents dans les muscles lisses des vertébrés : les filaments d'actine, les filaments de myosine et les filaments intermédiaires.

Le fractionnement des protéines contractiles des muscles de rat de d'oursin selon la méthode classique de Sobieszek et Small (119) a montré que l'actomyosine du muscle lisse d'oursin présente le même comportement de solubilité que celle du rat : les deux sont solubles dans un milieu de faible force ionique en présence d'ATP. Ce comportement est typique de l'actomyosine des muscles lisses des vertébrés (102) .

Scholey et col. (148) et Suzuki et col. (149) ont montré que les filaments de myosine non phosphorylée (en absence de Ca^{++}) de muscle lisse de gésier et de thymus de poulet, peuvent être dissociés par l'ATP dans un milieu de force ionique "physiologique". Par contre, l'actomyosine du muscle lisse d'oursin, contrairement à celle du muscle lisse du rat et d'autres vertébrés (102) ne précipite pas en présence de cations divalents (Mg^{++}).

Nous avons démontré que les protéines de 54000 et de 56000 daltons du muscle lisse de rat correspondent à la desmine et à la vimentine respectivement. Ces deux protéines se trouvent dans la fraction résistante au Triton X-100 du muscle lisse de l'intestin de rat dans une proportion approximative de 2 : 1. Ces protéines sont résistantes au traitement dans du KCl 1M. Après leur extraction dans du SDS ; β -mercaptoéthanol bouillant et leur isolement par électrophorèse préparative, elles sont capables de co-polymériser in vitro dans les conditions décrites pour les filaments intermédiaires, formant des

filaments de 10 nm. Nos résultats montrent l'existence de la desmine et de la vimentine dans le muscle lisse d'intestin de rat, contrairement à ceux de Small et Sobieszek (100) qui ont démontré la présence de la desmine comme seul représentant des filaments intermédiaires de muscles lisses de différents vertébrés : gésier de poulet, intestin grêle et "vas deferens" de cochon d'Inde, carotide et estomac de porc. Par contre, la présence de la vimentine a été identifiée par immunofluorescence dans certaines cellules de muscle lisse de tissu vasculaire de rat, en culture primaire (101).

Quand les muscles lisses d'oursin et d'holothurie sont traités par le KCl 1M, le doublet de 54000-56000 daltons de l'oursin et la protéine de 56000 daltons de l'holothurie se montrent insolubles et sédimentables à 100 000 g. Ces protéines extraites à partir du culot 100 000 g par le SDS ; β -mercaptoéthanol bouillant, puis isolées par électrophorèse préparative ne sont pas capables de former de filaments in vitro dans les conditions utilisées pour les filaments intermédiaires du muscle de rat.

Les protéines de 54000-56000 daltons du muscle lisse d'oursin ne présentent ni les mêmes points isoélectriques ni les mêmes propriétés immunologiques que ceux de la desmine et de la vimentine. Ces résultats montrent qu'il n'existe pas, dans le muscle lisse de l'oursin, de protéines qui possèdent les mêmes propriétés physicochimiques et immunologiques des protéines du type filament intermédiaire des muscles de vertébrés.

En outre, la comparaison entre le doublet de 54000-56000 daltons de l'oursin, et la protéine de 56000 daltons de l'holothurie a montré que ces protéines ne présentent pas non plus les mêmes points isoélectriques ni les mêmes propriétés immunologiques.

L'ultrastructure des muscles lisses d'échinodermes

Les cellules des muscles lisses d'échinodermes étudiés sont fusiformes ayant la morphologie classique des cellules de muscles lisses de vertébrés (150).

L'étude ultrastructurale des cellules du muscle lisse de ces échinodermes montre que les filaments contractiles sont alignés longitudinalement par rapport à l'axe de la cellule, présentant une organisation uniforme et compacte dans le cytoplasme. Cette distribution est typique des muscles lisses des vertébrés (151).

Small et Sobieszek (100) ont mis en évidence un réseau de filaments de 10 nm dans des "fantômes" de cellules de muscle lisse d'intestin grêle de cochon d'Inde, obtenus après extraction dans du KCl 0.6 M. Les cellules extraites ont été fixées dans du glutaraldéhyde 2,5 %, puis traitées de la façon classique pour la microscopie électronique. D'après leurs résultats les filaments de 10 nm forment un réseau qui serait capable de maintenir la forme de la cellule. Les auteurs proposent que les filaments de 10 nm jouent un rôle de cytosquelette dans les cellules du muscle lisse des vertébrés. La même suggestion a été faite par Cooke (152) d'après ses expériences sur le gésier de poulet.

