

50376
1980
182

Numéro d'ordre : 495

50376
1980
182

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

THÈSE

présentée

A L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

par

André DELACOURTE

MICROTUBULES ET NEUROFILAMENTS

ISOLEMENT ET ETUDE DE LEURS INTERACTIONS IN VITRO



soutenu le 28 novembre 1980 devant la Commission d'Examen

Président : M. M. DURCHON

Rapporteurs : M. G. BISERTE
M. D. PANTALONI
M. J. SCHRÉVEL

Examineurs : M. B. ANDERTON
M. P. DELORME

DOYENS HONORAIRES De l'Ancienne Faculté des Sciences

MM. R.DEFRETIN, H.LEFEBVRE, M.PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES des Anciennes Facultés de Droit
et Sciences Economiques, des Sciences et des Lettres

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER,
CORSIN, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P.GERMAIN, GLACET,
GONTIER, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOURGANOFF, LAMOTTE,
LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET,
MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARD, SCHILTZ, WATERLOT, WIEMAN,
ZAMANSKI.

PROFESSEUR EMERITE

M. A.LEBRUN.

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MM. R.DEFRETIN, M.PARREAU, J.LOMBARD.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. M.MIGEON.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M. TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
M. VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire

PROFESSEURS - 1ère Classe

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M. BECART Maurice	Physique Atomique et Moléculaire
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du Solide
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale

M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CELET Paul	Géologie Générale
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des Entreprises
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Génie Mécanique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique
M. LACOSTE Louis	Biologie Végétale
M. LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
M. LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme. LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M. LHOMME Jean	Chimie Organique Biologique
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. MAILLET Pierre	Sciences Economiques
M. PAQUET Jacques	Géologie Générale
M. POUZET Pierre	Analyse Numérique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. SALMER Georges	Electronique
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M. TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

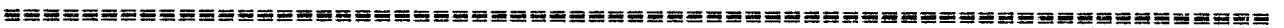
PROFESSEURS - 2ème Classe

M. AL FAKIR Sabah	Algèbre
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie Animale
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BOBE Bernard	Sciences Economiques
M. BODARD Marcel	Biologie Végétale
M. BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M. BOIVIN Jean-Claude	Chimie Minérale
M. BONNELLE Jean-Pierre	Catalyse
M. BOSCOQ Denis	Probabilités
M. BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M. BRIDOUX Michel	Chimie Physique
M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie Animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. CHAPOTON Alain	Electronique

M.	COQUERY Jean-Marie	Psychophysiology
Mme	CORSIN Paule	Paléontologie
M.	CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
M.	COUTURIER Daniel	Chimie Organique
M.	CRAMPON Norbert	Hydrogéologie et Environnement
M.	CROSNIER Yves	Electronique
Mle	DACHARRY Monique	Géographie
M.	DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M.	DEGAUQUE Pierre	Electronique
M.	DELORME Pierre	Physiologie Animale
M.	DEMUNTER Paul	Sociologie
M.	DE PARIS Jean-Claude	Analyse
M.	DEPREZ Gilbert	Physique du Solide et Cristallographie
M.	DERIEUX Jean-Claude	Microbiologie
Mle	DESSAUX Odile	Spectroscopie de la Réactivité Chimique
M.	DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M.	DHAINAUT André	Biologie Animale
Mme	DHAINAUT Nicole	Biologie Animale
M.	DORMARD Serge	Sciences Economiques
M.	DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
M.	DUBOIS Henri	Spectroscopie Hertzienne
M.	DUBRULLE Alain	Spectroscopie Hertzienne
M.	DUEE Gérard	Géologie
M.	DYMENT Arthur	Mécanique
Mme	EVRARD Micheline	Chimie Appliquée
M.	FLAMME Jean-Marie	Technologie de Construction
M.	FONTAINE Hubert	Dynamique des Cristaux
M.	FONTAINE Jacques	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M.	FOURNET Bernard	Biochimie Structurale
M.	GERVAIS Michel	Gestion
M.	GLORIEUX Pierre	Physique Moléculaire et Rayonnements Atmosphériques
M.	GOBLOT Rémi	Algèbre
M.	GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M.	GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M.	GREVET Patrick	Sciences Economiques
M.	GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M.	HENRY Jean-Pierre	Génie Mécanique
M.	HERMAN Maurice	Physique Spatiale
M.	HOUDART René	Physique Atomique et Moléculaire
M.	JACOB Gérard	Informatique
M.	JACOB Pierre	Probabilités et Statistiques
M.	JACQUILLAT Bertrand	Gestion
M.	JOURNEL Gérard	Spectroscopie Hertzienne
M.	KREMBEL Jean	Biochimie
M.	LAURENT François	Automatique
Mme	LECLERCQ Ginette	Catalyse
Mle	LEGRAND Denise	Algèbre
Mle	LEGRAND Solange	Algèbre
Mme	LEHMANN Josiane	Analyse
M.	LEMAIRE Jean	Spectroscopie Hertzienne
M.	LENTACKER Firmin	Géographie
M.	LEROY Jean-Marie	Méthodologie
M.	LEROY Yves	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M.	LEVASSEUR Michel	Sciences Economiques
M.	LHENAFF René	Géographie
M.	LOCQUENEUX Robert	Physique Théorique
M.	LOSFELD Joseph	Informatique
M.	LOUAGE Francis	Electronique
M.	MACKE Bruno	Physique Moléculaire et Rayonnements Atmosphériques

M. MAHIEU Jean-Marie	Physique Atomique et Moléculaire
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M ^{le} MARQUET Simone	Probabilités
M. MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. MIGEON Michel	Chimie Physique
M. MIGNOT Fulbert	Analyse Numérique
M. MONTEL Marc	Physique du Solide
M. MONTUELLE Bernard	Biologie et Biochimie Appliquées
M ^{me} N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. NICOLE Jacques	Chimie Analytique
M. NOTELET Francis	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. PARSY Fernand	Mécanique
M ^{le} PAUPARDIN Colette	Biologie Physiologie Végétales
M. PECQUE Marcel	Chimie Organique
M. PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M. PETIT Francis	Chimie Organique, Minérale et Analytique
M. PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M. PORCHET Maurice	Biologie Animale
M. POVY Lucien	Automatique
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. RAOULT Jean-François	Géologie Structurale
M. RICHARD Alain	Biologie Animale
M. RIETSCH François	Physique des Polymères
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. ROY Jean-Claude	Psychophysiologie
M. SALAMA Pierre	Sciences Economiques
M ^{me} SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
M. SCHAMPS Joël	Spectroscopie Moléculaire
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SLIWA Henri	Chimie Organique
M. SOMME Jean	Géographie
M ^{le} SPIK Geneviève	Biochimie
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Génie Alimentaire
M. THERY Pierre	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. TOULOTTE Jean-Marc	Automatique
M. VANDORPE Bernard	Chimie Minérale
M. VERBERT André	Biochimie
M. VILETTE Michel	Résistance des Matériaux
M. WALLART Francis	Spectrochimie Infrarouge et Raman
M. WATERLOT Michel	Géologie Générale
M. WERNER Georges	Informatique Fondamentale Appliquée
M ^{me} ZINN-JUSTIN Nicole	Algèbre

M I C R O T U B U L E S E T N E U R O F I L A M E N T S :



ISOLEMENT ET ETUDE DE LEURS INTERACTIONS IN VITRO

J'aimerais que Monsieur le Professeur DURCHON, qui m'a fait l'honneur de présider ce jury, trouve dans ces quelques lignes l'expression de ma profonde admiration.

Votre enseignement, Monsieur le Professeur, m'a toujours passionné et impressionné. Il m'en est resté un vif désir d'orienter mes recherches vers l'étude de l'évolution des espèces et de la différenciation de la cellule. Les neurofilaments m'ont donné l'occasion de commencer ces recherches, que je souhaiterais appliquer ensuite à l'étude de l'évolution et de la différenciation du cytosquelette de la cellule nerveuse.

Je tiens à remercier tout particulièrement Monsieur le Professeur BISERTE qui m'a confié ce thème de recherche très intéressant et a dirigé ce travail. C'est grâce à vous que j'ai pu trouver un poste d'Assistant dans le département de Biochimie du Professeur PAUL BOULANGER, et depuis 1969, vous m'avez toujours conseillé dans mon travail de recherche (c'est sous votre direction que j'ai obtenu ma thèse de troisième cycle et mon D.E.R.B.H sur les myoglobines).

Je vous remercie également de m'avoir fait confiance lorsque j'ai voulu orienter mon travail vers l'étude des filaments de 10 nanomètres. Ce travail de thèse a été passionnant, et, s'il a débouché sur des résultats positifs, cela vous est dû entièrement. Que cette thèse soit le témoignage de ma profonde reconnaissance et de mon sincère attachement.

C'est avec gratitude que je remercie Monsieur le Docteur PANTALONI qui a accepté de juger cette thèse.

Votre rôle a été capital dans l'évolution rapide des recherches sur les microtubules en FRANCE. En dirigeant la R.C.P "Structure et Fonction des microtubules", vous avez été l'instigateur de nombreuses coopérations scientifiques entre différents laboratoires français. Notre collaboration avec votre équipe, avec celle de Monsieur le Professeur SCHREVEL et avec le Docteur LUIGI DI GIAMBERARDINO en est la meilleure preuve.

D'autre part, vous avez su élever votre équipe de recherches au plus haut niveau mondial en quelques années, et j'avoue être très admiratif pour ce que vous avez fait.

De plus, votre laboratoire est devenu un lieu de rencontre où passent les meilleurs spécialistes mondiaux.

L'avantage que nous en retirons est très grand puisque notre petite équipe de province n'a pas besoin de traverser l'Atlantique pour connaître les derniers développements de la recherche mondiale.

Je suis très fier et très reconnaissant de vous avoir dans mon jury de thèse.

Qu'il me soit également permis d'exprimer à Monsieur le Professeur SCHREVEL ma très sincère reconnaissance pour avoir accepté de juger cette thèse.

Vous êtes un éminent spécialiste du cytosquelette des unicellulaires, ainsi que des systèmes microtubulaires des cils et des flagelles.

A ce titre, je suis heureux de vous avoir parmi les membres du jury.

Je vous remercie également pour les services que vous m'avez rendus.

Votre collaboration a été décisive pour la mise en évidence de la contamination membranaire dans les préparations de filaments de 10 nm. Vous m'avez permis d'avancer rapidement dans ce domaine de recherche où la concurrence américaine ne nous ménage pas.

Votre très grande compétence rend votre jugement important et vos conseils particulièrement précieux.

Je remercie très vivement Monsieur le Professeur ANDERTON de m'avoir accueilli aussi gentiment dans son laboratoire.

A un moment où mon thème de recherche était freiné par des résultats erronés sur la composition en protéines des neurofilaments publiés dans la littérature, je remercie la providence qui a favorisé notre rencontre. Cette collaboration m'a été très profitable. Je ne pourrais jamais vous remercier assez pour tout ce que vous avez fait pour moi.

Je suis heureux et fier d'avoir dans mon jury de thèse, en votre personne, un des meilleurs spécialistes des neurofilaments et des filaments intermédiaires.

Je suis reconnaissant à Monsieur le Professeur DELORME qui, en sa qualité de spécialiste de Neurophysiologie, a bien voulu juger cette thèse. J'espère que cette thèse sera l'amorce d'une collaboration étroite entre nos deux laboratoires.

Je tiens également à remercier Monsieur le Professeur DAUTREVAUX, chez qui j'ai commencé de travail de thèse et Monsieur le Professeur ROUSSEL, Directeur

de l'Unité INSERM n° 16, qui m'a donné les moyens financiers et techniques pour réaliser ce travail.

L'étude sur les neurofilaments de Poulet a été menée en collaboration avec le Docteur LUIGI DI GIAMBERARDINO et le Docteur FILLIATREAU; qu'ils trouvent ici le témoignage de mon amitié.

Je tiens tout particulièrement à remercier FRANCOISE BOUTTEAU, technicienne affectée à mon laboratoire, pour l'aide précieuse qu'elle m'a apportée dans la réalisation de ce travail.

Elle a su adapter et concrétiser mes hypothèses de travail avec une grande efficacité et avec beaucoup de brio.

Je remercie les chercheurs qui ont participé à ce travail, Madame PLANCOT-BELIN, et Messieurs Frédéric HILDEBRAND, Yvan KRIVOSIC et Yves PLANCKE.

Je remercie également tous les chercheurs et techniciens du Département de Biochimie, pour l'aide qu'ils m'ont apporté dans diverses circonstances, notamment Monique DAVRIL, Mchèle LOHEZ, Geneviève LAMBLIN, Michel LHERMITTE, Daniel TETEART, Xavier-Grandier VAZEILLE et Joseph KIA-KI HAN.

Le travail que nous présentons a été réalisé dans les laboratoires de l'Unité de Recherches sur la Biochimie des Protéines (Unité n°16 de l'INSERM) créée par Monsieur le Professeur Paul BOULANGER et actuellement dirigée par Monsieur le Professeur Philippe ROUSSEL.

Il a été effectué sous la direction de Monsieur le Professeur Gérard BISERTE, Directeur du Laboratoire Associé au C.N.R.S n° 268.

Ce travail a pu être mené à bien grâce à l'aide financière:

- de l'Unité INSERM n°16
- du Laboratoire Associé au C.N.R.S (n° 268).
- de la Recherche Concertée Programmée C.N.R.S n° 386
"STRUCTURES ET FONCTIONS DES MICROTUBULES". Directeur: D. PANTALONI.
- de l'A.T.P "BIOLOGIE DU NEURONE". Contrat D.G.R.S.T n° 78-7-2767
Responsable: A. DELACOURTE
- du laboratoire de Monsieur le Professeur Brian ANDERTON, Chelsea College
Londres. (Adresse actuelle: St GEORGE'S HOSPITAL MEDICAL SCHOOL, SW 17 0RE).
- de l'European Molecular Biology Organization (short term EMBO fellowship)
- du Laboratoire Associé au C.N.R.S n° 290, Laboratoire de Biologie Cellulaire: Professeur J. SCHREVEL.
- du Département de Biologie du C.E.N de Saclay: Professeur J. DROZ.

TABLE DES MATIERES

- PUBLICATIONS SUR LE SUJET	pages	6
- LISTE DES ABREVIATIONS		9
<u>I) R É S U M É</u>		10
<u>II) DÉFINITION DE NOTRE THÈME DE RECHERCHE</u>		16
<u>III) GÉNÉRALITÉS</u>		
<u>I) DESCRIPTION DES DIFFERENTS TYPES DE FILAMENTS DU CYTOSQUELETTE DES CELLULES NERVEUSES</u>		17
A) <u>Les filaments trabéculaires</u>		
B) <u>Les microfilaments</u>		
C) <u>Les filaments de 10 nm</u>		18
D) <u>Les filaments de myosine</u>		19
E) <u>Les microtubules</u>		19
<u>II) LES MICROTUBULES</u>		
A) <u>Description</u>		21
B) <u>Biochimie de la tubuline</u>		24
a) Structure primaire		
b) La tubuline et ses ligands		
C) <u>Les neurotubules</u>		29
D) <u>Mécanismes de polymérisation des microtubules</u>		30
a) Stabilité des microtubules		
b) Polymérisation des microtubules		
E) <u>Composition en protéines des neurotubules.</u>		34

III) <u>LES NEUROFILAMENTS DE MAMMIFERES</u>	38
A) Historique	39
B) Les neurofilaments d'invertébrés	42
IV) <u>FONCTION DES NEUROTUBULES ET DES NEUROFILAMENTS</u>	
A) Neurones et cellules gliales dans le système nerveux	46
B) Equilibre microtubules-neurofilaments	51
C) Neurotubules et neurofilaments dans le transport axonal lent	53

IV -CHAPITRE TECHNIQUE

I) <u>PREPARATION DES MICROTUBULES</u>	58
II) <u>PREPARATION DES FILAMENTS DE 10 nm</u>	60
III) <u>ETUDE MORPHOLOGIQUE</u>	61
A) Contraste négatif	
B) Fixation et inclusion	
IV) <u>ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE EN MILIEU SDS</u>	
A) Principe	66
B) Méthodologie	70
C) Comparaison de deux protéines par la technique des finger-prints	72
V) <u>GEL-FILTRATION</u>	75
A) Purification des filaments de 10 nm	
B) Séparation des protéines de neurofilaments	

V) RESULTATS

I) <u>MISE EN EVIDENCE DE L'ISOLEMENT DE FILAMENTS DE 10 nm</u> <u>AU COURS DES CYCLES DE PREPARATION DES MICROTUBULES</u>	
A) Purification des filaments de 10 nm	77
B) Etude morphologique	79
C) Composition en protéines	82
II) <u>COMPARAISON DES FILAMENTS DE 10 nm AVEC</u> <u>LES NEUROFILAMENTS</u>	
A) Comparaison par électrophorèse-SDS	87
B) Comparaison par la technique des cartes peptidiques.	90
III) <u>ORIGINE DE LA TUBULINE DANS LES PREPARATIONS</u> <u>DE FILAMENTS DE 10 nm</u>	
A) Analyse et comparaison des préparations à partir de substrats différents	96
B) Purification des filaments de 10 nm par gel-filtration	101
C) Conclusion	103
IV) <u>MISE AU POINT D'UNE METHODE DE PREPARATION</u> <u>DES NEUROFILAMENTS</u>	104
V) <u>SEPARATION DES PROTEINES DU TRIPLET PAR</u> <u>GEL-FILTRATION ET RECONSTITUTION DES NEUROFILAMENTS</u>	107
VI) <u>MISE AU POINT D'UNE METHODE D'EXTRACTION DES</u> <u>PROTEINES DE NEUROFILAMENTS</u>	115
VII) <u>DETERMINATION DE LA COMPOSITION EN PROTEINES</u> <u>DES NEUROFILAMENTS D'OISEAUX</u>	119

VIII)	<u>ISOLEMENT ET ETUDE DES MICROFIBRILLES FORMEES</u>	128
	<u>PARTIR DES PROTEINES MICROTUBULAIRES DE PREMIER CYCLE</u>	
IX)	<u>CONCLUSION GENERALE</u>	137
VI)	<u>REFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	154

PUBLICATIONS SUR LE SUJET

- A) DELACOURTE, A., PLANCOT, M. T., HAN, K-K., HILDEBRAND, H. F and BISERTE, G.
Investigation of tubulin fibers formed during microtubule polymerization cycles.
FEBS Letters, 1977, 77, 41-46
- B) DELACOURTE, A., PLANCOT, M-T., BOUTTEAU, F., HAN, K-K., HILDEBRAND, H.,
and BISERTE, G.
Préparation de microtubules hautement purifiés et mise en évidence d'un arrangement nouveau des molécules de tubuline à basse température
Biochimie, 1977, 59, 479-486.
- C) THORPE, R., DELACOURTE, A., AYERS, M., BULLOCK, C and ANDERTON, B.H.
The polypeptides of isolated brain 10 nm filaments and their association with polymerized tubulin.
Biochem. J, 1979, 181, 275-284.
- D) THORPE, R., DELACOURTE, A and ANDERTON, B.H.
The isolation of brain 10 nm filament polypeptides from urea extracts of brain white matter.
FEBS Letters, 1979, 103, 148-151.
- E) DELACOURTE, A., FILLIATREAU, G., BOUTTEAU, F., BISERTE, G and SCHREVEL, J.
Study of the 10 nm filament fraction isolated during the standard microtubule preparation.
Biochem. J, 1980, 191, 543-546.

AFFICHES PRESENTEES SUR LE SUJET ET PUBLIEES

- A) DELACOURTE, A., BELIN, M.T., HILDEBRAND, H.F and BISERTE, G.
Separation of pig brain microtubular proteins into three distinct fractions: microtubules, 10 nm filaments and microfibrils.
Cytobiologie, 1978, 18, 194. Heidelberg.
- B) BELIN, M-T., DELACOURTE, A and HILDEBRAND, F.
In vitro interaction of neurotubular and 10 nm filament protein of pig brain: formation of the microfibrillar network.
Cytobiologie, 1978, 18, 193-194. Heidelberg.
- C) DELACOURTE, A., KRIVOSIC, I., BOUTTEAU, F et BISERTE, G.
Composition en protéines des neurofilaments de mammifères.
Biologie Cellulaire, 1979, 35, 57a. Paris.
- D) PLANCKE, Y and DELACOURTE, A.
Removing of tubulin from neurofilaments obtained during the early cycles of microtubule preparation.
Biologie Cellulaire, 1980, 39, 21a. Paris.

COMMUNICATIONS

- α) DELACOURTE, A., BISERTE, G., ANDERTON, B and THORPE, R.
Proteins commun to mammalian brain neurofilaments and the 10 nm filaments formed during microtubule assembly.
Forum des Jeunes de la Société de Chimie Biologique, 1978, Villeneuve d'Asq.
- β) DELACOURTE, A., BOUTTEAU, F., BISERTE, G and SCHREVEL, J.
Study of the 10 nm filaments isolated during neurotubule preparations.
Communication au colloque de la Société de Chimie Biologique 1980. Montpellier. Motilité cellulaire.
- γ) FILLIATREAU, G., DI GIAMBERARDINO, L., DELACOURTE, A., BOUTTEAU, F and BISERTE, G.
Identification of the subunits of avian neurofilaments.
Communication au colloque de la Société de Chimie Biologique 1980. Montpellier. Motilité cellulaire.

Nous avons, en outre, collaboré à d'autres travaux qui ne s'inscrivent pas directement dans le cadre de ce mémoire, mais s'adressent à l'étude des microtubules, notamment l'article suivant:

- A) DELACOURTE, A., BOUTTEAU, F., BISERTE, G., CAZIN, M., CAZIN, J.C., BRUNET, C., LESIEUR, I and LUYCKX, M.

Mannich bases: β -(4-methyl piperazinyl)propiofenone hydrochloride: A new antimicrotubular drug.

Acta Therapeutica. 1980, 6, 12-22.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

(par ordre alphabétique)

DTT : dithiotreitol

EDTA : éthylène diamine tétraacétate

EGTA : éthylène glycol tétraacétate

GFA(P) : Glial Fibrillary Acidic Protein

IDPN : β, β' -Imino-dipropionitrile

MAP(s) : Microtubule Associated Proteins

Mes : acide 2-(N-morpholino)éthane sulfonique

MTs : Microtubules

NFs : Neurofilaments

NF 210 , NF 160 , NF 70 : Désignation des trois protéines constitutives des neurofilaments, appelées également le Triplet des neurofilaments

S : coefficient de sédimentation

SDS : dodecyl sulfate de sodium

Triplet : désignation des trois protéines constitutives des neurofilaments

Tris : tri hydroxymethyl amino méthane

1) R É S U M É

Les microtubules sont généralement préparés selon la méthode décrite par SHELANSKI et al (1973), qui consiste à faire des cycles répétitifs de polymérisation et de dépolymérisation de microtubules in vitro et à éliminer, au cours de ces cycles, le matériel qui ne participe pas à la formation des microtubules.

Nous avons entrepris une étude des protéines accessoires isolées dans les préparations de microtubules et obtenu les résultats suivants:

A) Mise en évidence de l'isolement de filaments de 10 nanomètres (10 nm) au cours des cycles de préparation des microtubules.

Nous avons montré que le matériel sédimentable éliminé au cours des deux premiers cycles de préparation des microtubules est constitué essentiellement de filaments d'un diamètre constant de 10 nm.

La fraction contenant ces filaments est constituée d'une protéine majeure possédant le même comportement électrophorétique que la tubuline, et de trois protéines de poids moléculaire 210,160 et 70 K (K=kilodalton).

Le GTP n'intervient pas sur la quantité de filaments obtenue et il est possible de purifier la préparation de filaments de 10 nm en les traitant avec un tampon de force ionique élevée (DELACOURTE et al., 1977-a).

B) Comparaison des filaments de 10 nm avec les neurofilaments

En collaboration avec l'équipe du Professeur ANDERTON du Chelsea College à LONDRES, nous avons montré:

-que la protéine majeure de la préparation de filaments de 10 nm est bien la tubuline.

-que les trois protéines 210,160 et 70 K possèdent le même

comportement électrophorétique que les trois protéines qui constituent les neurofilaments.

Une comparaison de ces protéines par la technique très fine des cartes peptidiques sur gel d'acrylamide en milieu dénaturant a montré qu'il s'agissait des mêmes protéines (THORPE, DELACOURTE, AYERS, BULLOCK et ANDERTON, 1979-a).

C) Origine de la tubuline dans les préparations de filaments de 10 nm.

Il restait à résoudre le problème de la présence de la tubuline dans les préparations de filaments de 10 nm. Cette présence peut s'expliquer par une interaction in vivo et in vitro entre les microtubules et les neurofilaments ou par le fait que la tubuline constitue une partie intégrante des filaments de 10 nm (DELACOURTE et al., 1979).

Nous avons observé que les préparations de filaments de 10 nm contenaient beaucoup de matériel d'origine membranaire. La mise au point d'une préparation de filaments sans aucune contamination membranaire a permis d'observer la disparition simultanée de la tubuline.

D'autre part, FEIT et SHAY (1980) ont montré que la tubuline pouvait interagir très fortement avec les membranes in vitro. Nous pensons donc que la présence de la tubuline dans les préparations n'est pas en rapport avec des interactions microtubules-neurofilaments mais plutôt liée à la contamination membranaire (DELACOURTE et al., 1980, a-b).

D) Mise au point d'une méthode de préparation de neurofilaments

Cette méthode est fondée sur le fait que le protocole de purification des microtubules permet également d'isoler une fraction riche en neurofilaments.

Lorsque ce protocole est appliqué sur un substrat très riche en neurofilaments comme la moelle de boeuf, nous

observons une amélioration très nette des rendements obtenus.

A partir de 100 g de moelle de boeuf, nous obtenons 100 mg d'un matériel qui n'est pas contaminé par du matériel membranaire et qui contient 65% de protéines de neurofilaments (10% pour les préparations décrites dans la littérature). De plus, notre préparation ne contient que 9 % du composant 50 K qui est d'origine gliale et qui représente de 30 à 40% pour les préparations décrites.

L'aspect de ces filaments est identique à celui des neurofilaments décrits dans la littérature (DELACOURTE et al., 1980-b).

F) Séparation des protéines de neurofilaments par gel-filtration et reconstitution in vitro

Les neurofilaments isolés selon la méthode décrite précédemment ont été dissociés dans un tampon chlorhydrate de guanidine 5 M et les sous-unités protéiques ont été séparées par gel-filtration en utilisant le même tampon dénaturant.

Nous avons obtenu trois fractions distinctes contenant:

- A) les protéines 210 K et 160 K
- B) les protéines 160 K et 70 K
- C) la protéine 70 K contenant la protéine 160 K à l'état de traces.

Nous avons également isolé une quatrième fraction D qui est en réalité un mélange des fractions A, B et C.

Après dialyse des différentes fractions contre du tampon Mes^(*), nous avons observé une reconstitution de filaments de 10 nm avec les fractions B et D, et de filaments de 6 nm pour la fraction A, et de filaments courts et larges (20 nm) et mal définis avec la fraction C.

(*) voir la liste des abréviations.

Cette méthodologie semble donc convenir parfaitement pour une approche plus détaillée de l'étude des mécanismes de polymérisation des neurofilaments.

F) Mise au point d'une méthode d'extraction des protéines de neurofilaments.

Cette méthode est fondée sur le principe selon lequel les neurofilaments ne sont pas solubilisés dans des tampons de force ionique élevée et qu'ils peuvent être dissociés et solubilisés spécifiquement dans des tampons dénaturants (urée 8 M ou chlorhydrate de guanidine 5 M).

Elle permet d'isoler rapidement les protéines de neurofilaments pour leur étude chimique ou pour la fabrication d'anticorps spécifiques (THORPE, DELACOURTE et ANDERTON, 1979-b).

G) Détermination de la composition en protéines des neurofilaments d'Oiseaux.

Avec la technique décrite précédemment, nous avons pu déterminer la composition en protéines des neurofilaments d'Oiseaux (Poulet et Dindon) et montrer que ceux-ci étaient constitués essentiellement de trois protéines de poids moléculaires 205, 156 et 69 K (FILLIATREAU, DELACOURTE, DI GIAMBERARDINO, BOUTTEAU et BISERTE, soumis pour publication, et communication, 1980).

Seuls les neurofilaments de Mammifères (210, 160 et 70 K) et d'Invertébrés (Myxicola: deux protéines 160 et 152 K; et le Calmar: deux protéines 200 et 65 K) avaient été étudiés.

Nous avons ainsi pu montrer que les neurofilaments d'Oiseaux étaient très proches des neurofilaments de Mammifères.

H) Isolement et études des microfibrilles formées à partir des protéines microtubulaires du premier cycle de purification.

Nous avons modifié la méthode de préparation des microtubules pour éliminer plus facilement les contaminants, notamment les filaments de 10 nm. Les microtubules obtenus à la première étape de préparation sont dépolymérisés dans un tampon de force ionique élevée contenant du NaCl 1 M. Après la dépolymérisation totale des polymères de tubuline, les contaminants sont éliminés par centrifugation à haute vitesse (140 000 g pendant 1 heure à 4°C). Le chlorure de sodium se trouvant dans le surnageant est éliminé par dialyse pour permettre une nouvelle étape de préparation de microtubules. Nous avons alors observé que la solution protéique devenait visqueuse et qu'il se formait un vaste réseau microfibrillaire (DELACOURTE et al., 1977-b, 1978; BELIN, DELACOURTE et HILDEBRAND, 1978).

Les premiers résultats indiquent que les microfibrilles isolées par centrifugation sont constituées de protéines microtubulaires, de protéines de neurofilaments, d'actine et de matériel membranaire.

Le problème qui se pose avec les microfibrilles est identique à celui qui a été posé pour les filaments de 10 nm. Les microfibrilles sont-elles dues à des interactions protéiques artéfactuelles ou sont-elles en relation avec une activité physiologique de la cellule nerveuse?

I) Conclusion

Nous pensons que deux problèmes importants ont été résolus. Le premier était de savoir si les filaments de 10 nm isolés au cours des préparations de microtubules correspondaient à une interaction in vitro et in vivo entre les neurofilaments et les microtubules.

Ce problème soulevé par plusieurs équipes notamment celle de LAZARIDES (WANG et LAZARIDES, 1980) est maintenant résolu puisque nous avons montré que la tubuline isolée avec les filaments de 10 nm provenait d'une contamination membranaire.

Le deuxième problème consistait à mettre au point une méthode de préparation de neurofilaments qui allie à la fois la qualité et la quantité de filaments obtenus. La méthode que nous proposons donne d'excellents résultats. Elle devrait faciliter les études physico-chimiques qui étaient limitées par les impuretés des préparations. Pour notre part, nous avons commencé l'étude des neurofilaments avec des approches différentes (étude des mécanismes de polymérisation, étude phylogénique, étude des interactions entre les neurofilaments et les autres éléments du cytosquelette et de l'axoplasme.

L'étude des filaments intermédiaires, et notamment des neurofilaments, est une voie de recherche qui vient juste de débiter.

Cet axe de recherche devrait déboucher sur une meilleure compréhension des mécanismes du transport axoplasmique, et sur une meilleure connaissance de la biologie du neurone.

II) DEFINITION DE NOTRE THEME DE RECHERCHE

Les microtubules sont généralement préparés selon la méthode décrite par SHELANSKI et al. 1973 qui consiste à faire des cycles répétitifs de polymérisation et de dépolymérisation de microtubules in vitro et à éliminer, au cours de ces cycles, le matériel qui ne participe pas à la formation des microtubules.

Nous nous sommes aperçus que le matériel sédimentable éliminé après les cycles de dépolymérisation était très abondant et qu'il était constitué essentiellement de filaments d'un diamètre constant de 10 nm.

Ces observations posent un certain nombre de questions sur l'origine de ces filaments, sur leur composition en protéines et sur leur rôle éventuel au niveau de l'activité de la cellule nerveuse.

Pour répondre à ces questions, nous avons donc été amenés à étudier LES INTERACTIONS ENTRE LES MICROTUBULES ET LES NEUROFILAMENTS (NFs).

Les techniques mises au point pour résoudre ces problèmes ont permis :

- de trouver une nouvelle méthode de préparation de neurofilaments
- d'étudier la reconstitution des neurofilaments à partir des sous-unités protéiques
- de commencer une étude phylogénique des NFs
- de mettre en évidence la formation d'un réseau de microfibrilles à partir des protéines du neuro-cytosquelette.

III) G E N E R A L I T E S

I) DESCRIPTION DES DIFFERENTS TYPES DE FILAMENTS DU CYTOSQUELETTE DES CELLULES NERVEUSES.

Dans toutes les cellules d'Eucaryotes on peut distinguer plusieurs catégories de filaments qui sont classés en fonction de leur diamètre ou de leur composition en protéines.

Par ordre de taille on peut distinguer:

- 1) Les filaments trabéculaires (diamètre de 3 à 6 nm).
- 2) les microfilaments (6nm)
- 3) les filaments intermédiaires ou filaments de 10 nm
- 4) les filaments de myosine (17 nm)
- 5) les microtubules (24 nm).

Ces filaments ont à la fois un rôle structural et moteur indissociables.

Dans les neurones, ils sont répartis comme suit:

A) LES FILAMENTS TRABECULAIRES

Mis en évidence par WOLOSEWICK et PORTER (1979), ces filaments de 3 à 6 nm d'épaisseur forment un réseau qui semble maintenir tous les éléments du cytosquelette et du cytoplasme.

B) LES MICROFILAMENTS

Ils sont représentés principalement par les filaments d'actine et ils possèdent un diamètre moyen de 6 nm.

Ces filaments se trouvent en grande quantité dans le tissu nerveux. Ils sont répartis dans tout le cytoplasme où ils se présentent plutôt sous une forme enchevêtrée (BRAY, 1977). Ils sont particulièrement abondants au niveau des cônes de croissance et sous la membrane cytoplasmique (KUCZMARSKI et ROSENBAUM, 1979, a, b).

C) LES FILAMENTS DE 10 nm OU FILAMENTS INTERMEDIAIRES
=====

Les travaux de ces dernières années ont pu montrer que des filaments de 10 nm sont présents dans toutes les cellules d'Eucaryotes.

Ces filaments possèdent en commun un aspect morphologique identique (filaments de 10 nm de diamètre, lisses, flexibles et sans ramifications) et une stabilité très grande. Ils ne sont dissociés que par des tampons dénaturants comme l'urée 6 M ou le chlorhydrate de guanidine 5 M (ANDERTON et al., 1976).

Actuellement, on distingue cinq types de filaments intermédiaires

- 1) Les neurofilaments spécifiques des neurones (figure 1)
- 2) Les filaments gliaux des cellules gliales
- 3) Les filaments de kératine ou tonofilaments des cellules épithéliales
- 4) Les filaments de desmine qui sont abondants dans le muscle lisse
- 5) Les filaments de vimentine des cellules mésothéliales.

(Revue générale: GILBERT, D. 1978; LAZARIDES, E. 1980; ANDERTON, 1980).

Dans le tissu nerveux on trouve principalement 2 types de filaments de 10 nm: Les neurofilaments qui sont constitués de 3 sous-unités protéiques de 210 K, 160 K et 70 K (SHELANSKI et LIEM, 1979) et les filaments gliaux constitués d'une sous-unité protéique de 51 K appelée G.F.A (Glial Fibrillary Acidic protein) (BIGNAMI et DAHL, 1977; RUEGER et al., 1979).

Il ne semble pas y avoir d'identité chimique et antigénique entre les protéines de neurofilaments et la GFA (LIEM et al., 1979).

Récemment, FRANKE et al., 1978 et LAZARIDES, 1980 ont mis en évidence la présence de 2 types différents de filaments intermédiaires dans une même cellule.

D) LES FILAMENTS DE MYOSINE

=====

Les filaments de myosine ont un diamètre de 17 nm. Très abondants dans le muscle lisse et strié, ils sont rares dans le tissu nerveux (BRAY, 1977).

La myosine représente 0,5% des protéines solubles alors que l'actine s'y trouve à un taux variant entre 6 et 10 %.

La myosine du tissu nerveux ressemble beaucoup à celle du muscle au niveau de son poids moléculaire, de sa forme et de son activité ATPasique (BURRIDGE, et BRAY, 1975).

E) LES MICROTUBULES

=====

Les microtubules sont particulièrement abondants dans le tissu nerveux. Ils se distinguent des autres filaments par un diamètre plus grand (24 nm) et par une lumière centrale. Leur description est détaillée dans le chapitre suivant.

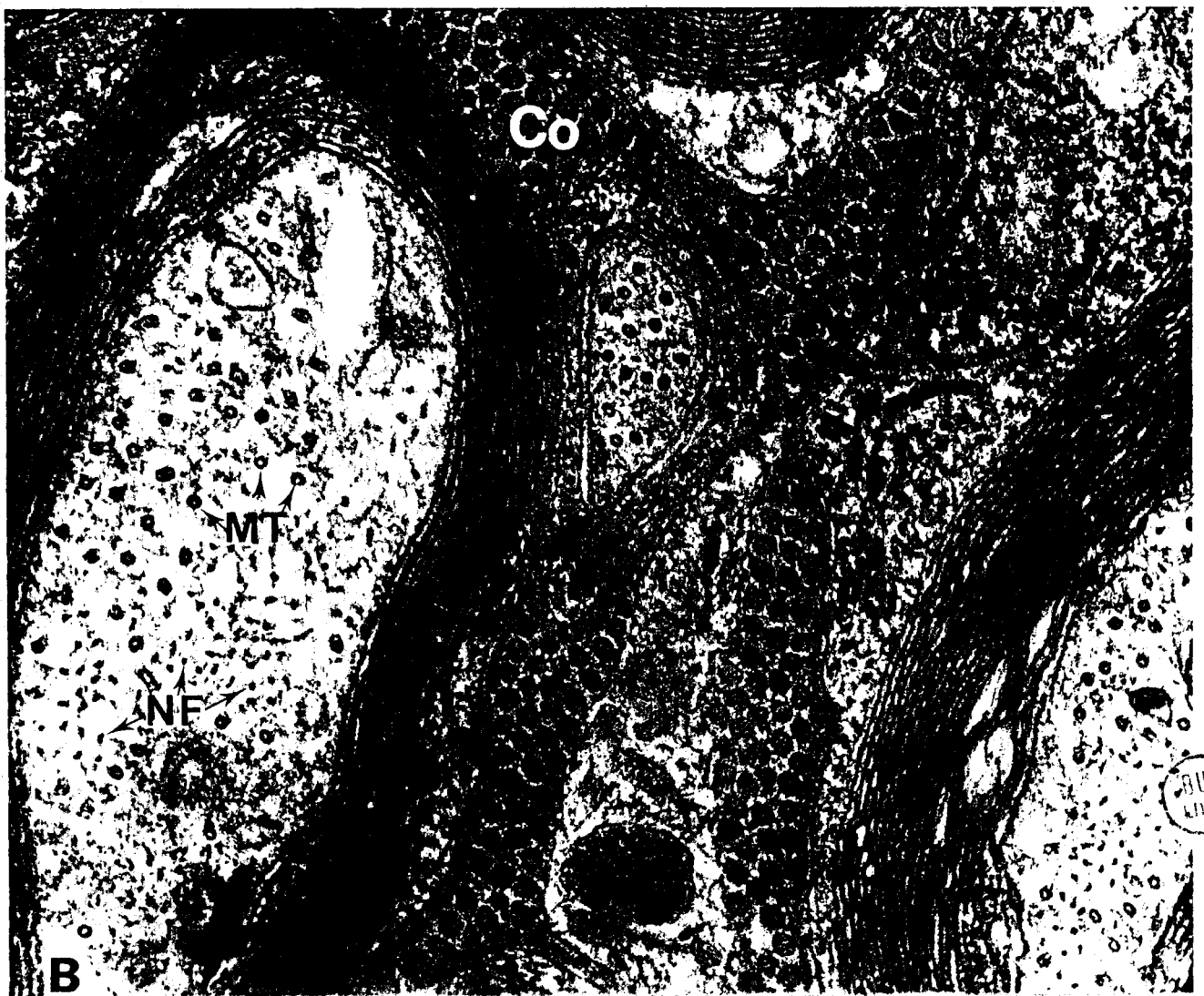
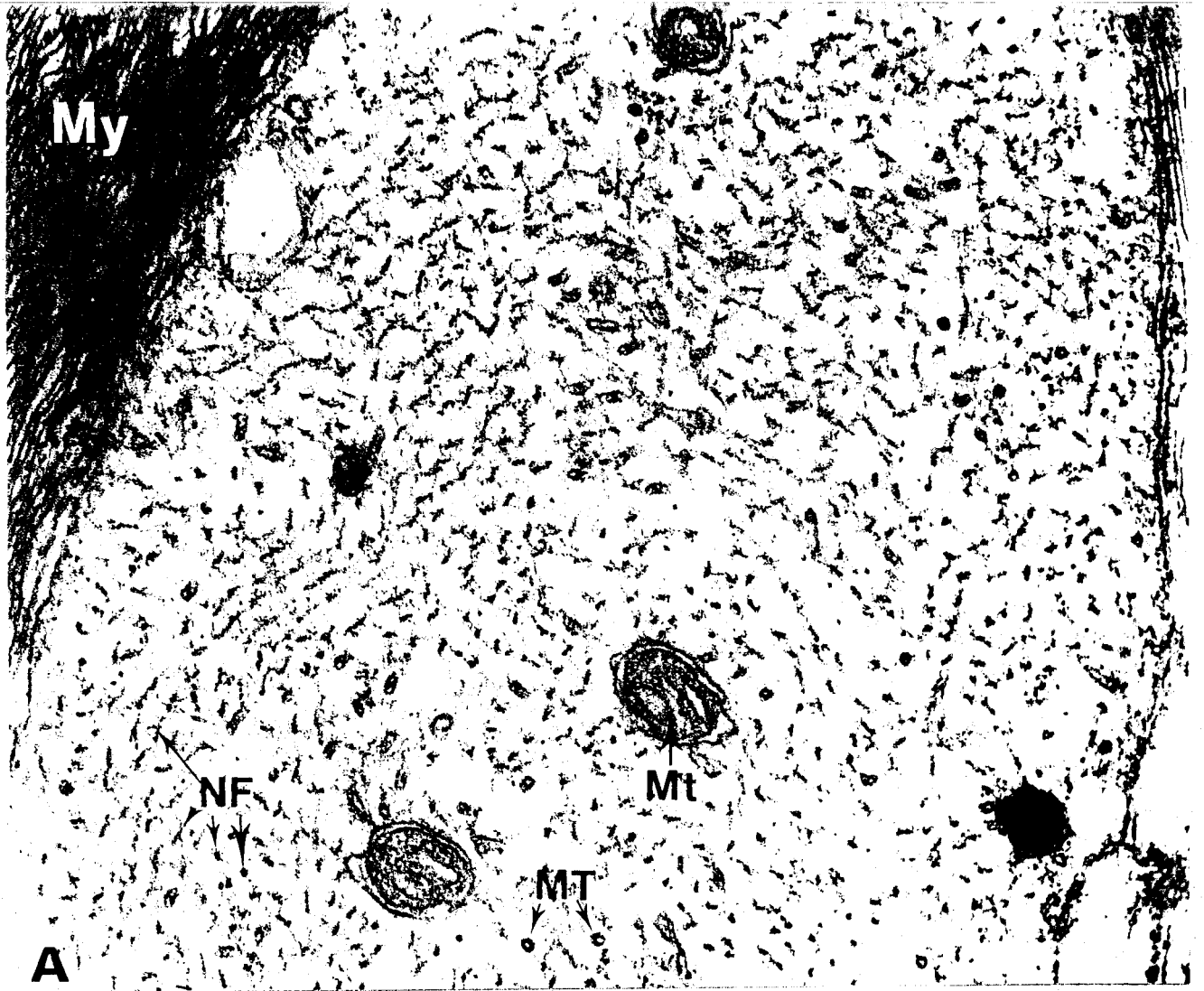
FIGURE 1

Coupe transversale d'axones du nerf sciatique de poulet.