Toutefois, nous n'avons pas identifié la présence de filaments de 10 nm dans les muscles d'oursin et d'holothurie après l'extraction des protéines contractiles par le KCl 0.6 M. Par contre, après le traitement de ces cellules par le KCl, nous avons mis en évidence l'existence d'une nouvelle catégorie de filaments de 3-4 nm de diamètre. Ces filaments sont anastomosés formant un réseau dans le cytoplasme. Ils n'interagissent pas avec la HMM, indiquant ainsi qu'il ne s'agit pas de filaments d'actine résiduelle après l'extraction dans du KCl.

Nous proposons que le réseau de filaments de 3-4 nm que nous avons mis en évidence dans les muscles lisses des échinodermes étudiés constituent, avec les filaments contractiles, le cytosquelette de ces cellules. Ces filaments pourraient être responsables pour le maintien de la forme de la cellule et constitueraient le support mécanique du système contractile. Ce réseau de filaments remplacerait dans le muscle de ces échinodermes le réseau de filaments intermédiaires des muscles de vertébrés.

Identification des protéines constituant les filaments de 3-4 nm
du muscle lisse de l'oursin

Il a été démontré, par immunofluorescence indirecte avec l'anticorps dirigé contre les protéines de 54000-56000 daltons du muscle de l'oursin, que ces protéines se trouvent, même après l'extraction par le KCl, dans le cytoplasme des cellules musculaires isolées de cet échinoderme. L'immunocytochimie à l'or colloïdal après l'enlèvement des filaments contractiles a révélé que ces protéines sont associées aux filaments de 3-4 nm. Ces structures ont été appelées filaments d'échinonématine. Par contre, les protéines constituant les filaments de 3-4 nm du muscle lisse de l'holothurie ne présentent pas les mêmes déterminants antigéniques que les protéines du muscle de l'oursin. Ceci nous amène à supposer que ces filaments sont constitués par une famille de protéines qui ne présentent pas forcément les mêmes propriétés immunologiques.

Le cytosquelette de l'oeuf d'oursin non fécondé

Nous avons isolé pour la première fois la cytomatrice de l'oeuf d'oursin non fécondé et nous avons mis en évidence l'existence d'un réseau de filaments corticaux de 3-4 nm de diamètre dans cette structure. Ces filaments présentent le même diamètre que ceux identifiés dans les cellules de muscle lisse d'oursin, tritonnées puis extraites à haute force ionique. Les études ultrastructurales réalisées sur la cytomatrice de l'oeuf non fécondé n'ont révélé aucune présence de microtubules, de filaments de 10 nm ou de faisceaux de microfilaments. Ces filaments de 3-4 nm se trouvent surtout sous forme d'un réseau cortical. De rares filaments sont trouvés plus à l'intérieur de la cellule.

L'analyse des protéines de la cytomatrice par électrophorèse a montré l'existence de protéines de 54000-56000 daltons qui, lors du fractionnement à haute force ionique, se trouvent dans la fraction sédimentable à 100 000 g. Ces protéines isolées présentent les mêmes propriétés physico-chimiques et immunologiques que les protéines de même poids moléculaire du muscle d'oursin.

L'immunofluorescence indirecte sur la cytomatrice avec l'anticorps dirigé contre les protéines du muscle montre leur distribution uniforme dans le cytoplasme. Cette distribution ne semble pas être modifiée après fertilisation.

L'immunocytochimie à l'or colloïdal suggère que les protéines de 54000-56000 daltons sont associées à des filaments corticaux de 3-4 nm dans la cytomatrice de l'oeuf non fécondé. Cette technique réalisée sur des oeufs fécondés nous apportera des informations plus précises sur l'organisation de ces filaments au cours du cycle mitotique. Toutefois, nous avons jusqu'à présent des difficultés expérimentales pour assurer la pénétration des anticorps couplés à l'or colloïdal dans la cytomatrice après fécondation. Des expériences sont en cours dans notre laboratoire pour essayer de résoudre ce problème.

Nous proposons que ce réseau cortical de filaments de 3-4 nm que nous avons mis en évidence dans la cytomatrice joue un rôle de cytosquelette, étant impliqué dans la rigidité de l'oeuf non fécondé.