- A) Dans cet axone de grand diamètre, entouré par une gaine de myéline (My), l'axoplasme est essentiellement constitué de neurofilaments (NF). On peut observer quelques microtubules (MT), ainsi que des mitochondries (Mt).
- B) Dans ces axones de petit diamètre, les microtubules sont plus nombreux. L'espace entre les axones est rempli par des fibres de collagène (Co).

(d'après les travaux de Ghislaine FILLIATREAU, 1980).

grossissement: x 70 000.



CRUS
KILLE

II LES MICROTUBULES

A - DESCRIPTION

=====

Les microtubules sont des organites cellulaires omniprésents dans les cellules d'eucaryotes. L'intérêt que l'on accorde à leur étude tient à l'importance du rôle fonctionnel de ces microtubules dans la physiologie cellulaire. En effet, les systèmes microtubulaires sont les constituants essentiels des centrioles et des fuseaux meiotique et mitotique. On les observe aussi le long des extensions cellulaires tels que les axones et dendrites des cellules nerveuses, ainsi que dans les extensions cytoplasmiques (axopodes, pseudopodes).

Ces microtubules ont été décrits également dans des cellules changeant de forme (excroissance neuronale, gastrulation, neurulation, spermiogénèse, formation du myoblaste etc). Des microtubules sont également associés à des récepteurs sensoriels. Enfin une structure microtubulaire remarquablement bien définie existe dans les cils et les flagelles des protozoaires, dans les queues de spermatozoïdes et dans les cils des cellules épithéliales ciliées.

L'utilisation "d'outils pharmacologiques", tels que des drogues comme la colchicine et la vinblastine qui détruisent les microtubules, a permis d'établir des relations structure-fonctions qui suggèrent que les microtubules sont associés aux fonctions suivantes:

- 1- Mouvement des chromosomes lors de la division cellulaire
- 2- Transport intracellulaire de matériel (secrétion, transport axonal)
- 3- Morphogénèse: développement et maintien de la forme cellulaire
- 4- Motilité cellulaire
- 5- Transduction sensorielle

Dans ces différentes fonctions le microtubule semble jouer à la fois un rôle structural et un rôle moteur indissociable.

Les microtubules sont particulièrement abondants dans le système nerveux notamment dans les axones où ils sont disposés longitudinalement, en parallèle avec les neurofilaments. La sous unité protéique des microtubules est la tubuline. Cette protéine qui fixe spécifiquement la colchicine a été caractérisée par TAYLOR en 1965.

Depuis, des milliers de publications sur les microtubules nous ont apporté une multitude de renseignements (DUSTIN, 1978). Cependant, le rôle exact joué par les microtubules dans les mécanismes de transport intracellulaire n'est pas encore bien connu.

En microscopie électronique, les microtubules sont caractérisés en section transversale par un anneau de 24 nm de diamètre extérieur avec une lumière centrale de 15 nm de diamètre et de longueur indéfinie (plusieurs microns) (Figure 2).

Ils sont formés par l'assemblage latéral de 13 protofilaments formés eux mêmes par l'assemblage linéaire d'une protéine dimérique: LA TUBULINE.

Le dimère de tubuline est formé de sous unités légèrement différentes appelée alpha et bêta-tubuline de poids moléculaire 57 K et 53 K. Le poids moléculaire du dimère est de 110 K, ce qui correspond à un coefficient de sédimentation de 6 S.

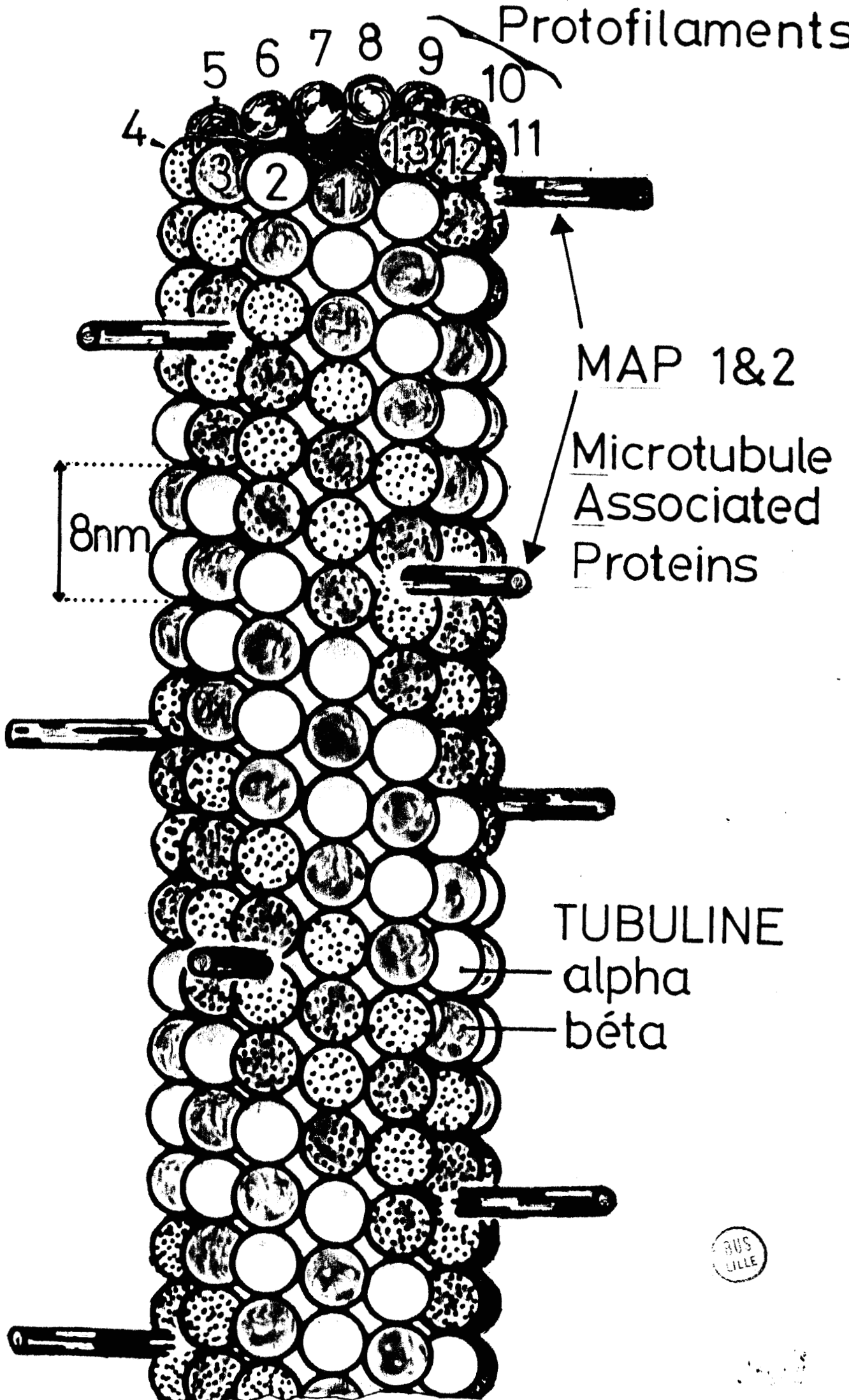
FIGURE 2

REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU MICROTUBULE

Le microtubule est un filament tubulaire de 25 nm de diamètre extérieur.

Il est constitué par l'assemblage longitudinal de 13 protofilaments constitués eux-mêmes par l'assemblage linéaire de dimères de tubuline(alpha-et bêta-tubuline). Des protéines de haut poids moléculaire appelés MAPs (Microtubule Associated Proteins) sont implantés régulièrement sur le microtubule.

(d'après L.AMOS,1979).



BUS LILLE

B) BIOCHIMIE DE LA TUBULINE

a) Structure primaire
+++++

La composition en acides aminés et les études partielles de séquence des sous-unités alpha et bêta-tubuline d'espèces différentes font apparaître une quasi identité entre les tubulines d'origine aussi diverse que celle extraite du cerveau de Poulet ou du spermatozoïde d'Oursin (figure 3).

On observe des différences importantes de structure primaire entre l'alpha et la bêta-tubuline d'une même espèce (25% environ).

Par contre, la comparaison entre les alpha tubulines ou les bêta tubulines montre qu'elles sont restées pratiquement identiques au cours de l'évolution des espèces (comme d'autres protéines ubiquistes telles que l'actine et l'histone H4).

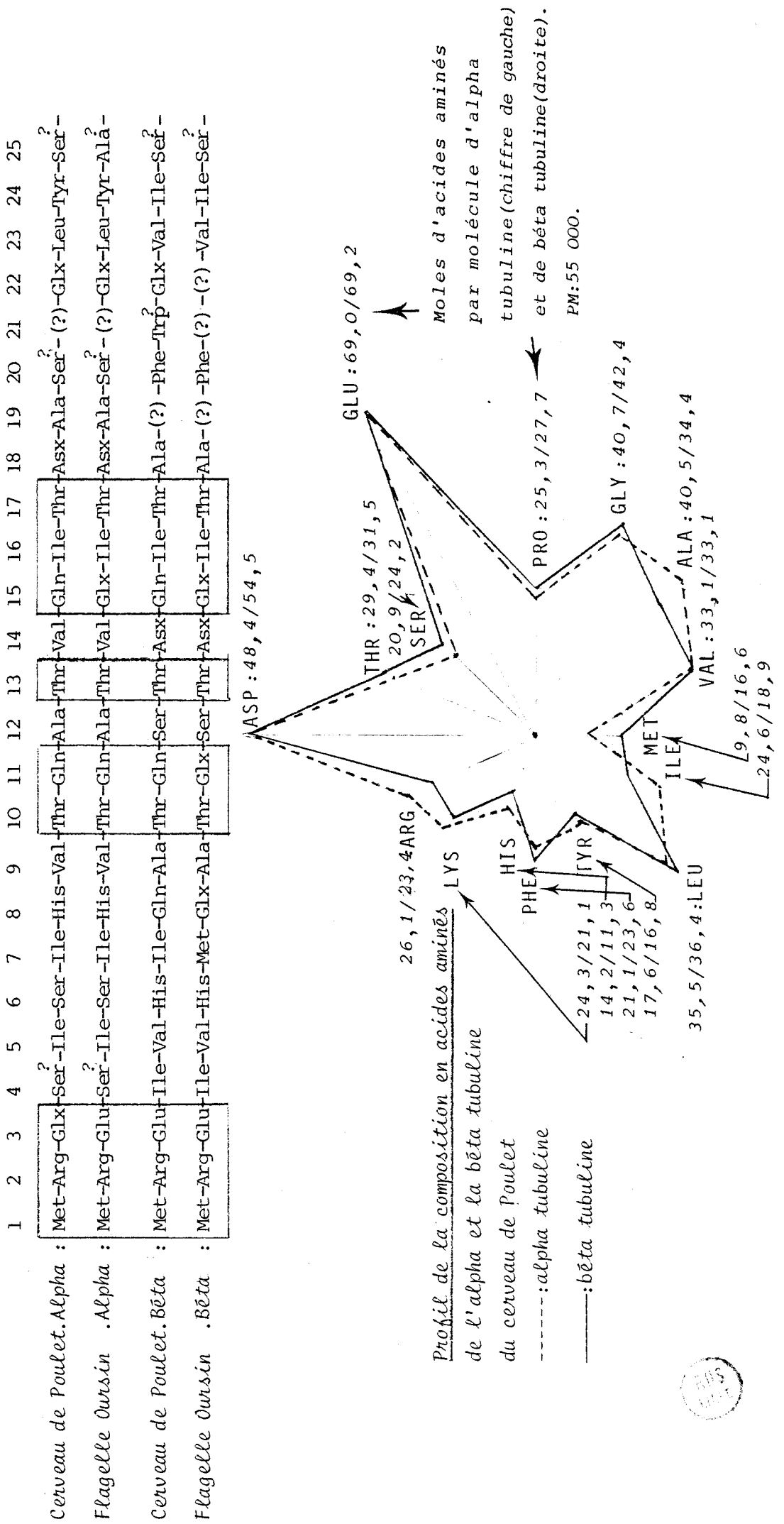
On observe en effet une grande conservation de la séquence en acides aminés qui correspond à 0,45 point de mutation pour 100 résidus par 100 millions d'années (LUDUENA et WOODWARD, 1973).

Cette conservation de la structure primaire de la tubuline au cours de l'évolution des espèces n'est pas étonnante. La tubuline s'intègre dans le microtubule grâce à de nombreuses interactions (interaction alpha-bêta tubuline, interactions longitudinales et latérales des dimères de tubuline, sites actifs où viennent se loger le GTP et le Mg^{++} , sites d'interaction avec les facteurs protéiques de polymérisation).

Par conséquent, le moindre changement de structure primaire doit provoquer une anomalie majeure au niveau de la polymérisation de la tubuline qui se concrétisera par une mutation létale.

La détermination de la structure primaire de la tubuline est en cours (LU et ELZINGA, 1978 ; PONSTINGL et al., 1979).

FIGURE 3 : Structures primaires de la partie N-terminale de l'alpha et la beta tubuline provenant du cerveau de Poulet et des microtubules du flagelle de spermatozoïde d'Oursin.
(d'après les travaux de LUDUENA et WOODWARD, 1973).



b) *La tubuline et ses ligands*

Le dimère de tubuline possède la propriété de fixer un grand nombre de ligands, notamment 2 molécules de GTP indispensables pour la polymérisation, et d'autres substances connues pour leur effet pharmacologique comme la colchicine et les alcaloïdes isolés de la "Vinca major" (Vinca-alcaloïdes).

-La colchicine se fixe spécifiquement sur la tubuline et elle possède une très grande affinité pour les microtubules du fuseau mitotique. A ce titre elle est appelée le "poison du fuseau".

-Les Vinca alcaloïdes ont également une très grande affinité pour la tubuline. Leur mode d'action et leur site de fixation est différent de la colchicine. Les plus actifs sont la vinblastine et la vincristine qui inhibent la polymérisation des microtubules à une concentration de 10^{-8} M. A la concentration de 10^{-4} M, ces composés induisent une polymérisation anormale de la tubuline sous forme de "paracristaux". La vinblastine et la vincristine sont très utilisés en chimiothérapie anti-cancéreuse.

Les cations bivalents jouent également un rôle important dans les phénomènes de polymérisation.

Le magnésium est associé aux deux GTP de la tubuline et il est donc ajouté dans le tampon utilisé pour les polymérisations de microtubules in vitro, à une concentration de 0,5 mM. A la concentration de 16 mM, la tubuline pure (c'est à dire sans les facteurs protéiques qui stimulent la polymérisation) peut se polymériser sous forme de microtubules (Conditions de TIMASHEEF, 1979).

Le calcium dépolymérise très rapidement les microtubules tandis que le zinc provoque une polymérisation anormale sous forme de feuillets très larges qui correspondent à l'accolement de 55 protofilaments en moyenne (GASKIN et KRESS, 1977).

Le rôle du GTP dans les phénomènes d'assemblage est encore très controversé. La liaison de 2 molécules de GTP

par dimère de tubuline est essentiel pour les phénomènes d'assemblage.

Une molécule de GTP est fixée dans le site N (Non échangeable), et ce GTP n'est pas hydrolysé pendant la polymérisation (WEISENBERG et al., 1976).

Par contre, l'autre GTP se fixe sur un site E (Echangeable) et il est hydrolysé pendant la polymérisation. Cette hydrolyse se produit au niveau des molécules de tubuline qui se fixent sur le microtubule, donc à l'extrémité des microtubules (DAVID-PFEUTY et al. 1977, 1978).

Cependant, l'addition d'un analogue du GTP non hydrolysable n'inhibe pas la polymérisation (PENNINGROTH et KIRSCHNER, 1977). Il est possible que l'hydrolyse du GTP soit essentielle pour la régulation de phénomènes biologiques importants. PANTALONI et collaborateurs ont montré que les différentes drogues antimicrotubulaires pouvaient être classées en 2 catégories en fonction de leur action sur l'activité GTPasique de la tubuline : les drogues comme la colchicine stimule l'activité GTPasique tandis que la vinblastine inhibe cette activité (DAVID-PFEUTY, et al., 1979).

Les interactions tubuline-ligands sont schématisées figure 4 .

FIGURE 4.

Représentation schématique des différents types d'association de la tubuline
-en fonction de la température

à 4°C on observe des anneaux 36S et des petits protofilaments

à 37°C la tubuline se polymérise pour former des microtubules (en présence des effecteurs indispensables comme le GTP, le magnésium ou les facteurs protéiques de polymérisation Tau).
-en fonction de la concentration en anions et cations.

Une concentration de 16 mM de magnésium permet une polymérisation de la tubuline sous forme de microtubules, sans les facteurs protéiques de polymérisation (conditions de Timasheef)

En présence de zinc, la tubuline s'associe pour former des feuillettes qui correspondent à l'association d'une cinquantaine de protofilaments.

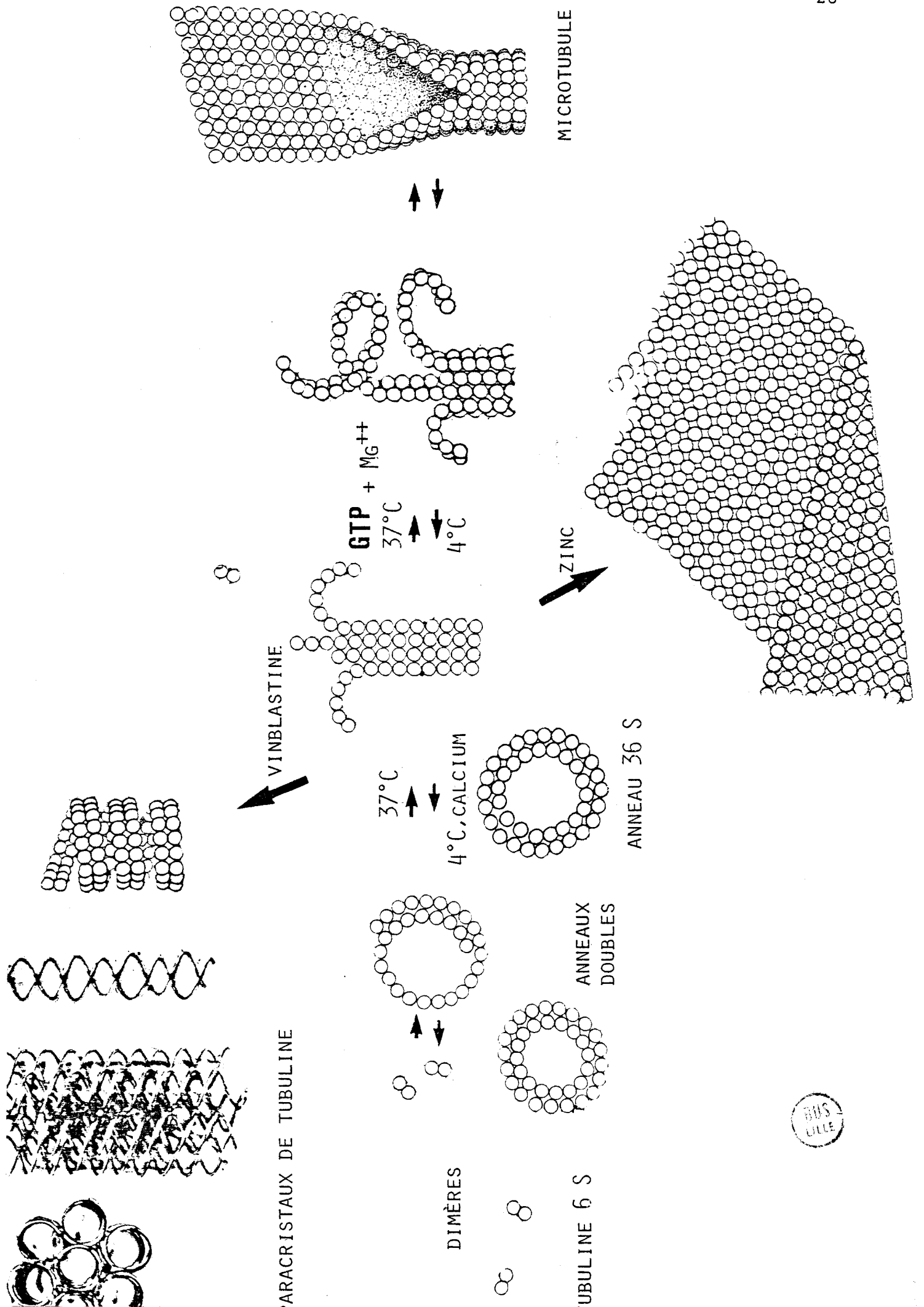
Le calcium dépolymérise très efficacement les microtubules.

-en fonction de différentes drogues antimicrotubulaires

La vinblastine à la concentration de 5×10^{-4} M induit la formation de paracrystaux.

La colchicine peut provoquer la formation de polymères plus ou moins ordonnés

(d'après DUSTIN, 1978).



C) LES NEUROTUBULES

=====

La tubuline se trouve en quantité particulièrement importante dans le système nerveux central de Mammifères (10% des protéines solubles). Il est facile de l'isoler en utilisant la méthode décrite par SHELANSKI (1973). Elle consiste, dans un premier temps, à extraire les protéines solubles par une homogénéisation du cerveau dans un tampon Mes pH6,5 suivie d'une centrifugation haute vitesse à 4°C. Ensuite, à partir du surnageant, on induit la polymérisation des microtubules par élévation de la température à 37°C. Les microtubules ainsi formés sont collectés par centrifugation.

Par contre, les préparations de microtubules à partir d'autres tissus donnent des rendements très médiocres qui proviennent probablement du seuil limite de 0,3 mg/ml de tubuline nécessaire pour obtenir une polymérisation in vitro

Il n'est donc pas étonnant que presque toutes les informations obtenues sur la structure et les propriétés physico-chimiques de la tubuline concernent en fait les microtubules du système nerveux qui sont également appelés les NEUROTUBULES.

Cette abondance de la tubuline dans les neurones est probablement due à sa participation importante dans le mécanisme du transport axonal qui est une activité majeure dans la physiologie de la cellule nerveuse. C'est un transport hyperspécialisé qui permet la migration de nombreuses protéines et vésicules, du corps cellulaire où elles sont synthétisées vers la synapse qui se trouve parfois à une distance de plusieurs dizaines de cm.

D) MECANISMES DE POLYMERISATION DES MICROTUBULES

a) Stabilité des microtubules

Chez les Mammifères, la structure des microtubules cytoplasmiques et des neurotubules s'effondre par simple abaissement de la température pour donner de la tubuline sous forme de dimères et sous forme de fins filaments spiralés formant des anneaux de 50 nm de diamètre (figure 5). Ces microtubules sont donc en équilibre dynamique permanent entre la forme polymérisée et la forme dépolymérisée.

Par contre, les microtubules des cils et des flagelles sont très stables. Cette stabilité est probablement due à leur intégration dans un système architectural complexe avec de nombreux pontages entre les microtubules et les structures environnantes. (dynéine, liens de nexine, ponts radiaires, pontage avec la membrane de l'axonème) (DUSTIN, 1978).

Peu d'études ont été effectuées sur les microtubules des Vertébrés poïkilothermes. Il serait pourtant intéressant de savoir si les phénomènes de régulation de la polymérisation sont identiques à ceux que l'on trouve chez les Vertébrés homéothermes.

b) Polymérisation des microtubules

Les différentes étapes de la polymérisation des microtubules ont été étudiées par de nombreux auteurs. Ces études ont montré qu'à 4°C, il existe un équilibre dynamique entre la tubuline sous forme de dimère et la tubuline sous forme d'anneaux. Les MAPs (Microtubule Associated Proteins) participent activement à la formation de ces anneaux. Ces derniers seraient les sites d'initiation pour la polymérisation de la tubuline (KIRSCHNER, 1979). Après élévation de la température à 37°C, on observe une disparition rapide des anneaux (en moins de 2 minutes) qui se déroulent pour former des protofilaments. Ceux-ci vont s'accroître en longueur et ils vont également s'accoler entre eux pour former un feuillet. Dès que ce feuillet atteint une largeur de 13 protofilaments, il se referme pour former le microtubule.

Les conditions expérimentales pour obtenir une polymérisation de la tubuline sous forme de microtubules sont les suivantes:

-la tubuline doit être solubilisée dans un tampon de force ionique élevée. On utilise en général le tampon Mes 0,1 M (Morpholino Ethane Sulfonic acide) à un pH voisin de 6,5.

-le tampon doit contenir également

-- de 1'EGTA (Ethylène Glycol-bis(β -amino-ethyl ether) N-N' tetraacétique acide) à une concentration de 1mM qui va complexer préférentiellement le calcium

-- du magnésium (0,5 mM de $MgCl_2$) et du GTP (0,3 à 1 mM) indispensable pour la polymérisation

-- une température supérieure à 15°C (37°C en général).

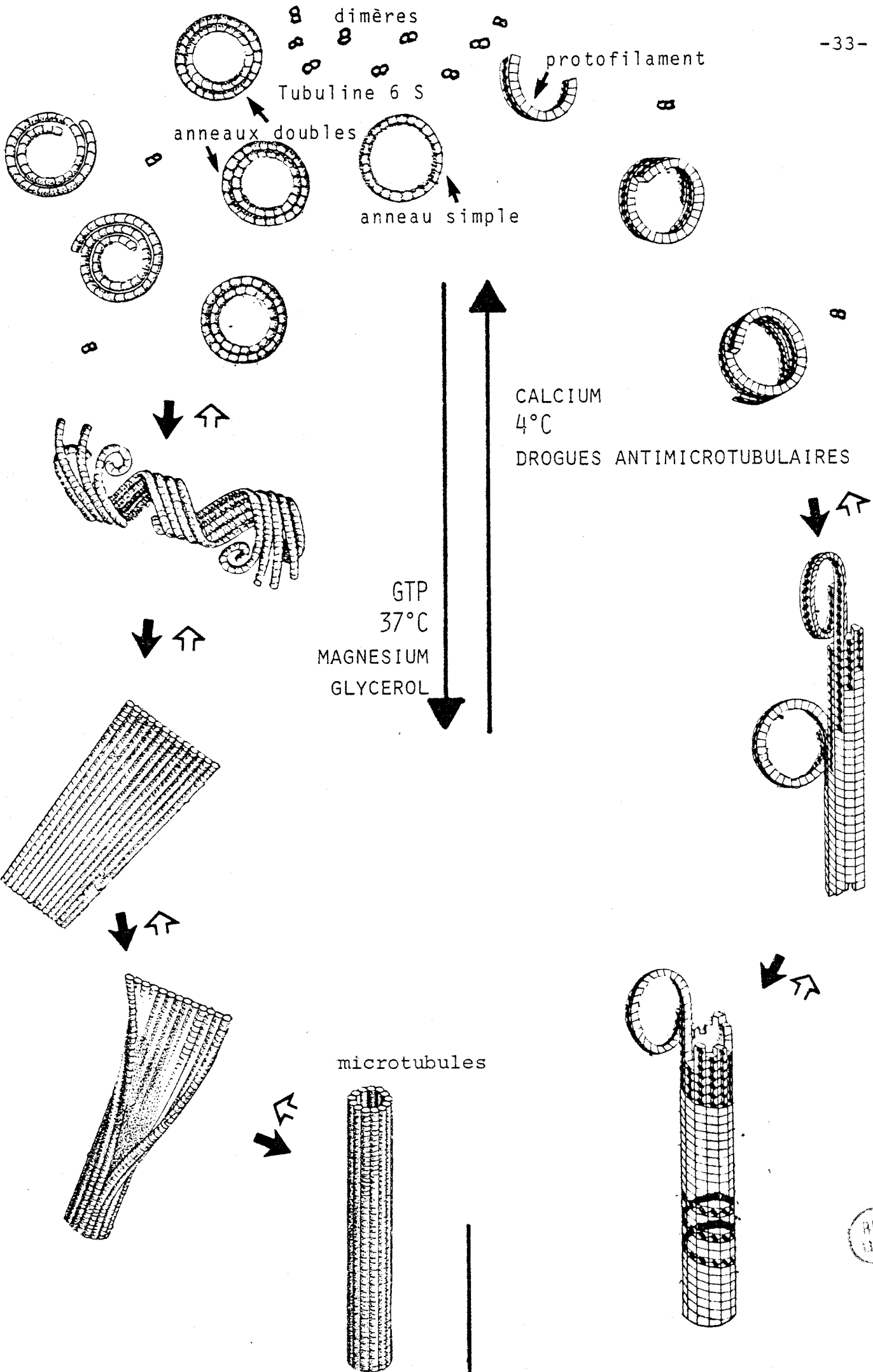
Le protocole de préparation des microtubules est décrit dans le chapitre expérimental page 63.

FIGURE 5

MODELES D'ASSEMBLAGE DES MICROTUBULES PROPOSES PAR
ERIKSON(1974) et KIRSCHNER(1979).

Ces deux modèles d'assemblage de la tubuline montrent que la polymérisation de la tubuline passe par des formes intermédiaires qui sont les anneaux simples et doubles ainsi que de courts protofilaments.

Après l'induction de la polymérisation par élévation de la température à 37 °C, les anneaux semblent se dérouler et s'accoler pour former des feuillets ou des rubans plus ou moins longs. Les feuillets vont croître en longueur et en largeur. Lorsque la largeur aura atteint 13 protofilaments, le feuillet va se refermer pour former le microtubule.



d'après KIRSCHNER, 1979

d'après ERIKSON, 1974

RIIS
1974

E) COMPOSITION EN PROTEINES DES NEUROTUBULES

La composition en protéines des microtubules est généralement déterminée par électrophorèse en gel de polyacrylamide (voir le chapitre technique page 66). Ces électrophorèses sont toujours effectuées en milieu dénaturant (Dodecyl sulfate de sodium) pour solubiliser les protéines microtubulaires qui ont une forte tendance à s'agréger.

Par cette technique, on a pu établir que les microtubules très purifiés sont constitués d'environ 90 p 100 de tubuline et de 10 p 100 de facteurs protéiques qui induisent la polymérisation.

Les facteurs de polymérisation sont appelés facteur TAU 1 et TAU 2. Le facteur TAU 1 qui est le plus actif est constitué de quatre protéines de poids moléculaire compris entre 52 et 65 K (figure 6) (CLEVELAND et al., 1977, a, b). Le facteur TAU 2 est constitué principalement de deux molécules de haut poids moléculaire, appelés également MAP 1 et MAP 2 (Microtubule Associated Proteins) (SLOBODA et al., 1976). Leur poids moléculaire de 350 et 300 K est très voisin de celui de la dynéine qui est associée aux microtubules des cils et des flagelles.

GIBBONS (1975) a montré que l'activation de la dynéine par hydrolyse de l'ATP engendre la force mécanique qui provoque le battement ciliaire ou flagellaire.

La dynéine peut décorer les neurotubules et garder son activité ATPasique (HAIMO et al., 1979).

En microscopie électronique, les MAPs ressemblent à de fins bras tenus disposés en hélice sur le pourtour du microtubule (AMOS, 1977).

FIGURE 6

ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE-SDS des protéines microtubulaires et de neurofilaments.

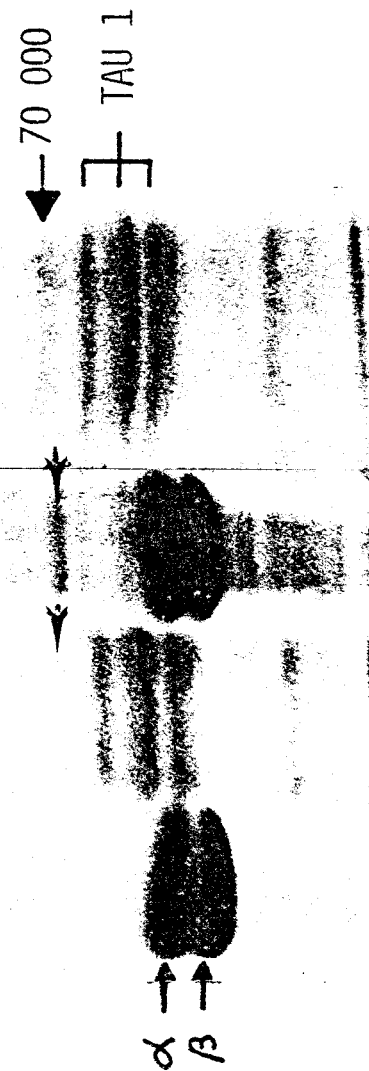
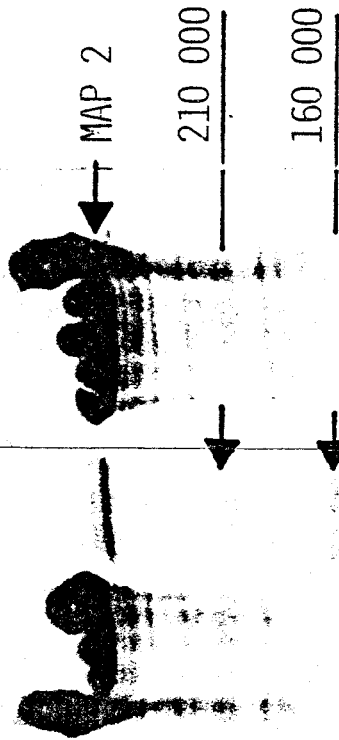
Les microtubules (de premier et de deuxième cycle) sont constitués des dimères alpha et bêta de la tubuline et des MAPs (A, C et H).

Les facteurs de polymérisation, préparés suivant la méthode décrite par CLEVELAND et al. (1977 a-b) sont les protéines MAP 1 et MAP 2 de 350 K (kilo daltons) et 300 K appelées également facteur TAU 2, et le facteur TAU 1 qui est constitué par 3 à 5 protéines de 65 à 52 K (B et D).

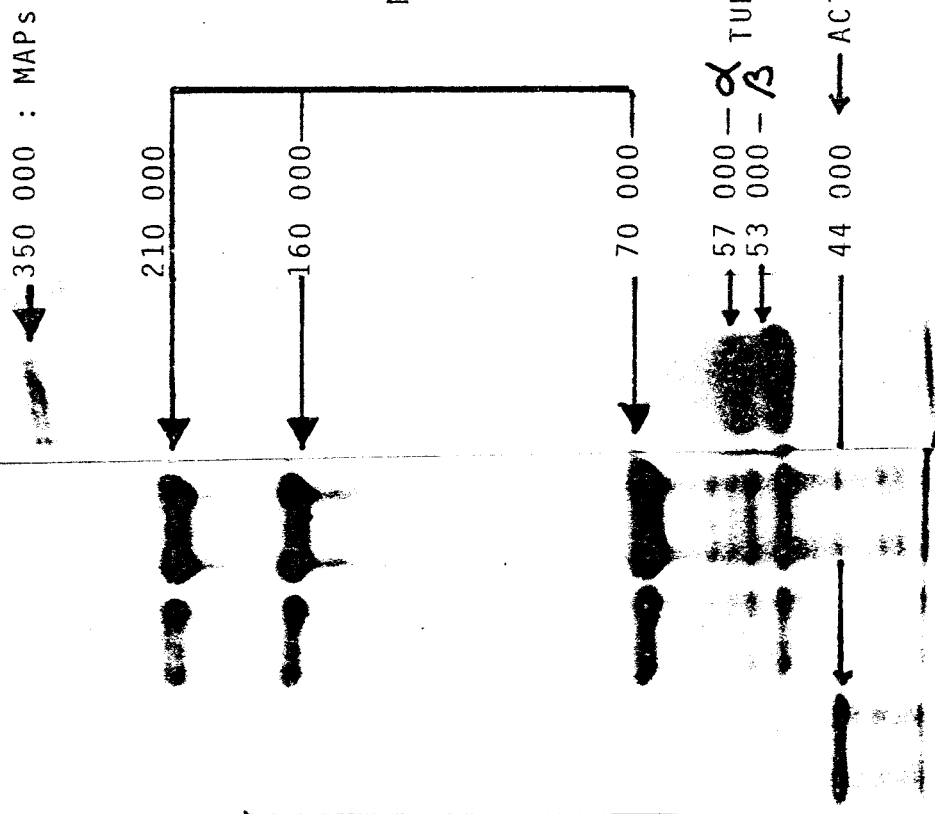
Les neurofilaments (NFs) sont constitués de trois sous-unités protéiques de 210 K, 160 K et 70 K (G et H).

E : Témoin actine (44 K).

TAU 2 - [MAP 1 →
MAP 2 →]



MT II-C TAU MT I-C TAU
TAU TAU



NFs

Ac | NFs | MTS

E F G H

α TUBULINE β TUBULINE

44 000 ← ACTINE

Les études immunologiques ont montré que les facteurs TAU étaient associés aux microtubules cytoplasmiques et aux microtubules du fuseau mitotique des cellules neuroblastiques et des fibroblastes (CLEVELAND et al., 1979).

Contrairement à la tubuline, les facteurs TAU sont thermostables et se fixent spécifiquement sur la phosphocellulose. Ces propriétés ont été mises à profit pour leurs préparations (CLEVELAND et al., 1977 a et b)

Les autres protéines isolées avec les microtubules proviennent de contaminations (interactions non spécifiques avec la tubuline qui possède un caractère fortement acide, produits de protéolyse survenant au cours des cycles de polymérisation) et peut-être par des protéines dont le rôle est encore inconnu. Nous avons remarqué qu'une protéine 35 K était toujours associée aux microtubules très purifiés (DELACOURTE et al., 1977, b)

III - LES NEUROFILAMENTS DE MAMMIFERES

Contrairement aux filaments d'actine, de myosine et aux microtubules, les filaments de 10 nm sont longtemps restés "dans l'ombre". Ceci est dû principalement au fait qu'ils manquent de spécificité au niveau de leur structure et de leur composition chimique.

L'étude des neurofilaments (NFs) de Mammifères est très complexe car il est difficile d'isoler les neurones où ils se situent sans avoir une contamination importante par des cellules gliales qui possèdent également une très grande quantité de filaments de 10 nm (figure 8, page 48). Les filaments gliaux possèdent une composition en protéine différente des neurofilaments (BIGNAMI et DAHL, 1977). Par contre leurs aspects en microscopie électronique est à peu près identique (WUERKER, 1970).

De ce fait, les résultats sur la composition en protéines des NFs ont été longtemps controversés. Finalement, leur composition en protéines a été élucidée au cours du dernier trimestre 1978 par 3 équipes de recherches différentes: SCHLAEPFER et FREEMAN, 1978; ANDERTON et al, 1978 et LIEM et al, 1978. Il s'agit "d'un triplet" de protéines de poids moléculaire 210 K, 160 K et 70 K (fig 6).

Le nombre d'informations sur les NFs est par conséquent beaucoup plus restreint que pour les microtubules. Cependant on peut penser qu'un développement rapide des recherches se fera dans ce domaine.

Pour mieux comprendre les résultats contradictoires présentés dans la littérature, nous présentons à la page suivante un historique des principaux résultats obtenus depuis 1971.

HISTORIQUE DES RECHERCHES SUR L'IDENTIFICATION DE LA
SOUS-UNITE PROTEIQUE DES NEUROFILAMENTS.

La première méthode de préparation, mise au point par SHELANSKI et collaborateurs, date de 1971. La méthode de préparation, effectuée à partir de la substance blanche de boeuf, utilise la technique suivante: la substance blanche est homogénéisée dans un tampon sucrose 0,9 M. Après une centrifugation de l'homogénat, les axones myélinisés forment une pellicule à la surface du surnageant. Ils sont récupérés et homogénéisés dans un tampon de faible force ionique. Il en résulte un choc osmotique qui désintègre les membranes plasmiques et libère les neurofilaments de l'axone. Les neurofilaments sont ensuite collectés par centrifugation. La sous-unité protéique de ces filaments possède un poids moléculaire de 60 K.