Les filaments de 2-4 nm dans des cellules eucaryotes

Récemment, une nouvelle catégorie de filaments d'environ 2-4 nm de diamètre est en train d'être mise en évidence dans des cellules eucaryotes. Vignes et col. (83) ont vérifié que le cytoplasme du protozoaire cilié I. prostoma est compartimentalisé par un système fibrillaire constitué d'une double couche de filaments de 4 nm de diamètre. Ces structures sont résistantes au traitement par le Triton X-100 à 1 % et à l'extraction par le KCl 1M. Ces auteurs ont démontré par immunocytochimie à l'or colloïdal que ces filaments sont constitués au moins par deux protéines de poids moléculaires de 22000-23000 daltons.

Capco et Pennam (153) ont démontré la présence d'un réseau de filaments insolubles dans du Triton X-100, associés aux chromosomes au cours de la mitose des cellules PTK2 en culture. Lors de la disparition de la membrane nucléaire ces filaments se confondent avec le réseau cytoplasmique. Ces auteurs considèrent que ce réseau de filaments

constitue le support mécanique des chromosomes. Ils ont aussi vérifié que les chromosomes conservaient leur position grâce à ce réseau de filaments même après dépolymérisation des microtubules.

La présence de filaments fins de 2-4 μm de diamètre a été identifiée par d'autres auteurs dans les muscles striés de différents vertébrés.

La titine 1 et 2 (154) ou l' α et β connectine (107) sont deux protéines de très haut poids moléculaire ($>10^6$ daltons) isolées de muscles striés de vertébrés. Ces protéines forment de longs filaments flexibles de 4-5 nm de diamètre associés aux lignes M, N_2 et Z de muscles squelettiques de lapin (109), de poulet (155) et de muscle cardiaque de grenouille (111). Par contre, ces protéines ne sont pas présentes dans les muscles lisses de vertébrés (156). Il est peu probable que les protéines de 54000-56000 daltons que nous avons mis en évidence dans le muscle lisse d'oursin soient des produits de dégradation de protéines de plus haut poids moléculaire. L'utilisation du mélange d'inhibiteurs de protéases tout au long de la préparation du tissu et du fractionnement des protéines rend cette hypothèse peu viable. A cet argument s'ajoute le fait que nous avons isolé à partir de l'oeuf des protéines qui présentent les mêmes propriétés physico-chimiques et immunologiques que celles de 54000-56000 daltons du muscle de l'oursin. Comme des protéines de très haut poids moléculaire de type titine ou connectine n'ont pas été identifiées de façon convaincante dans l'oeuf, nous ne pouvons pas supposer avoir isolé leurs produits de dégradation.

Les travaux cités ci-dessus, parmi d'autres, s'ajoutent à nos évidences expérimentales qui montrent l'existence d'une nouvelle catégorie de filaments qui constituent le cytosquelette des cellules eucaryotes. La connaissance de cette nouvelle catégorie de structures est encore incomplète, mais apparemment ces nouveaux éléments du cytosquelette sont formés d'une famille complexe de molécules présentant des poids moléculaires variables et des propriétés physico-chimiques et immunologiques différentes. L'interaction de ces filaments avec les autres éléments du cytosquelette n'est pas encore bien établie. Dans certains cas, ils sont directement associés à d'autres éléments du cytosquelette, comme les microtubules. C'est le cas des filaments de

tektine du flagelle de spermatozoïde d'oursin (82). Par contre, dans le cas des muscles d'échinodermes que nous avons étudié, les filaments de 3-4 nm semblent, au contraire, substituer un élément classique du cytosquelette, le réseau de filaments intermédiaires typiques des muscles lisses des vertébrés. Dans le cas de l'oeuf d'oursin non fécondé, ce réseau de filaments de 3-4 nm semble jouer un rôle de cytosquelette en absence d'autres catégories de filaments qui constituent le cytosquelette des cellules eucaryotes, comme les microtubules et les filaments de 10 nm.

Des nombreuses questions se posent encore sur cette nouvelle catégorie de filaments et beaucoup reste à faire pour essayer de comprendre leurs propriétés et leur fonction dans les cellules.

Conclusion

Ce travail a permis de mettre en évidence l'existence d'une nouvelle catégorie de filaments de 3-4 nm de diamètre qui constitue, avec les protéines contractiles, le cytosquelette du muscle lisse de deux échinodermes étudiés, le P. lividus et la H. tubulosa. Ces filaments forment un réseau qui semble remplacer, dans les cellules du muscle lisse de ces échinodermes, les filaments intermédiaires typiques des cellules du muscle lisse de vertébrés. Ils pourraient être responsables par le maintien de la forme de la cellule et constitueraient le support mécanique du système contractile.

Les études biochimiques et immunocytochimiques ont montré que les protéines de 54000-56000 daltons du muscle lisse d'oursin sont associées aux filaments de 3-4 nm que nous avons appelés filaments d'échinonématine.