DAVISON et WINSLOW (1974) ont purifié la protéine des neurofilaments en utilisant la même technique complétée par une gel-filtration. Ils évaluent à 50 K le poids moléculaire de la protéine constitutive des neurofilaments. Cette protéine purifiée peut reformer des filaments de 10 nm.

Par contre, JOHNSON et SINEX (1974), travaillant sur le cerveau de Rat, isolent des filaments de 10 nm constitués d'une protéine qui ressemble beaucoup à la tubuline (57 K).

En 1976, LASEK et HOFFMAN décrivent une technique originale qui permet d'étudier les protéines véhiculées par le transport axonal lent. Ils démontrent que les neurofilaments se déplacent dans l'axone à la vitesse de 4 mm par jour, en direction de la synapse. A ce déplacement des neurofilaments correspond un déplacement de trois protéines (210 K, 160 K et 68 K). (Voir le chapitre sur le Transport axonal lent, page 58).

La même année, JORGENSEN et collaborateurs mettent en évidence la présence d'un réseau de neurofilaments dans les cellules neuroblastiques de Souris. Ces neurofilaments ont été révélés par des anticorps fluorescents préparés à partir de la protéine 54 K de la préparation de SHELANSKI. L'intérêt de ce travail est de montrer que la protéine 54 K révèle des neurofilaments dans une culture de cellules absolument dépourvue de toute contamination par les cellules gliales.

Par contre, YEN, DAHL, SCHACHNER et SHELANSKI (1976) présentent 2 méthodes différentes pour la préparation de la GFA (Glial Fibrillary Acidic protein), sous unité des filaments gliaux et la protéine 54 K des neurofilaments. Ces deux protéines possèdent apparemment le même poids moléculaire et des sites antigéniques communs.

Toujours grâce aux anticorps préparés à partir de la protéine 50 K des NFs, DAVISON et HONG (1977) montrent que cette protéine est présente chez tous les Mammifères, mais absente chez la Grenouille, la Morue et le Poulet.

Etant donné que la bêta tubuline migre juste derrière la protéine 54 K en électrophorèse-SDS, LIEM, YEN, LORIA et SHELANSKI (1977) ont comparé ces protéines par cartes peptidiques. Ces deux protéines possèdent des peptides communs mais elles possèdent peu de sites antigéniques communs (étude par radioimmunoessais).

En marquant la bêta tubuline et la protéine 50 K par l'iode 125 et en utilisant la même technique de comparaison des produits de protéolyse, IQBAL et collaborateurs (1977) arrivent aux mêmes conclusions que LIEM et al. Ces deux protéines sont très proches et auraient peut être une origine commune.

2 autres techniques d'isolement des neurofilaments ont également été utilisées. L'une par DAY et l'autre par SCHLAEPFER.

DAY(1977) solubilise les neurofilaments par un tampon NaCl pH 9,5. La protéine isolée a un poids moléculaire de 57 K.

SCHLAEPFER(1977) isole les neurofilaments à partir du système nerveux périphérique (qui contient peu de cellules gliales). La fraction enrichie en neurofilaments est constituée d'une protéine 68 K .

Les anticorps contre cette protéine colorent spécifiquement les neurofilaments.

1978 a été l'année décisive pour la détermination correcte de la composition en protéines des neuro-filaments.

Trois équipes différentes ont publié les mêmes résultats, qui confirment les travaux de LASEK et HOFFMAN(1976).

SCHLAEPFER, ANDERTON et al et LIEM, YEN, SALOMON et SHELANSKI ont montré que les neurofilaments de Mammifères sont constitués de 3 sous-unités protéiques avec des poids moléculaires voisins de 210 K, 160 K et 70 K (appelés également le Triplet des neurofilaments).

La protéine 50 K -54 K que l'on croyait être la protéine des neurofilaments, était en fait la G.F.A des filaments gliaux.

La détermination précise des poids moléculaires des sous-unités protéiques des neurofilaments est extrêmement importante puisqu'elle permettra ensuite d'isoler ces protéines par électrophorèse préparative et d'obtenir des anticorps spécifiques contre ces protéines.

Ceux-ci seront utilisés pour doser, localiser et déterminer le rôle des neurofilaments dans la cellule nerveuse. Ils devraient être également précieux pour l'étude de la différenciation des cellules nerveuses.

Etant donné que la composition en protéine vient d'être déterminée, toutes ces études sont donc à faire.

B) LES NEUROFILAMENTS D'INVERTEBRES.

=====

Les études les plus précises sur les neurofilaments proviennent des observations faites sur les NFs d'Invertébrés car ceux ci sont isolés facilement à partir des axones géants. Il n'y a donc pas de contamination par des filaments gliaux. Ces études se sont focalisées sur deux espèces: Myxicola qui est un Annelide marin et Loligo forbesii qui est un Calmar (Mollusque, Céphalopode).

Cependant la difficulté majeure concernant l'isolement des neurofilaments a consisté à trouver le moyen d'inhiber l'action des nombreuses protéases qui se trouvent dans l'axoplasme. GILBERT et al (1975) ont montré que ces enzymes, activées par le calcium peuvent dégrader les neurofilaments en moins d'une minute, à température ambiante. Ces protéases possèdent un thiol actif et peuvent être inhibées par le para chloromercuribenzoate à une concentration de 1 mM.

De nombreuses observations en microscopie électronique ont montré que ces neurofilaments sont constitués par l'assemblage en hélice de deux brins de 4,5 nm d'épaisseur formés eux mêmes par l'assemblage de 2 protofilaments de 2,5 nm d'épaisseur.

Ces sous structures ont pu être observées au cours des étapes de dénaturation progressive par l'urée 2 M. Dans un premier temps on observe un déroulement des brins puis des protofilaments qui vont s'agglomérer pour former des globules de 100 nm de diamètre (KRISHNAN et al, 1979; LASEK et al, 1979).

Les principales caractéristiques sur les propriétés physico-chimiques des neurofilaments des Invertébrés sont rassemblées figure 7.

FIGURE 7

Principales caractéristiques des neurofilaments isolés
à partir des axones géants de Myxicola et de Loligo.

Partie inférieure: Structure des neurofilaments
proposée par DAY (1977) montrant qu'ils sont constitués de
4 protofilaments disposés en hélice.
Les neurofilaments dénaturés se réarrangent pour former
des enchevêtrements puis des globules d'un diamètre de 100 nm
(KRISHNAN et al, 1979; LASEK et al, 1979).

MYXICOLA

LOLIGO

POIDS MOLÉCULAIRE

160 000 ET 152 000

200 000 ET 65 000

STABILITÉ DANS DIFFÉRENTS TAMPONS

SE DISSOCIE PLUS FACILEMENT
DANS UN TAMPON TRIS 0.1 M, NaCl 1 M

DÉPOLYMERISÉS PARTIELLEMENT PAR L'URÉE 2 M

DÉPOLYMERISÉS TOTALEMENT PAR L'URÉE 4 M.

PHOSPHORYLATION PAR DES KINASES ENDOGÈNES DE L'AXOPLASME:

DES PROTÉINES 160 000 ET 152 000

DE LA PROTÉINE 200 000

REACTION ANTIGÉNIQUE CROISÉE



NEUROFILAMENT NATIF



NEUROFILAMENT DENATURE



FONCTION DES NEUROTUBULES ET DES NEUROFILAMENTS

=====

Avant de décrire le rôle joué par les microtubules et les neurofilaments dans l'axone, nous avons voulu décrire la place tenue par les neurones et les cellules gliales dans le tissu nerveux du système nerveux central et périphérique.

Ceci nous permettra de mieux comprendre la difficulté d'isoler des axones sans avoir de contamination gliale.(Fig 8)

D'autre part, plusieurs équipes de recherches ont montré que la sous unité protéique des NFs possédait des sites antigéniques communs avec la G.F.A. Ces résultats peuvent être expliqués par une proche parenté entre les neurones et les cellules gliales. Nous avons donc décrit l'histogenèse de ces 2 types cellulaires pour mieux comprendre leurs analogies et leurs différences.(Fig 9).

A) NEURONES ET CELLULES GLIALES DANS LE TISSU NERVEUX

Le tissu nerveux est constitué de trois éléments essentiels :

- 1) Les cellules nerveuses appelées NEURONES
- 2) Les cellules interstitielles ou cellules gliales
- 3) Les éléments du tissu conjonctif, y compris les fibroblastes, les produits fibreux, les vaisseaux sanguins et les liquides extra-cellulaires.

Le NEURONE est l'unité de base du système nerveux.

C'est une unité morphologique car tous les neurones sont en contact entre eux par l'intermédiaire de leurs dendrites et axones et forment ainsi un réseau continu.

Fonctionnellement, chaque neurone est un intégrateur, un conducteur et un transmetteur d'informations codées.

Un neurone est constitué d'un corps cellulaire dont le diamètre varie de 5 à 100 micromètres et dont émanent une fibre principale, l'axone, et un certain nombre de branches fibreuses, les dendrites. En règle générale, les dendrites et le corps cellulaire reçoivent les signaux d'entrée; le corps cellulaire les combine, les intègre puis émet des signaux de sortie; il a également pour fonction l'entretien général de la cellule. L'axone transmet les signaux de sortie aux terminaisons axoniques qui, à leur tour, distribuent l'information aux autres neurones.

Le volume de l'axone et des dendrites peut représenter de 100 à 1000 fois le volume du corps cellulaire.

Les neurones sont entourés, soutenus et nourris par les CELLULES GLIALES. Ces cellules sont donc en contact intime avec les cellules nerveuses et leurs prolongements. Chaque neurone est enveloppé par plusieurs cellules gliales.

On distingue plusieurs types de cellules gliales :

- Dans le système nerveux central, les ASTROCYTES font la jonction entre les capillaires sanguins et les neurones pour nourrir la cellule nerveuse (Figure 8).

- Les OLIGODENDROCYTES forment une gaine de myéline autour des axones

- Dans le système nerveux périphérique, la myélinisation est effectuée par les CELLULES DE SCHWANN.

FIGURE 8

Relations entre les neurones et les cellules gliales (astrocytes et oligodendrocytes).

L'astrocyte possède des extensions cytoplasmiques en contact avec les parois des capillaires sanguins et d'autres extensions en contact avec le neurone.

Les oligodendrocytes forment une gaine de myéline qui s'enroule autour de certains axones. Un oligodendrocyte peut former une gaine autour de plusieurs axones.

(D'après NOBACK et DEMAREST, 1975).

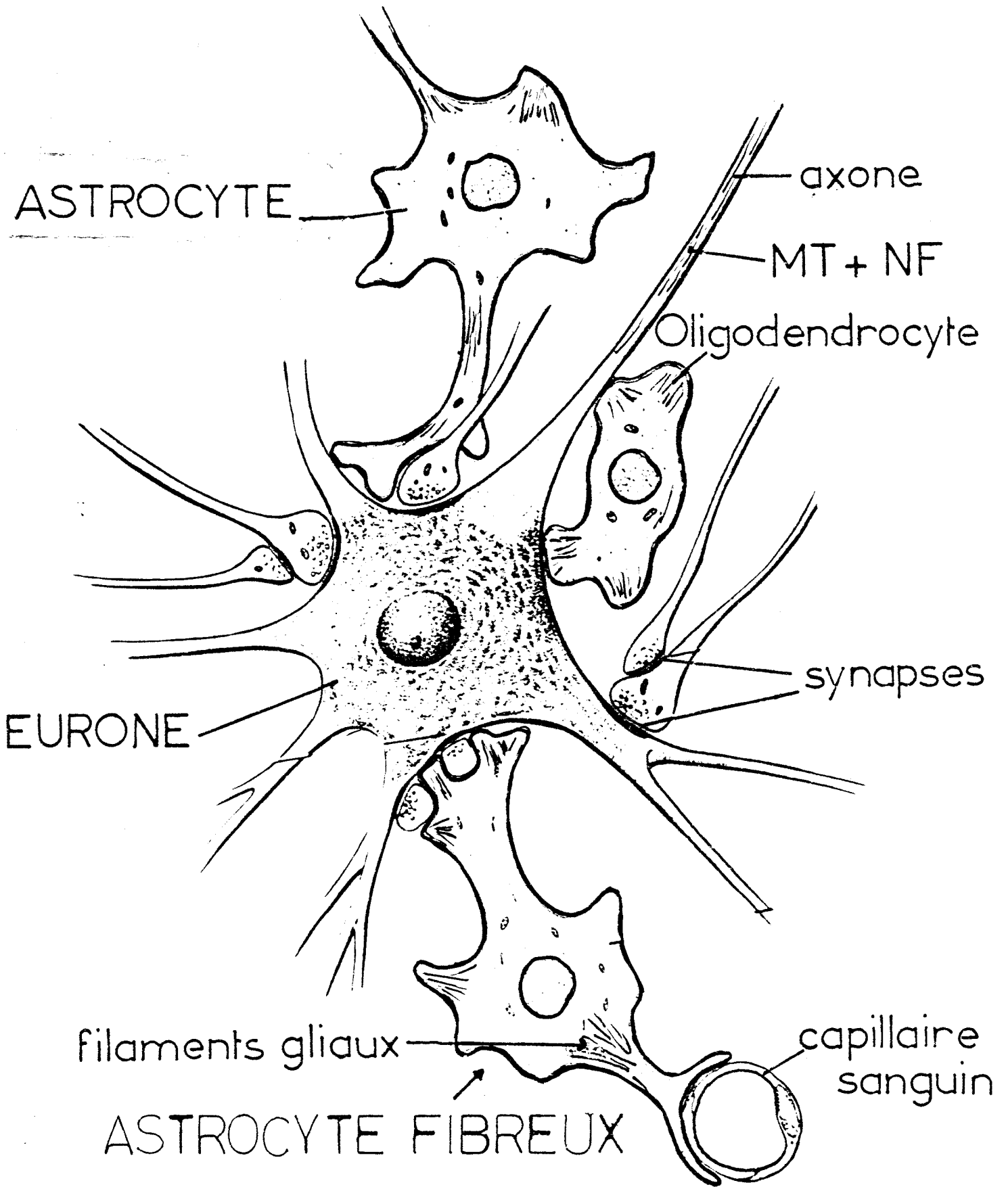


FIGURE 9

ORIGINE DU SYSTEME NERVEUX

L'ensemble du système nerveux, moelle, encéphale et nerfs périphériques dérive de l'ectoblaste.

Au cours de la gastrulation, le chordo-mésoblaste va induire la formation du tissu neuroblastique à partir de l'ectoblaste sus-jacent (neuroectoderme).

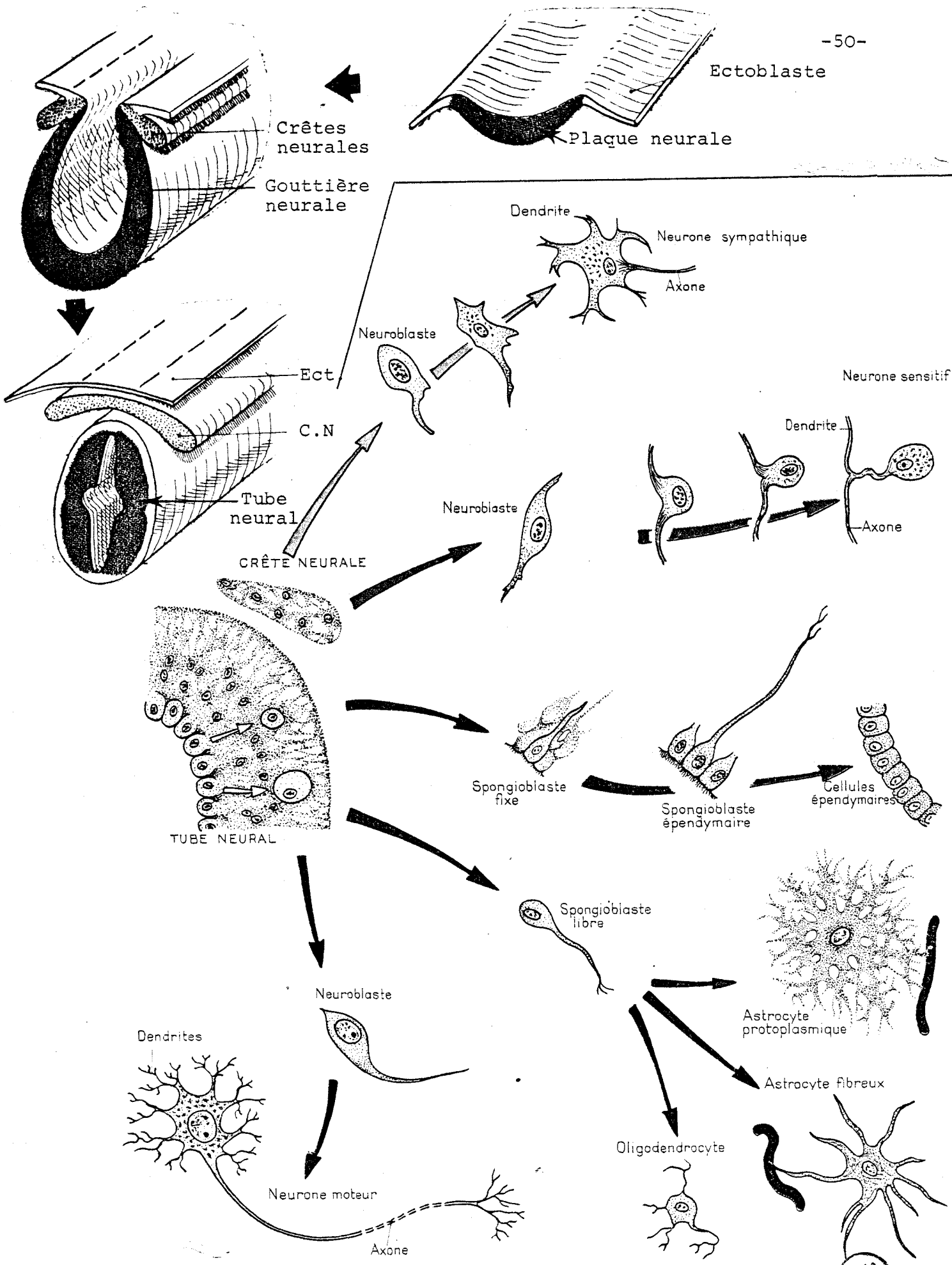
La plaque neurale résulte de la différenciation et de l'épaississement de l'ectoblaste sus-chordal.

Au cours de la neurulation, la plaque neurale va se différencier pour former une crête neurale (C.N) et une gouttière neurale (G.N) qui vont s'individualiser.

La gouttière neurale va se refermer pour former le tube neural (T.N).

A partir du tube neural vont se différencier les neuroblastes qui formeront les neurones moteurs et les spongioblastes libres qui formeront les astrocytes et les oligodendrocytes.

Les cellules de Schwann du système nerveux périphérique proviennent également du neuroectoderme.



D'après AUROUX, 1974.

BIIS LILLE

B) EQUILIBRE MICROTUBULES-NEUROFILAMENTS

De nombreux auteurs ont montré que les drogues anti-microtubulaires provoquent à la fois la dépolymérisation des microtubules, mais également l'augmentation du nombre de filaments de 10 nm, y compris les neurofilaments (HOLTROP et al., 1974).

Etant donné -que la colchicine inhibe la polymérisation des microtubules,- que la disparition des microtubules est suivie par une augmentation des filaments de 10 nm,- et que le phénomène se passe même en présence de cycloheximide qui bloque les synthèses protéiques, il a été émis l'hypothèse que les sous-unités microtubulaires reformeraient des filaments de 10 nm (WISNIEWSKI et al., 1968 ; KRISHAN et HSU, 1971)

Cette hypothèse a été controversée (DE BRABANDER et al., 1975) et semble peu vraisemblable puisque l'on sait maintenant que les sous-unités protéiques des microtubules et des filaments de 10 nm sont différentes.

Cependant, il est admis que la colchicine et la colcemide provoquent une agglomération des filaments de 10 nm, notamment des filaments de desmine et de vimentine (voir page 20, LAZARIDES, 1980) et des neurofilaments (WISNIEWSKI et al., 1968).

Certains produits provoquent une agglomération des neurofilaments sans agir sur les microtubules, comme le méthyl butyl cétone (SELKOE et al., 1978) ou l'aluminium (SHELANSKI et LIEM, 1979).

Pour notre part, nous pensons que les microtubules et les filaments de 10 nm jouent un rôle structural différent, et vraisemblablement indépendant, dans la cellule.

Les microtubules joueraient un rôle dans la stabilité du cytoplasme, mais ils provoqueraient également, lorsqu'il y a plusieurs microtubules accolés, une zone privilégiée où le cytoplasme serait plus fluide et par où circuleraient les produits de sécrétion. Ce mécanisme proposé par GROSS (1975)

semble l'hypothèse la plus vraisemblable concernant le rôle joué par les microtubules au niveau du transport cytoplasmique.

Par contre, les filaments de 10 nm joueraient un rôle dans le maintien de différents organites dans la cellule (LAZARIDES, 1980).