Notre travail est le premier qui a permis l'isolement de la cytomatrice de l'oeuf d'oursin non activé. Cette cytomatrice contient des filaments corticaux de 3-4 nm. Ce travail a également révélé la présence de protéines de 54000-56000 daltons dans l'oeuf d'oursin qui présentent les mêmes propriétés physico-chimiques et immunologiques que

celles du muscle lisse d'oursin. Les résultats d'immunocytochimie à l'or colloïdal suggèrent que les protéines de 54000-56000 daltons de l'oeuf semblent être associées aux filaments de 3-4 nm. Ce réseau peut jouer un rôle de cytosquelette dans l'oeuf d'oursin non fécondé.

REFERENCES

1. DUJARDIN, F., *Ann. Sci. Natl. Zool. Anim.* 4, 343-377, 1835
2. HEIDENHAIN, M., *Arch. Mikrosk. Anat. Entwicklungsg* 54, 184-224, 1899
3. BUTSCHLI, D., *Untersuchungen über Strukturen*, Leipzig, 1898
4. DAHLGREN, U. and W.A. KEPNER, *Principles of Animal Histology*, The Macmillian Company, New York, 1908
5. PORTER, K.R., *J. Cell. Biol.* 99, 3S-12S, 1984
6. SCARTH, G.W., *Structural Differentiation of Cytoplasm in the Structure of Protoplasm: A Monograph of the American Society of Plant Physiologists*, W. Seifriz, editor. Iowa State College Press. Ames. Iowa, 99-107, 1942
7. BEANS, H.W. and R.L. KING, *Science (Wash. DC)* 84, 138, 1936
8. PEASE, D., *The Physical Structure of Nematode Egg Cytoplasm*, *Anat. Rec.* 87, 36, 1943
9. FREY-WYSSLING, A., *Submicroscopic Morphology of Protoplasm and its Derivatives*, 2nd ed., Elsevier Publishing Company, New York, 1948
10. CRICK, F.H.C. and A.F.W. HUGHES, *Exp. Cell. Res.* 1, 37-80, 1950
11. POLLARD, T.D. and S.W. CRAIG, *Trends Biochem. Sci.* 7, 55-58, 1982
12. WEISENBERG, R.C., *Science* 177, 1104-1105, 1972
13. TIMASHEFF, S.N., *Trends Biochem. Sci.* 4, 61-65, 1979
14. KIRCHNER, M.W., *Int. Rev. Cytol.* 54, 1-71, 1978
15. INOUE, S. and H. SATO, *J. Gen. Physiol.* 50, 259-292, 1967
16. TILNEY, L.G., Y. HIRAMOTO and D. MARSLAND, *J. Cell. Biol.* 29, 77-95, 1966
17. WOODRUM, D.T., S.A. RICH and T.D. POLLARD, *J. Cell. Biol.* 67, 231-237, 1975
18. BERGEN, L.G. and G.G. BORISY, *J. Cell. Biol.* 84, 141-150, 1980
19. WEGNER, A., *J. Mol. Biol.* 108, 139-150, 1976
20. KIRCHNER, M.W., *J. Cell. Biol.* 87, 330-334, 1980
21. MITCHISON, T. and M. KIRSHNER, *Nature* 312, 232-237, 1984
22. McINTOSH, J.R., *Nature* 312, 196-197, 1984
23. CARLIER, M.F. and D. PANTALONI, *Biochem.* 20, 1918-1924, 1981
24. LAZARIDES, E. and D.R. BALZER Jr., *Cell* 14, 429-438, 1978