Les filaments de desmine lient les myofibrilles de la cellule musculaire striée en reliant entre elles les lignes Z qui sont à leur base et en les reliant également à la membrane plasmique.

Les filaments de vimentine ancreraient le noyau et les centrioles dans la cellule.

Pour les neurofilaments, leur rôle serait à la fois structural et moteur puisqu'ils semblent impliqués dans les mécanismes du transport axonal lent (voir le chapitre suivant).

C) NEUROTUBULES ET NEUROFILAMENTS DANS LE TRANSPORT AXONAL LENT.

Les neurones possèdent des extensions cytoplasmiques appelées axones qui, chez les Vertébrés comme la Girafe ou la Baleine, peuvent atteindre plusieurs mètres de long. Etant donné qu'il y a une absence presque totale de synthèse protéique dans l'axone, tout ce qui est nécessaire pour le bon fonctionnement de l'axone et de la synapse est acheminé du corps cellulaire où ont lieu les synthèses protéiques, jusqu'à la synapse.

Cette forme spécialisée de transport cytoplasmique s'appelle le transport axonal.

La cellule gliale transporte également des éléments nutritifs directement dans l'axone (figure 9). Mais ceci est un phénomène négligeable par rapport au transport axonal.

Les substances amenées par le transport axonal semblent être engagées dans différents aspects de la physiologie de l'axone.

- 1) La croissance axonale durant la maturation et la régénération
- 2) La maintenance de la structure et du métabolisme de l'axone mature
- 3) La synthèse des transmetteurs chimiques situés en amont de la synapse et la libération de ces transmetteurs pour le passage de l'influx nerveux
- 4) La synthèse de précurseurs polypeptidiques pour les neurones sécréteurs.

On distingue deux types de transport axonal: l'un rapide (50 à 500 mm par jour et bidirectionnel)

l'autre, lent et allant du corps cellulaire vers l'axone à une vitesse de 0,8 à 7 mm par jour. (LASEK et HOFFMANN, 1976).

1) INJECTION D'ACIDES AMINES MARQUES

DANS LA MOELLE EPINIÈRE: Pénétration

dans le corps cellulaire.

3) 33 JOURS APRES, ON DETECTE 2 GROUPES DE

PROTEINES MARQUEES: Le premier groupe se déplace à une vitesse de 1 à 2 mm par jour et il est constitué de la tubuline et du Triplet (A).

Le deuxième groupe se déplace à une vitesse de 3 à 4 mm par jour et il est constitué de la

tubuline, de l'actine et de protéines de PM 70 000,

85 000 et 125 000 (B).

2) 10 JOURS APRES, ON DETECTE UN GROUPE DE PROTEINES

MARQUEES A UNE DISTANCE DE 13 mm DU CORPS

CELLULAIRE. Vitesse du transport = 13:10 = 1,3 mm par jour

(nerf sciatique de rat).

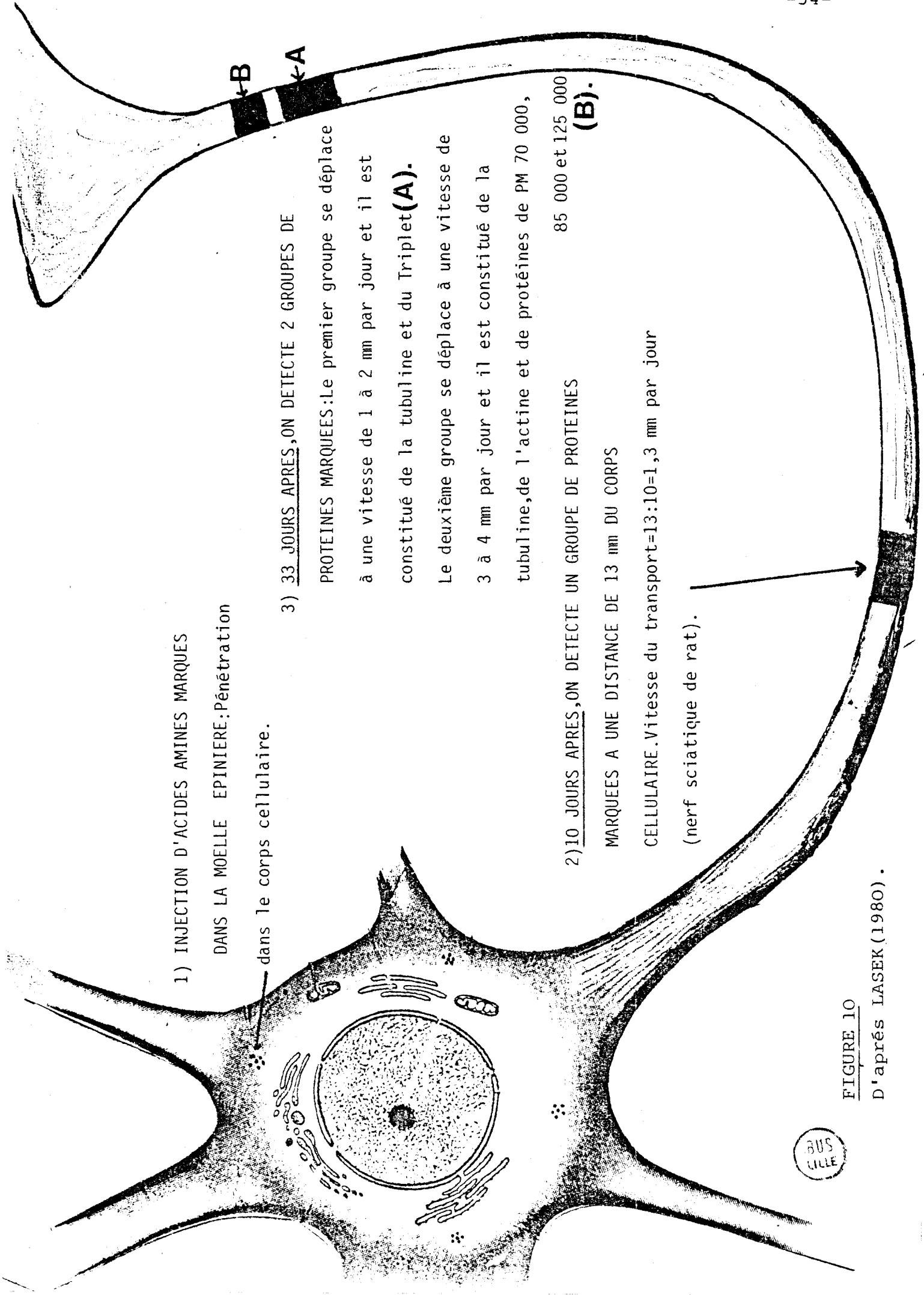


FIGURE 10

D'après LASEK (1980).



Des études très précises ont été effectuées par LASEK et HOFFMAN (1976) qui ont étudié le transport axonal après injection d'acides aminés marqués dans la moelle épinière de Rat. Les acides aminés marqués qui pénètrent dans le corps cellulaire, vont être incorporés dans les protéines nouvellement synthétisées. Une grande partie de ces protéines marquées s'achemine dans l'axone en direction de la synapse. Après une dizaine ou une vingtaine de jours, on sectionne l'axone en petits morceaux de même longueur et on étudie la composition en protéines marquées dans chaque morceau, par électrophorèse suivie d'une autoradiographie.

Ces auteurs ont ainsi pu mettre en évidence un transport axonal lent constitué par deux groupes de protéines se déplaçant à des vitesses légèrement différentes (Figure 10).
Le premier groupe de protéines comporte la tubuline et un triplet de protéines 210 K, 160 K et 68 K
Le deuxième groupe de protéines correspond à la tubuline et des protéines 125 K, 85 K, 70 K, 46 K et 35 K.

LASEK et HOFFMANN ont émis l'hypothèse que les micro-tubules et les neurofilaments se déplacent en même temps dans l'axone. Ceux-ci formeraient un réseau en mailles qui serait conduit vers la synapse par un système analogue à celui de l'acto-myosine et qui se trouverait à la périphérie de l'axone, ancré sur la membrane axoplasmique. Ce réseau en mailles se déplaçant en direction de la synapse entraînerait en même temps tout l'axoplasme avec ses vésicules et aussi ses protéines.
Au niveau de la synapse se trouverait donc un système protéolytique capable de dissocier les neurofilaments. Les protéases activables par le calcium qui dépolymériserait en même temps les microtubules.

Cette hypothèse est étayée par de nombreux faits expérimentaux. Une des expériences les plus simples et les plus probantes consiste à ligaturer l'axone. On observe alors un gonflement de l'axone côté corps cellulaire. Après avoir enlevé la ligature, la partie renflée de l'axone va se diriger vers la synapse à la vitesse du TRANSPORT AXONAL LENT.

GRIFFIN et al(1978) on étudié l'action de l'IDPN (β,β' -Imino-dipropionitrile) sur le transport axonal. Ils ont montré que l'administration d'IDPN provoque un arrêt du transport axonal lent avec un gonflement de l'axone juste à proximité du corps cellulaire. Dans cette partie d'axone qui est renflée, on observe une accumulation de neurofilaments qui possèdent une forme normale. De même, les microtubules et les filaments d'actine qui migrent avec le transport axonal lent sont également bloqués.

Le transport axonal lent est donc un phénomène de transport cytoplasmique très spécialisé mais il est raisonnable de penser qu'il repose sur des mécanismes fondamentaux qui existent dans tous les types de cellules. Le transport axonal devrait donc représenter un modèle d'étude très intéressant pour la compréhension des mécanismes de transport cytoplasmique dans tous les types cellulaires.

Revue générale: LASEK(1980), SCHWARTZ(1980), FILLIATREAU(1980).

IV - CHAPITRE TECHNIQUE.

I) PREPARATION DES MICROTUBULES (D'après la méthode de SHELANSKI, 1973)

Cette préparation s'effectue à partir de trois cerveaux de Boeuf, prélevés juste après l'abattage, et transportés dans de la glace jusqu'au laboratoire. A partir de ces cerveaux, après lavage par du sérum physiologique et élimination des méninges, on prépare 400 g de substance grise.

HOMOGENEISATION: 400 g de substance grise sont homogénéisés dans 400 ml de tampon Mes [acide 2-(N-morpholino)éthane sulfonique 0,1 M ajusté à pH 6,5 avec NaOH 1 M; $MgCl_2$ 0,5 mM, EGTA 1 mM] , dans un Waring Blendor, 3 x 10 secondes à faible vitesse puis 3 x 10 secondes à grande vitesse.

L'homogénat est centrifugé 15 min à 30 000 g. Le surnageant est prélevé et ensuite centrifugé pendant 30 min à 110 000 g. Au surnageant ainsi obtenu sont ajoutés 20 % de glycerol et 1 mM de GTP .

LA POLYMERISATION des microtubules est induite par une élévation de la température à 37°C pendant 20 min puis les microtubules formés sont centrifugés 45 min à 110 000 g à 30°C.

LA DEPOLYMERISATION s'effectue en homogénéisant le culot de microtubules dans 80 ml de tampon Mes, à 4°C, et en centrifugeant l'homogénat 30 min à 110 000 G.

A partir du surnageant obtenu, un deuxième cycle de polymérisation est induit, après avoir ajouté 1 mM de GTP et 20 % de glycerol. Le culot de microtubules de deuxième cycle obtenu après centrifugation est à nouveau homogénéisé dans 40 ml de tampon Mes à 4°C et centrifugé 30 min à 110 000 g pour éliminer le matériel non-dépolymérisable (Figure 11).

La solution de protéines microtubulaires peut être stockée à -20°C pendant un mois sans perdre son pouvoir de polymérisation. Pour cela les culots de microtubules de deuxième cycle sont homogénéisés doucement dans un tampon Mes, glycerol 8 M et stockés au froid

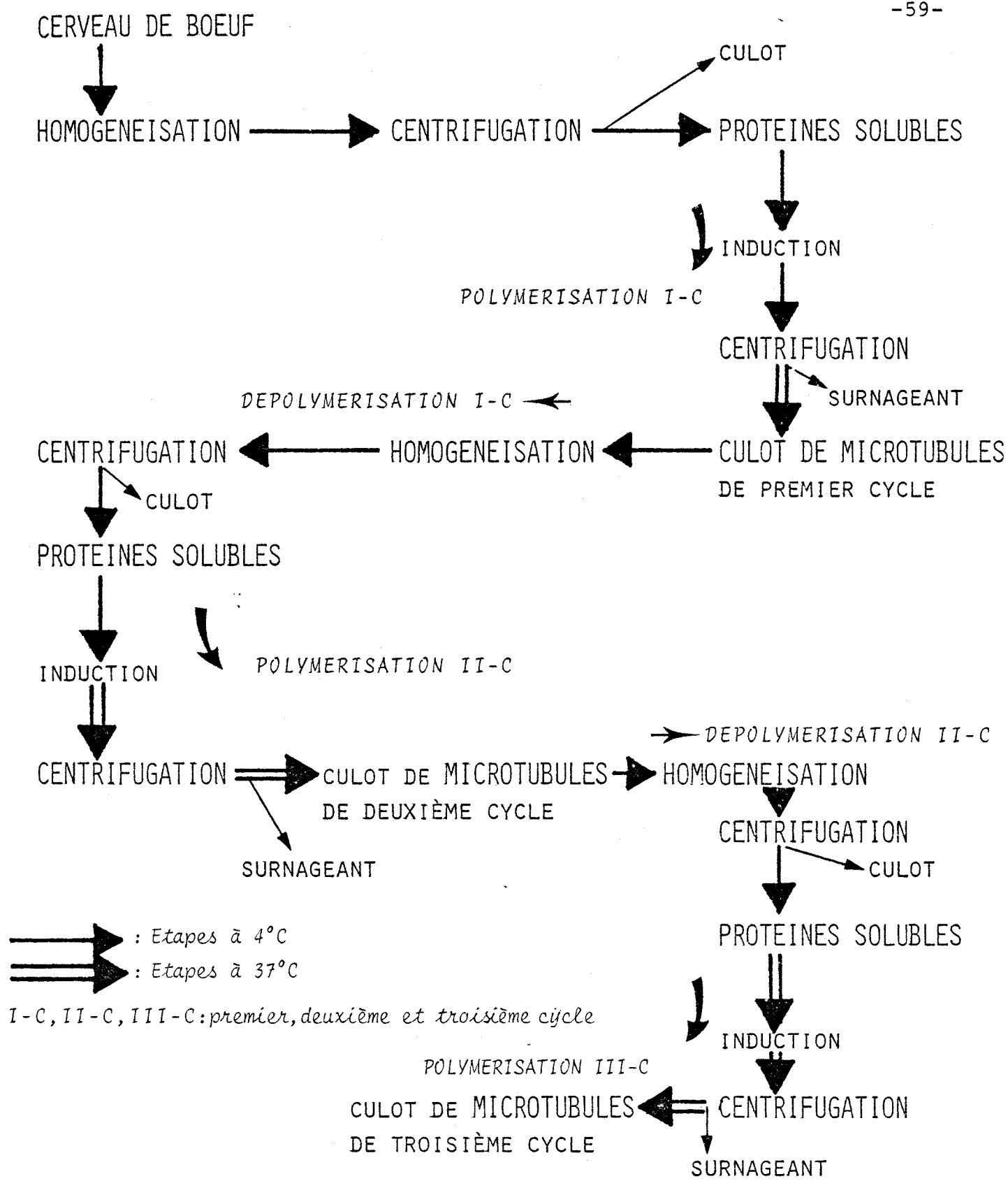


FIGURE 11

PRINCIPALES ETAPES DE LA PREPARATION DES MICROTUBULES.



II) PREPARATION DES FILAMENTS DE 10 nm. (neurofilaments)

La préparation s'effectue à partir de la moelle, après élimination des méninges et lavage par du sérum physiologique.

HOMOGENEISATION

250 g de moelle sont homogénéisés dans 400 ml de tampon Mes, dans un Waring Blendor (3 x 10 sec à faible vitesse et 3 x 10 sec à grande vitesse), en chambre froide.

L'homogénat est centrifugé 15 min à 30 000 g. Le surnageant obtenu est recentrifugé 30 min à 110 000 g.

On décante soigneusement le surnageant et on y ajoute 20 % de glycérol.

Après élévation de la température à 37°C pendant 20 min, on centrifuge 45 min à 110 000 g à 30°C.

Le culot obtenu est homogénéisé dans 60 ml de tampon Mes à 4°C et l'homogénat est centrifugé 30 min à 110 000 g, à 4°C.

On obtient ainsi le culot de neurofilaments de premier cycle.

A partir du surnageant, on induit un deuxième cycle de préparation après avoir ajouté 20 % de glycérol et chauffé la solution 20 min à 37°C. Après une centrifugation de 45 min à 110 000 g à 30°C, le culot obtenu correspond aux neurofilaments de deuxième cycle. (DELACOURTE et al., 1980, a).

III) ETUDE MORPHOLOGIQUE

A- Contraste négatif

Des colorations négatives sont obtenues en déposant une goutte de la suspension protéique sur une grille recouverte d'une membrane Pioloform F (STOCKEM, 1968) ou de Formvar.

Avant d'appliquer le contrastant sur la grille (200 mailles en général), celle-ci est rincée avec environ 10 gouttes d'une solution de KCl 0,1 M, laquelle est éliminée ensuite avec du papier filtre.

Une goutte d'acétate d'uranyle à 0,5% dans de l'éthanol à 50 % est immédiatement ajoutée. Après 5 à 10 secondes, le contrastant est éliminé et la grille est séchée pendant 1 à 2 minutes. Les préparations sont examinées au microscope électronique (Philips 300, Jeol 100 C ou Siemens 1A).

B) Fixation et inclusion

Les culots de centrifugation à analyser sont lavés dans un tampon cacodylate 0,1 M, pH 7,2 et fixés dans un tampon cacodylate 0,1 M contenant 2% de glutaraldehyde, à 4°C. Le culot est ensuite lavé dans le tampon cacodylate et fixé à nouveau dans un tampon cacodylate 0,1 M contenant 1% de tétroxyde d'osmium (p/v) pendant 1 heure à température ambiante, rincé avec le tampon cacodylate, déshydraté et inclus dans de l'araldite. Les coupes ultrafines sont contrastées une minute avec 1% d'acétate d'uranyle dans de l'alcool à 50 % et 10 minutes avec du citrate de plomb, selon la méthode décrite par REYNOLDS (1963).

Les coupes sont examinées avec le microscope électronique JEOL 100 C.

FIGURE 12

SOLUTION DE PROTEINES MICROTUBULAIRES A 4°C OBSERVEE
EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE (Contraste négatif).

Les protéines microtubulaires obtenues après deux cycles de purification et élimination du matériel non-dépolymérisable, se présentent sous la forme d'anneaux simples, d'anneaux doubles et de courts protofilaments spiralés lorsque la température est inférieure à 10°C.

A: anneaux et protofilaments enchevêtrés .

B: même observation à un grossissement supérieur.

C: Anneau double

D: Anneau simple (une flèche) et anneaux doubles (2 flèches).

Chaque barre représente 50 nanomètres.

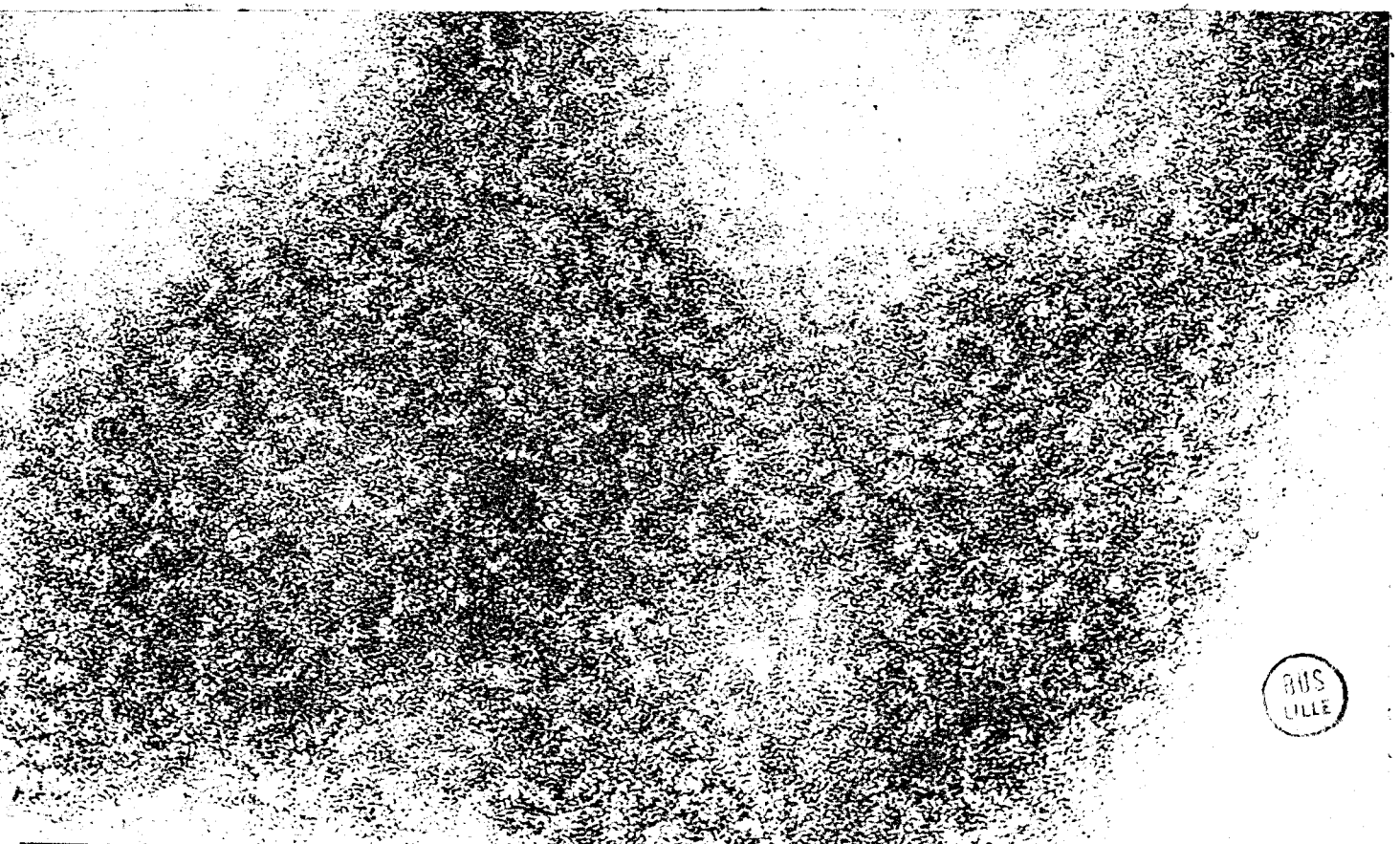
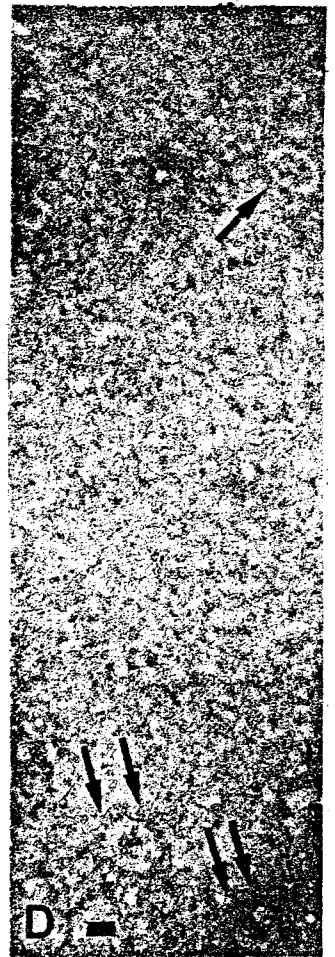
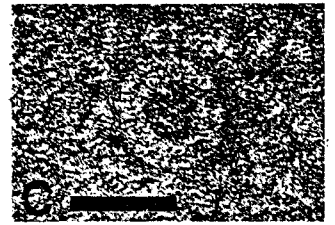


FIGURE 13

OBSERVATIONS DE LA POLYMERISATION DE MICROTUBULES DE
TROISIEME CYCLE.

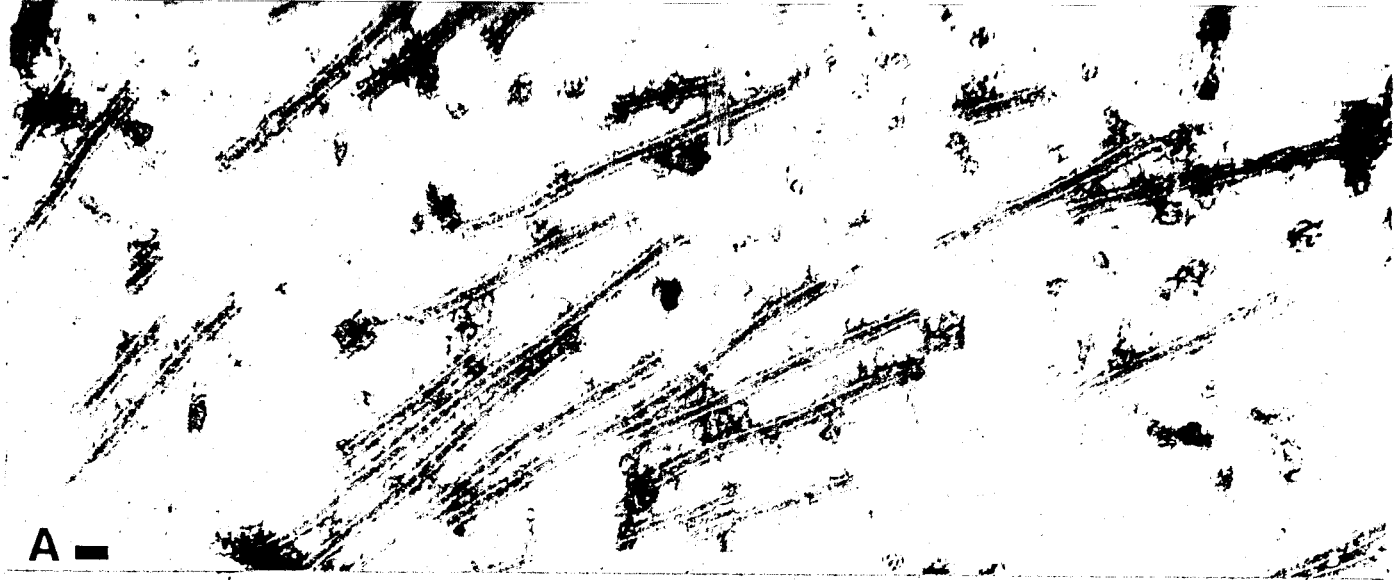
A) Microtubules après 2 minutes d'incubation à 37°C.

B) MTs après 4 minutes d'incubation.

C) MTs après 8 minutes d'incubation.

On peut observer notamment un allongement progressif
des microtubules.

Chaque barre représente 50 nanomètres.



A



B



C

BUS
LILLE

IV) ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE EN MILIEU SDS

A) Principe

Cette technique permet de séparer les protéines uniquement en fonction de leur poids moléculaire.

Les mélanges protéiques à analyser sont traités par un détergent ionique, le dodécyl sulfate de sodium (SDS) .

Ce détergent se fixe très fortement sur la protéine, principalement par des liaisons hydrophobes, en modifiant sa conformation.

Le complexe protéine-SDS prend une configuration stable sous forme allongée (rodlike particle) dont la longueur est uniquement fonction du poids moléculaire de la protéine.

De plus, la présence du 2-mercapto-éthanol dans le tampon peut réduire les ponts disulfures et permettre la libération de sous-unités protéiques encore rattachées entre elles par des liaisons disulfures (figure 14).

Le SDS se fixe dans un rapport de 1,4 gramme par gramme de protéine. Cette fixation s'effectue en 24 heures à température ambiante (et en 3 minutes à 100°C). La conformation des complexes SDS-protéine a notamment été étudiée par REYNOLDS et TANFORD (1970).

Le SDS comporte une chaîne aliphatique de 12 carbones et possède un groupement sulfate à son extrémité. En se fixant sur la protéine, le SDS apporte donc des charges négatives à la protéine.

Le rapport SDS-protéine étant constant, "l'unité de charge" pour les petites et les grandes protéines est identique. Seule, la taille de la structure SDS-protéine variera en fonction de la taille de la protéine.

Les protéines migrent à travers les mailles formées dans le gel de polyacrylamide, en direction de l'anode. Les petites protéines migrent très rapidement tandis que les grosses protéines sont freinées par les réticulations du gel de polyacrylamide (Figure 15).

Il a été établi que la migration de la protéine est proportionnelle au logarithme du poids moléculaire de la protéine.

La séparation entre les protéines est affinée, si l'on utilise un gradient de réticulation (5 à 15% pour nos études, voir page 77) au lieu d'utiliser un gel à réticulation unique (7,5% en général).

FIGURE 14

1) TRAITEMENT DE LA SOLUTION PROTEIQUE

La solution protéique à analyser est traitée par une solution réductrice qui coupe les ponts disulfures des protéines, et un détergent ionique, le dodecyl sulfate de sodium, qui se fixe très fortement sur la chaîne polypeptidique. Il en résulte une destructuration des protéines. Celles-ci vont perdre leurs conformations natives, se dérouler et prendre une forme allongée dont la taille sera fonction uniquement du poids moléculaire.

FIGURE 15

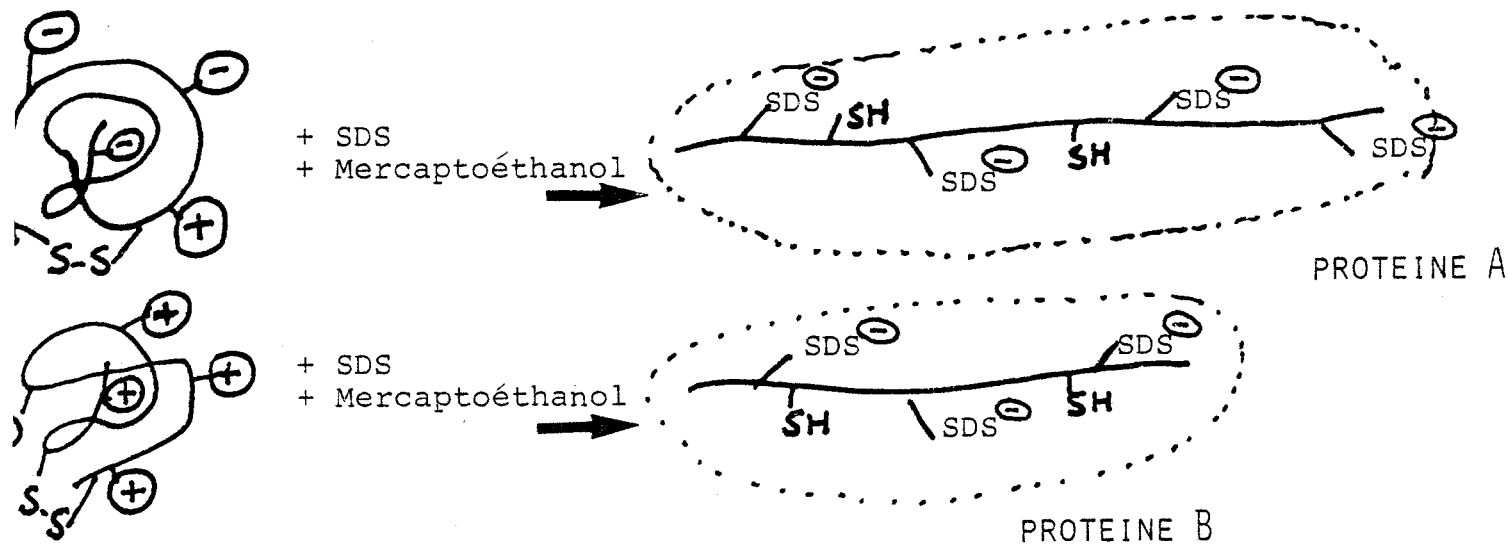
2) MIGRATION DES PROTEINES

Les protéines traitées par le SDS sont alors chargées négativement et vont migrer vers l'anode. Ces protéines, plus ou moins freinées dans les réticulations du gel de polyacrylamide, vont être séparées uniquement en fonction de leur taille, c'est à dire de leur poids moléculaire.

La protéine A, destructurée, a un poids moléculaire supérieur à celui de la protéine B.

ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE EN MILIEU SDS

1) TRAITEMENT DE LA PROTEINE



2) MIGRATION

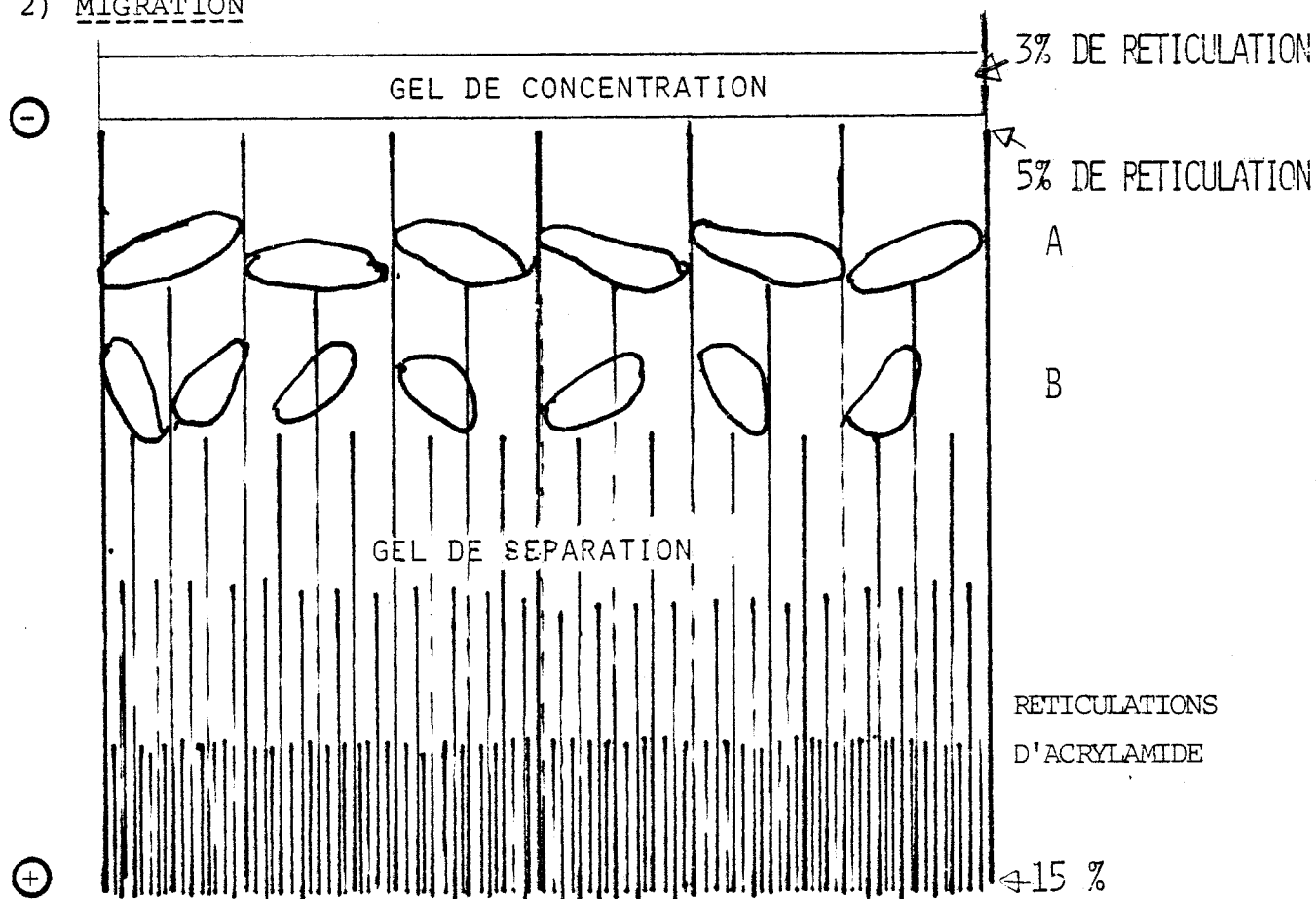


FIGURE 15



Toutes nos électrophorèses sont effectuées selon la technique classique décrite par LAEMMLI(1970).

B) METHODOLOGIE

Toutes les électrophorèses sur gel de polyacrylamide sont faites sur des plaques rectangulaires, selon un système vertical. Les compositions des gels et du tampon électrode sont celles données par LAEMMLI(1970). L'appareillage et la méthodologie utilisés sont également ceux décrits par LAEMMLI et FAVRE(1973).

Le gel comprend deux parties: une partie gel de séparation qui est un gradient d'acrylamide de 5 à 15 %, pH 8,3 et une partie supérieure constituée par le gel de concentration qui est un gel d'acrylamide à 3% avec un tampon plus acide (pH 6,8).

Avant la polymérisation du gel de concentration, on place un peigne en matière plastique qui délimite les petits puits dans lesquels sont faits les dépôts.

A) Constitution des gels.

Les gels sont préparés à partir de différentes solutions que l'on peut conserver à 4°C pendant plusieurs semaines.

Il s'agit des solutions suivantes:

I) Solution d'acrylamide à 5%

acrylamide	50 g	
bis-acrylamide	1,33 g	
Tris	45,3 g	
SDS	1,0 g	
Temed	300 µl	
HCl 5,6 N	pour obtenir le pH de 8,8	
q.s.p H ₂ O	1 litre	

II) Solution d'acrylamide à 15%

acrylamide	150 g	
bis-acrylamide	3,99 g	
Tris	45,3 g	
SDS	1,0 g	
Temed	300 µl	
Saccharose	200 g	HCl 5,6 N pour obtenir pH 8,8.
q.s.p H ₂ O	1 litre	

III) Solution de concentration

Acrylamide	30	g
Bis-Acrylamide	0,8	g
Tris	15,1	g
Temed	500	µl
SDS	1,0	g
HCl 5,6 N	pour obtenir un pH de 6,8	
q.s.p H ₂ O	1 litre	

Pour préparer simultanément 4 gels de séparation, il faut 55 ml des solutions I et II. Le catalyseur utilisé est le persulfate d'ammonium. Le persulfate est ajouté extemporanément; Il faut 320µl d'une solution à 100 mg/ml dans de l'eau pour 55 ml de solution I + II.

Pour le gel de concentration, il faut 10 ml de solution de concentration n° III + 500 µl de persulfate.

Le gradient d'acrylamide est effectué à l'aide d'une pompe péristaltique, selon la méthode décrite par Pharmacia (Bois d'ARCY) dans ses fiches techniques.

Préparation des gels

Le réservoir qui contiendra le gel polymérisé est constitué par 2 plaques de verre, rectangulaires, de dimension 100 x 150 mm écartées de 1,5 mm par deux entretoises en matière plastique, le tout maintenu par 4 pinces.

Avant de couler le gradient d'acrylamide, il est nécessaire de couler un bouchon d'acrylamide (5 ml de solution II + 125 µl de persulfate) par gel.

Le tampon d'électrophorèse utilisé se compose de:

Tris	12	g
Glycocolle	57,2	g
SDS	20	g
HCl 5,6 N	pour obtenir un pH de 8,3.	
q.s.p H ₂ O	1 litre	

(A diluer au 1/4 au moment de l'emploi).

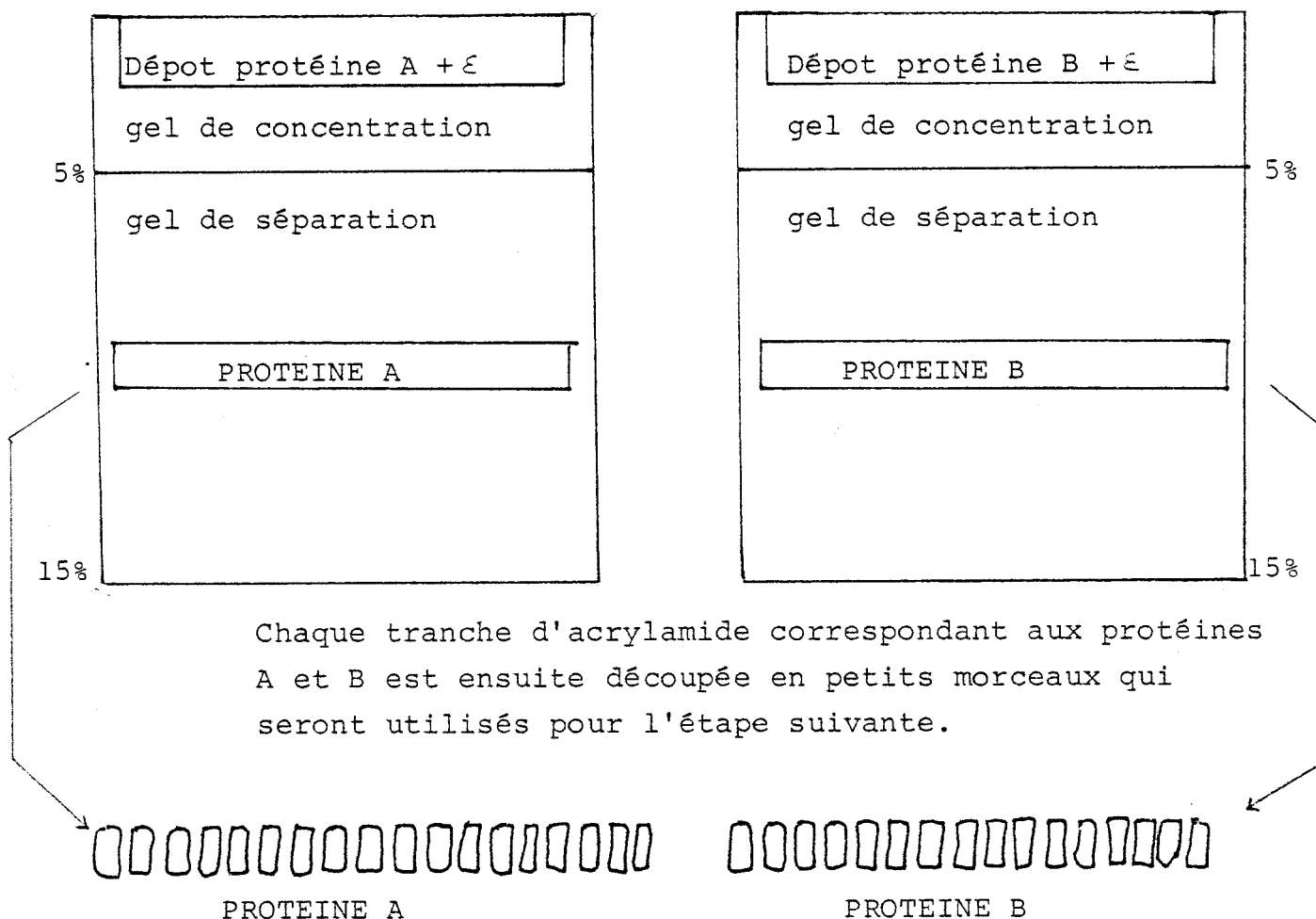
c) COMPARAISON DE DEUX PROTÉINES PAR LA TECHNIQUE DES CARTES PEPTIDIQUES SUR GEL D'ACRYLAMIDE (CLEVELAND et al, 1977).