25. FRANKE, W.W., E. SCHMID, K. WEBER and M. OSBORN, *Exp. Cell. Res.* 118, 95-109, 1979
26. BLACK, M.M. and R. LASEK, *J. Cell Biol.* 86, 616-623, 1980
27. STEINERT, P.M., J.R.C. JONES and R. GOLDMAN, *J. Cell Biol.* 99, 22 S - 27 S, 1984
28. STEINERT, P.M., *J. Mol. Biol.* 123, 49-70, 1978
29. ANDERTON, B.H., *J. Muscl. Res. Cell Motility* 2, 141-166, 1981
30. LAZARIDES, E., *Nature* 283, 249-256, 1980
31. GEISLER, N. and K. WEBER, *EMBO (Eur. Mol. Biol. Org.)J.* 2, 1295-1302, 1982
32. HANUKOGLU, I. and E.V. FUCHS, *Cell* 31, 243-252, 1982
33. HANUKOGLU, I. and E.V. FUCHS, *Cell* 33, 915-924, 1983
34. QUAX, W., W.V. EGBERTS, W. HENDRIKS, Y. QUAX-JEUKEN and H. BLOEMENDAL, *Cell* 35, 215-233, 1983
35. STEINERT, P.M., R.H. RICE, D.R. ROOP, B.L. TRUS and A.C. STEVEN, *Nature (Lond)* 302, 794-800, 1983
36. CREWETHER, W.G., L.M. DOWLING, D.A.D. PARRY and P.M. STEINERT, *Int. J. Biol. Macromol.* 5, 267-282, 1982
37. STEVEN, A.C., J.F. HAINFELD, B.L. TRUS, J.S. WALL and P.M. STEINERT, *J. Cell Biol.* 97, 1939-1944, 1983
38. GEISLER, N., E. KAUFMAN, S. FISCHER, U. PLESSMAN and K. WEBER, *EMBO (Eur. Mol. Biol. Org.)J.* 2, 1295-1302, 1983
39. STEINERT, P.M., W.W. IDLER and R.D. GOLDMAN, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 4534-4538, 1980
40. GRUEN, L.C. and E.F. WOODS, *Biochem. J.* 109, 587-598, 1983
41. AEBI, U., W.E. FOWLER, P. REW and T.T. SUN, *J. Cell Biol.* 97, 1131-1143, 1983
42. KRISHNAN, N., I.R. KAISERMAN-ABRAMOF and R.J. LASEK, *J. Cell Biol.* 82, 323-335, 1979
43. NELSON, W.J. and P. TRAUB, *Eur. J. Biochem.* 116, 51-57, 1981
44. GEIGER, B., A.H. DUTTON, K.T. TOKUYASU and S.J. SINGER, *J. Cell Biol.* 91, 614-628, 1981
45. PERRY, V. and R.J.A. GRAND, *Medical Bulletin* 35, 219-226, 1979
46. LIN, D.C., K.D. TOBIN, M. GRUMET, S. LIN, *J. Cell Biol.* 84, 455-460, 1980

47. STOSSEL, T.P., J. Cell Biol. 99, 15 S - 21 S, 1984
48. BURGESS, D.R. and T.E. SCHROEDER, J. Cell Biol. 74, 1032-1037, 1977
49. BYERS, H.R. and K. FUJIWARA, J. Cell Biol. 93, 804-811, 1982
50. WEHLAND, J., M. OSBORN and K. WEBER, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5613-5617, 1977
51. LAZARIDES, E. and K. WEBER, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 2268-2272, 1974
52. SANGER, J.M. and J.W. SANGER, J. Cell Biol. 86, 568-575, 1980

53. GEIGER, B., Z. AVNUR, G. RINNERTHALER, H. HINSSEN and V. SMALL, J. Cell Biol. 99, 83 S - 91 S, 1984
54. GLIGER, B., Cell 18, 289-298, 1979
55. ABERCROMBIE, M. and G. A. DUNN, Exp. Cell Res. 92, 57-62, 1975
56. TILNEY, L.G. and M.S. TILNEY, J. Cell Biol. 99, 76 S - 82 S, 1984
57. BERKALOFF, A., J. BOURGUET, P. FAVARD et J.-C. LACROIX in Biologie et Physiologie Cellulaires 1, 1977 Herman, Paris, Collection Méthodes, Chapitre 4, p. 193
58. SATIR, P., Sci. Am. 231 (4), 44-63, 1974
59. TUCKER, J., J. Cell Biol. 99, 55 S -62 S, 1984
60. SATIR, P., J. WAIS-STEIDER, S. LEBDUSKA, A. NASR, J. AVOLIO, Cell Motility 1, 303-307, 1981
61. POLLARD, T.D., S.C. SELDEN and P. MAUPIN, J. Cell Biol. 99, 33 S-37 S, 1984
62. FRANKE, W.W., E. SCHMID, D.L. SCHILLER, S. WINTER, E.D. JARASCH, R. MOLL, H. DENK, B.W. JACKSON and K. ILMANSEE, in Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, vol. XLVI - PART 1, 1981 pp. 431-441
63. FRANKE, W.W., S. WINTER, C. GRUND, E. SCHMID, D.L. SCHILLER and E.-D. JARASCH, J. Cell Biol. 90, 116-127, 1980
64. SUN, T.-T. and H. GREEN, Cell 14, 469-476, 1978
65. KNAPP, L.W., W.M. O'GUIN and R.H. SAWYER, J. Cell Biol. 97, 1788-1794, 1983
66. FRANKE, W., E. SCHMID, C. GRUND and B. GEIGER, Cell, 30, 103-113, 1982
67. STARGER, J.M., W. BROWN, A.E. GOLDMAN and R.D. GOLDMAN, J. Cell Biol., 78, 93-109, 1978
68. FRANKE, W.W., E. SCHMID, S. WINTER, M. OSBORN and K. WEBER, Exp. Cell Res. 123, 25-46, 1979

69. SCHLIWA, M. and J. van BLERKON, *J. Cell Biol.*, 90, 222-235, 1981
70. WILLARD, M. and C. SIMON, *J. Cell Biol.*, 89, 198-205, 1981
71. FALKNER, F.-G., H. SAUMWEBER and H. BIESSMANN, *J. Cell Biol.*, 91, 175-183, 1981
72. HARRIS, P. and G. SHAW, *Cell Tissue Res.*, 236, 27-33, 1984
73. LASEK, R.J., N. KRISHNAN and I.R. KAISERMAN-ABRAMOF, *J. Cell Biol.* 82, 336-346, 1979
74. ZACKROFF, R.V. and R.D. GOLDMAN, *Science* 208, 1152-1155, 1980
75. WEBSTER, R.E., M. OSBORN and K. WEBER, *Exp. Cell Res.* 117, 47-61 1978
76. PORTER, K.R. and J.B. TUCKER, *Sci. Am.* 244, 41-51 1981
77. WOLOSEWICK, J.J. and K.R. PORTER, *J. Cell Biol.* 82, 114-139, 1979
78. WOLOSEWICK, J.J. and K.R. PORTER, *J. Cell Biol.* 67, 460 a, 1975
79. SCHLIWA, M., *Exp. Cell Res.* 118, 323-340, 1979
80. STEARNS, M.E., *J. Cell Biol.* 99, 144 S - 151 S, 1984
81. ELLISMAN, M.H. and K.R. PORTER, *J. Cell Biol.* 87, 464-479 1980
82. LINCK, R.W., L.A. AMOS and W.B. AMOS, *J. Cell Biol.* 100, 126-135, 1985
83. VIGHES, B., G. METENIER and C.-A. GROLIERE, *Biol. Cell.* 51, 67-78, 1984
84. HIRAMOTO, Y., *Nature (London), Biorhealogy*, 6, 201-234; 1970
85. MARUYAMA, K., I. MABUCHI, S. MATSUBARA and K. OHASHI, *B.B.Acta*, 446, 321-324, 1976
86. MARUYAMA, K., R. NATORI and Y. NONOMURA, *Nature* 262, 58-60 1976
87. BEGG, D.A. and L.I. REBHUN, *J. Cell Biol.* 83, 241-248, 1979
88. COFFE, G., G. FOUCAULT, M.O. SOYER, F. de BILLY and J. PUDLES, *Exp. Cell Res.* 142, 365-372 1982
89. HIRAMOTO, Y., *Exp. Cell Res.* 89, 320-326, 1974
90. MAR, H., *Dev. Biol.* 78, 1-13 1980
91. SALMON, E.D., *Cell Diff.* 11, 353-355, 1982
92. GALL, L., B. PICHERAL and P. GOUNON, *Biol. Cell* 47, 331-342 1983
93. FRANZ, J.K., L. GALL, M.A. WILLIAMS, B. PICHERAL and W.W. FRANKE, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 6254-6258, 1983
94. LEHTONEN, E., V.-P. LEHTO, T. VARTIO, R.A. BADLEY and I. VIRTANEN, *Dev. Biol.* 100, 158-165, 1983

95. ALBERTS, B., D. BRAY, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS and J. D. WATSON in *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing, Inc. New York and London, 1983
96. SMALL, J.V., *Nature (London)* 249, 324-327, 1974
97. FISHER, B.A. and BAGBY, R.M., *Am. J. Physiol.* 232, C 5, 1977
98. SCHOLLMAYER, J.E., L.T. FURCHT, D.E. GOLL, R.M. ROBSON and M.H. STROMER in *Cell Motility*. R. Goldman, T. Pollard, J. Rosenbaum editors. Cold Spring Harbor Laboratory, 361-388, 1976
99. UEHARA, Y., G.R. CAMPBELL and G. BURNSTOCK, *J. Cell Biol.* 50, 484-497, 1971
100. SMALL, J.V. and A. SOBIESZEK, *J. Cell Sci.* 23, 243-268, 1977
101. TRAVO, P., K. WEBER and M. OSBORN, *Exp. Cell Res.* 139, 87-97, 1982
102. SMALL, J.V. and A. SOBIESZEK, *Inter. Rev. Cyt.* 64, 241-306, 1980
103. TOKUYASU, K.T., *J. Cell Biol.* 97, 562-565, 1983
104. TOKUYASU, K.T., A.H. DUTTON and S.J. SINGER, *J. Cell Biol.* 97, 1727-1735, 1983
105. WANG, K. and R. RAMIREZ-MITCHELL, *J. Cell Biol.* 96, 562-570, 1983
106. LAZARIDES, E., B.L. GRANGER, D.L. GARD, C.M. O'CONNOR, J. BRECKLEY, M. PRICE and S.I. DANTO. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. vol. XLVI part 1, 1981 pp 351-378
107. MARUYAMA, K., S. KIMURA, H. YOSHIDOMI, H. SAWADA and M. KIKUCHI, *J. Biochem.* 95, 1423-1433, 1984
108. WANG, K. and R. RAMIREZ-MITCHELL, *J. Cell Biol.* 83, 389 a, 1979
109. WANG, K. and C.L. WILLIAMSON, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 3254-3258, 1980
110. SAWADA, H., K. MARUYAMA and S. KIMURA, *Biomedical Res.* 4, (6), 603-606, 1983
111. TOYODA, N. and K. MARUYAMA, *J. Biochem.* 84, 239-241, 1978
112. LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR and R.J. RANDALL, *J. Biol. Chem.* 193, 265-268, 1951
113. GEIGER, P.J. and S.P. BESSMAN, *Anal. Biochem.* 49, 467-473, 1972
114. LAEMLI, U.K., *Nature* 227, 680-685, 1970
115. MERRIL, J., S. GOLDMAN, T. SEDMAN, C. EBERT, *Science* 211, 1437-1438, 1981
116. O'FARRELL, P.H., *J. Biol. Chem.* 250, 4007-4021, 1975
117. O'FARRELL, P.Z., H.M. GOODMAN, P.H. O'FARRELL, *Cell* 12, 1133-1142, 1977

118. COFFE, G., F.H. ROLA, M.O. SOYER and J. PUDLES, *Exp. Cell Res.* 137, 63-72, 1982
119. SOBIESZEK, A. and J.V. SMALL, *J. Mol. Biol.* 101, 75-92, 1976
120. HUIATT, T.W., R.M. ROBSON, N. ARAKAWA and M.H. STROMER, *J. Biol. Chem.* 255, 6981-6989, 1980
121. COHEN, J., A. ADOUTTE, S. GRANDCHAMP, L.-M. HOUDEBINE and J. BEISSON, *Biol. Cell* 44, 35-47, 1982
122. TOWBIN, H., T. STAHELIN and J. GORDON, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354, 1979
123. HAWKES, R., E. NIDAY and J. GORDON, *Anal. Biochem.* 119, 142-147, 1982
124. HARRIS, P., *Dev. Biol.* 96, 277-284, 1983
125. GRANGER, B.L. and E. LAZARIDES, *Cell* 18, 1053-1063, 1979
126. ISHIKAWA, H., R. BISCHOFF and H. HOLTZER, *J. Cell Biol.* 43, 312-328, 1969
127. SOYER, M.O., *Biol. Cell* 30, 297-300, 1977
128. BARNES, R.D. in *Invertebrate Zoology*, fourth edition. Holt-Saunders International Editions- 1982, chapitre 19 - The Echinoderms, page 925
129. FRANK, E.D. and L. WARREN, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 3020-3024, 1981
130. SELLERS, J.R., M.D. PATO and R.S. ADELSTEIN, *J. Biol. Chem.* 256, 13137-13142, 1981
131. STEINERT, P.M., W.W. IDLER, F. CABRAL, M.M. GOTTESMAN and R.D. GOLDMAN, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 3692-3696, 1981
132. LAZARIDES, E. and B.D. HUBBARD, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 4344-4348, 1976
133. HUBBARD, B.D. and E. LAZARIDES, *J. Cell Biol.* 80, 166- 182, 1979
134. GEISLER, N. and K. WEBER, *Eur. J. Biochem.* 111, 425-433, 1980
135. FRANKE, W.W., D.L. SCHILLER and C. GRUND, *Biol. Cell* 46, 257-268, 1982
136. SCHMID, E., M. OSBORN, E. RUNGGER-BRANDLE, G. GABBIANI, K. WEBER and W.W. FRANKE, *Exp. Cell Res.* 137, 329-340, 1982
137. HEUMANN, H.G., *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 265, 213-217, 1973
138. COOKE, P., in *Cell and Muscle Motility* ed. Dowben, R.M. and Shay, J.W., vol. 3, pp 57-77, Plenum Press, New York and London 1983

139. LINCK, R.W. and G.L. LANGEVIN, *J. Cell Sci.* 58, 1-10, 1982
140. HAYES, T.S. and E.D. SALMON, *J. Cell Biol.* 97, (pt 2), 44a, 1983
141. BESTOR, T.H. and G. SCHATTEN, *Dev. Biol.* 88, 80-91, 1981
142. MITCHISON, J.M. and M.M. SWANN, *J. Exp. Biol.* 32, 734-750, 1955
143. HARRIS, P., M. OSBORN and K. WEBER, *Exp. Cell Res.* 126, 227-236, 1980
144. ROSATI, F., *Monitori Zool. Ital. (N.S.)* 2, 49-86, 1968
145. ADELSTEIN, R.S., J.R. SELLERS, M.A. CONTI, M.D. PATO and P. de LANEROLLE, *Fed. Proc.* 41, 2873-2878, 1982
146. TOYOTA, N., T. OBINATA and K. TERAKADO, *Comp. Biochem. Physiol.*, 62B, 433-441, 1979
147. ADELSTEIN, R.S. and C.B. KLEE, *J. Biol. Chem.* 256, 7501-7509, 1981
148. SCHOLEY, J.M., K.A. TAYLOR and J. KENDRIK-JONES, *Nature (London)* 287, 233-235, 1980
149. SUZUKI, H., H. ONISHI, K. TAKAHASHI and S. WATANABE, *J. Biochem. (Tokyo)* 84, 1529-1542, 1978
150. RHODIN, J., *J. Ultrastruct. Res.* 18, 181-223, 1967
151. DOWBEN, R.M. and J.W. SHAY in *Cell and Muscle Motility*, vol. 3, 1983. Edited by R.M. Dowben and J.W. Shay, University of Texas Health Science Center, Dallas
152. COOKE, P.H., *J. Cell Biol.* 68, 539-556, 1976
153. CAPCO, D.G. and S. PENMAN, *J. Cell Biol.* 96, 896-906; 1983
154. WANG, K., R. RAMIREZ-MITCHELL and D. PALTER, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 3685-3689, 1984
155. WANG, K., J. McCLURE and A. TU, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 3698-3702, 1979
156. IKEDA, H., K. OHASHI and K. MARUYAMA, *Biomed. Res.* 4, 111-116, 1983

SUJET : Une nouvelle catégorie de filaments de 3-4 nm du cytosquelette de l'oeuf et du muscle lisse d'échinodermes.

Biochimie, immunocytochimie et ultrastructure.

RESUME :

Le travail présenté dans cette thèse a permis la caractérisation de protéines appartenant d'une part au cytosquelette des cellules du muscle lisse de l'intestin de deux échinodermes, Paracentrotus lividus et Holothuria tubulosa, ainsi que d'autre part à la cytomatrice de l'oeuf non fécondé de P. lividus.

Nous avons démontré par des techniques biochimiques, immunocytochimiques et ultrastructurales que les muscles lisses de ces invertébrés marins ne présentent pas de filaments de type intermédiaire. Par contre, nous avons mis en évidence l'existence d'un réseau constitué d'une nouvelle catégorie de filaments de 3-4 nm de diamètre qui forment, avec les protéines contractiles, le cytosquelette de ces cellules.

Dans le muscle lisse de P. lividus, nous démontrons que des protéines de 54000-56000 daltons sont associées à ces filaments de 3-4 nm. Cependant dans le muscle lisse de H. tubulosa, l'absence de réaction croisée avec l'anticorps dirigé contre les protéines de 54000-56000 daltons de l'oursin indique une grande spécificité d'espèce en ce qui concerne les protéines constituant ces réseaux de filaments.

La présence de ces protéines de cellules musculaires a également été mise en évidence dans l'oeuf de P. lividus. La cytomatrice de l'oeuf non fécondé contient un réseau cortical de filaments de 3-4 nm semblable à celui de la cellule musculaire. Nos résultats suggèrent que les protéines de 54000-56000 daltons sont associées aux filaments de 3-4 nm et nous proposons que ces filaments participent au cytosquelette de l'oeuf d'oursin non fécondé.

MOTS CLEFS :

Paracentrotus lividus - Holothuria tubulosa - Muscle lisse -
Oeuf - Cytosquelette - Filaments de 3-4 nm.