Exemple donné pour une comparaison de deux protéines d'origine différente ,de même poids moléculaire mais de structure chimique différente.

1) Traitement des deux solutions protéiques d'origine différente, la première contenant entre autres la protéine A, et la seconde la protéine B. Les protéines A et B possèdent le même poids moléculaire. Le traitement se fait en présence de 2 à 5 % de SDS et de 5 % de mercapto-éthanol , en chauffant à 100 °C pendant 3 minutes. (voir la description du principe page 69).

2) Gel préparatif

Chaque mélange protéique est déposé sur un gel d'acrylamide préparatif. Après la migration, les protéines sont repérées sur le gel par une coloration discrète au Bleu de Coomassie. Les bandes du gel d'acrylamide correspondant aux protéines A et B sont découpées du gel .

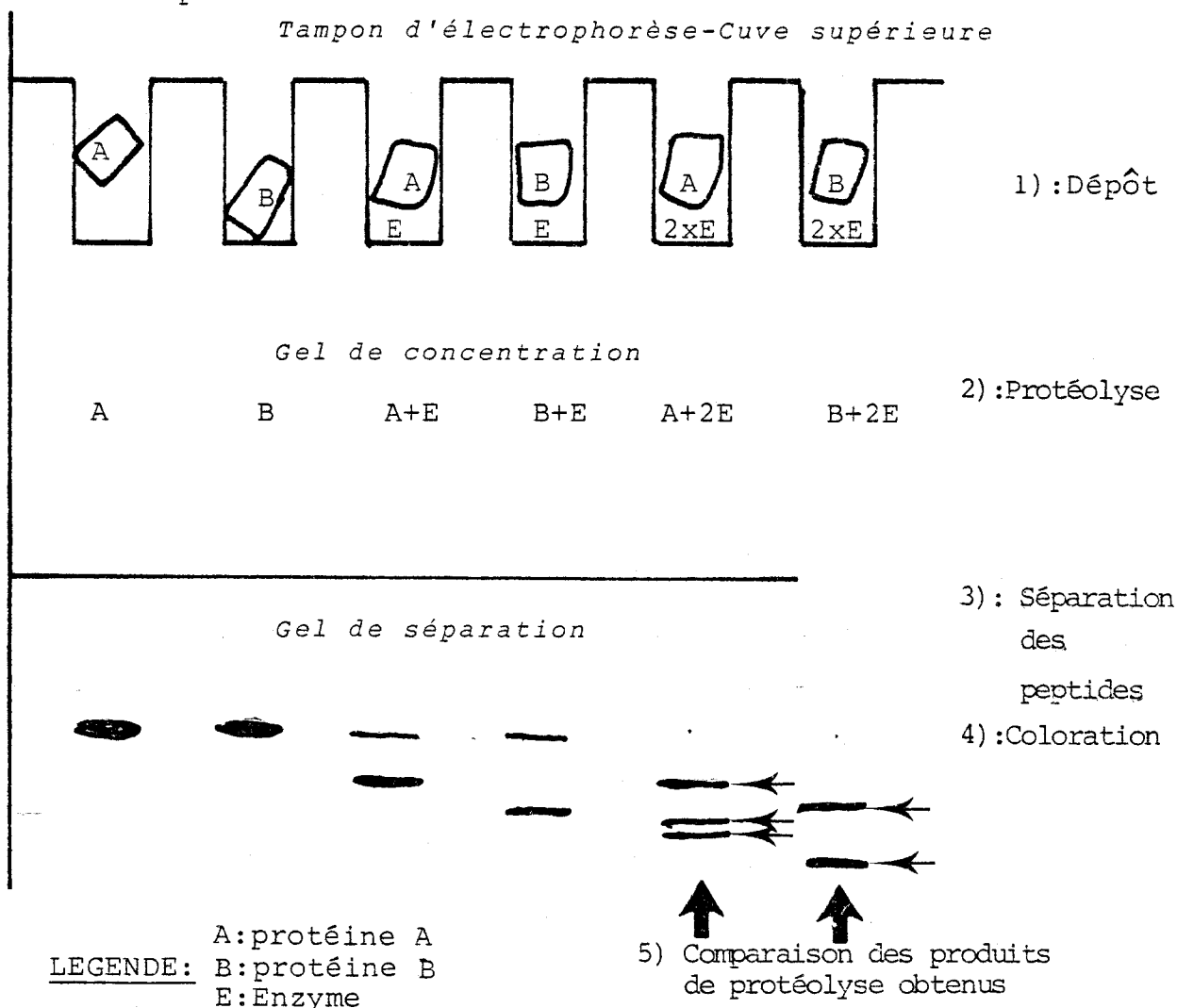


3) HYDROLYSE ENZYMATIQUE ET MIGRATION DES PEPTIDES OBTENUS

Les morceaux du gel d'acrylamide contenant les protéines A et B sont déposés alternativement dans chaque puits du gel. Dans ces mêmes puits sont ajoutées des quantités croissantes d'un enzyme protéolytique dissout dans le tampon d'électrophorèse (par exemple la papaïne ou la pronase) contenant 10 % de glycerol pour éviter la diffusion.

Après l'établissement du courant d'électrophorèse, les protéines A et B sortent des morceaux d'acrylamide et migrent ainsi que l'enzyme, en direction de l'anode. Dans le gel de concentration, les protéines A et B sont en contact avec l'enzyme et elles sont protéolysées. Cette protéolyse peut être augmentée en jouant sur les concentrations d'enzyme déposées.

Ensuite, les protéines et les peptides obtenus "sortent" du gel de concentration pour pénétrer dans le gel de séparation. Ceux-ci sont alors séparés en fonction de leur poids moléculaire.



4) COMPARAISON DES PRODUITS DE PROTEOLYSE

Après l'hydrolyse enzymatique, les peptides migrent en direction de l'anode. Ensuite le gel d'acrylamide est coloré au bleu de Coomassie et on peut comparer les produits de protéolyse des protéines A et B.

Dans l'exemple donné page 73, les protéines A et B sont différentes puisque les peptides libérés migrent différemment.

Généralement, l'expérience peut être complétée par 2 ou 3 comparaisons des hydrolysats obtenus avec des enzymes différents. Chaque carte peptidique est spécifique de l'enzyme utilisé.

Si les cartes peptidiques obtenues à partir de deux protéines d'origine différente sont identiques après l'emploi de trois enzymes différents, il est pratiquement certain que ces protéines possèdent une structure chimique identique.

Il a été montré que l'alpha- et la bêta-tubuline sont deux protéines très voisines (voir page 24). Ces deux protéines comparées par cette technique montrent des cartes peptidiques différentes.

Ces résultats indiquent donc que la technique est très spécifique (CLEVELAND et al., 1977).

V) GEL-FILTRATION (Tamisage moléculaire).

1) Purification des filaments de 10 nm.

Principe: Au cours d'une gel-filtration, les molécules de plus grande taille ne sont pas retenues par les trames du gel et sont exclues. Elles sortent donc en premier au cours de l'élution.

Dans le cas d'un mélange protéique contenant des filaments de 10 nm, ces derniers sont exclus tandis que les protéines (ou les associations de protéines) ayant un poids moléculaire inférieur à 50 millions de daltons sont retenues en fonction de leur poids moléculaire, si l'on travaille avec un Bio Gel A 50-m.

L'intérêt de cette technique est de séparer facilement les filaments des autres constituants protéiques (BERKOWITZ et al., 1977).

En utilisant un tampon Mes-NaCl 1 M, on dissocie les polymères de tubuline se trouvant dans la solution de départ (comme les anneaux simples et doubles) qui sont exclus et viennent contaminer la fraction contenant les filaments de 10 nm.

Méthodologie: Nous avons utilisé une colonne "Pharmacia" de 1 mètre de haut et de 2,5 cm de diamètre, remplie par un Bio-Gel A 50-m (50-100 mesh). Le tampon d'élution est un tampon Mes-NaCl 1M et le débit est de 12 ml par heure. Nous avons déposé de 50 à 100 mg de protéines. Les protéines éluées sont repérées par une mesure de la densité optique de l'éluat à la sortie de la colonne, à une longueur d'onde de 280 nm.

2) Séparation des protéines de neurofilaments

Nous avons choisi un gel très stable, le Sépharose CL 4B (Pharmacia) pour séparer les protéines en milieu dénaturant. Dans un tampon Tris 0,1 M, chlorhydrate de guanidine 5 M, dithiothréitol 2 mM, pH 8,3 qui sert également de tampon d'éluat, on dissout 150 mg de neurofilaments. La solution est portée à 60°C pendant 30 minutes pour dissocier totalement les neurofilaments.

Nous utilisons 2 colonnes de 1 mètre de haut et 2,5 cm de diamètre en continu. Le débit est de 12 ml par heure et la densité optique de l'éluat est lue à 280 nm. La séparation s'effectue à température ambiante.

V - RESULTATS

I) MISE EN EVIDENCE DE L'ISOLEMENT DE FILAMENTS DE 10 nm
AU COURS DES CYCLES DE PREPARATION DES MICROTUBULES.

Les microtubules sont généralement préparés suivant la méthode de SHELANSKI(1973). Au cours des deux premiers cycles de préparation (voir page 63), nous avons observé la présence de filaments de 10 nm de diamètre dans les culots de microtubules obtenus après les cycles de polymérisation, et dans les culots de matériel sédimentable, non-dépolymérisable des deux premières étapes de dépolymérisation à 4°C (voir la figure suivante).

Ces filaments ont été observés pour la première fois par KEATES et HALL(1975). Nous pouvions supposer qu'ils correspondaient à des protofilaments de tubuline plus ou moins dénaturée. Cependant, la quantité très importante de ces filaments collectés après les étapes de dépolymérisation d'une part, et leur forme très régulière d'autre part, laisse présager que ces filaments correspondent à autre chose qu'à des associations de protéines dénaturées.

Pour préciser leur origine et éventuellement leur rôle, nous avons purifié la fraction contenant ces filaments et nous avons ensuite déterminé leur composition en protéines.

A) PURIFICATION DES FILAMENTS DE 10 nm.

Après l'étape de dépolymérisation des microtubules, le matériel non-dépolymérisable est centrifugé à haute vitesse. Parmi ce matériel, il y a les filaments de 10 nm mais également des associations de tubuline à 4°C, notamment des anneaux 36S et des petits protofilaments (voir figure 12, page 67).

En milieu NaCl 1,0 M, les associations de tubuline sont dépolymérisées alors que les filaments de 10 nm ne le sont pas. Après homogénéisation de la fraction non-dépolymérisable dans un tampon NaCl 1M, le matériel centrifugé correspond alors à une fraction enrichie en filaments de 10 nm, dépourvue des protéines microtubulaires solubles.

Cette fraction a été étudiée en microscopie électronique. Nous avons également établi sa composition en protéines.

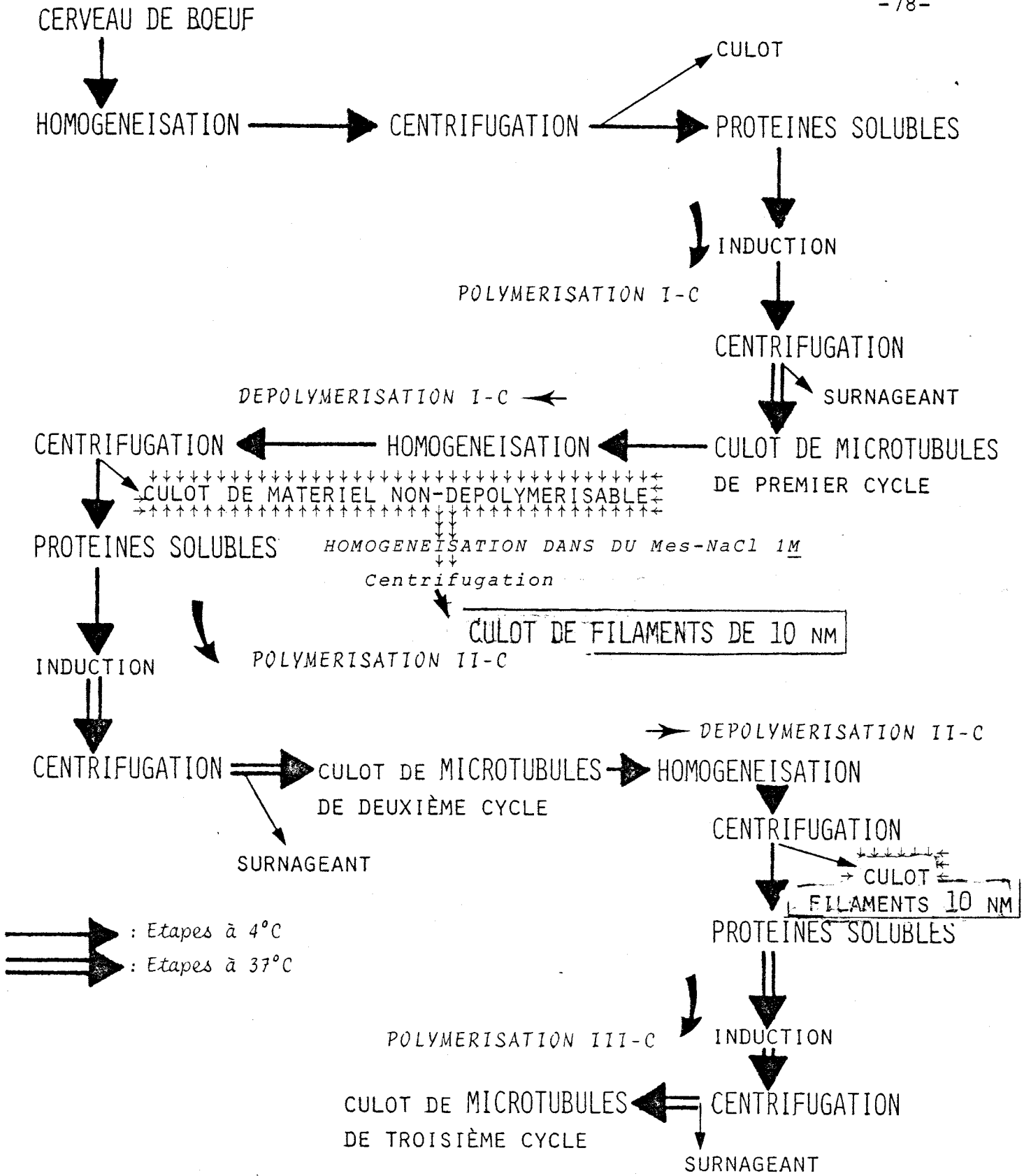


FIGURE 16



Préparation de la fraction contenant des filaments de 10 nm.

B) ETUDE MORPHOLOGIQUE

Les observations en microscopie électronique par contraste négatif montrent que les filaments de 10 nm possèdent un diamètre régulier, qu'ils sont longs, flexibles, et qu'ils ne possèdent pas de ramifications ou de points de branchements (Figure 17).

Ces filaments ne sont pas "décorés" par les chaînes lourdes de la myosine (H.M.M: Heavy Mero Myosin), ce qui indique que l'actine n'interagit pas directement avec les filaments de 10 nm et qu'elle n'est pas intégrée dans la structure du filament (Etude effectuée par F.H.HILDEBRAND, selon la technique décrite dans sa thèse de Sciences, 1978, LILLE).

Les filaments de 10 nm observés après les cycles de dépolymérisation semblent parfois être décorés de petits granules tandis que les filaments lavés par le NaCl 1 M sont plus lisses. Ces filaments, observés au cours des différentes étapes de préparation des microtubules, et après l'étape ultérieure de purification dans le tampon Mes-NaCl 1M sont présentés figure 18.

FIGURE 17

Microtubules et filaments de 10 nm observés au cours du premier cycle de préparation. MT: Microtubules; F 10 nm: Filaments de 10 nm.

Partie supérieure: grossissement 44 000 .
Partie inférieure: grossissement 120 000.

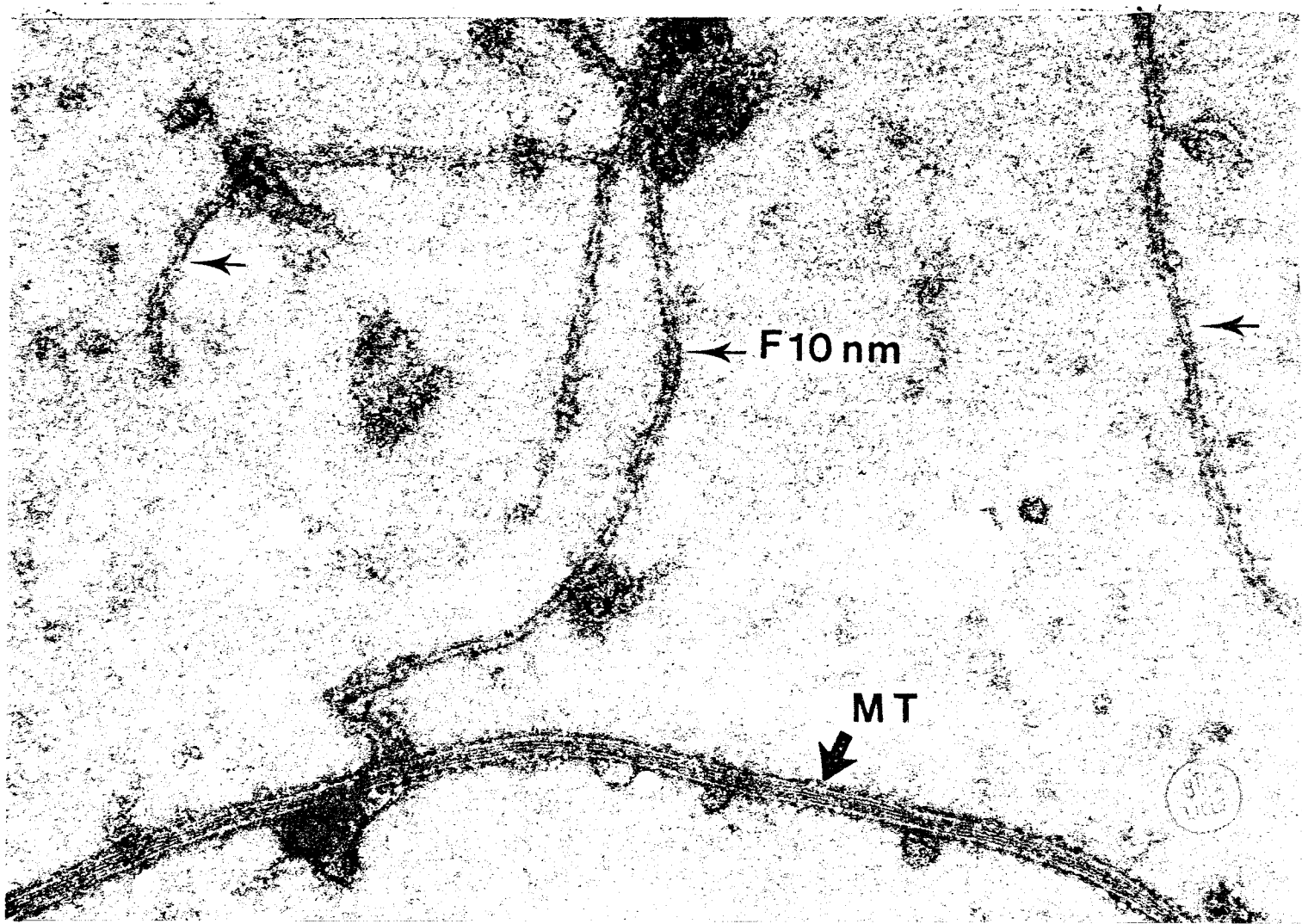
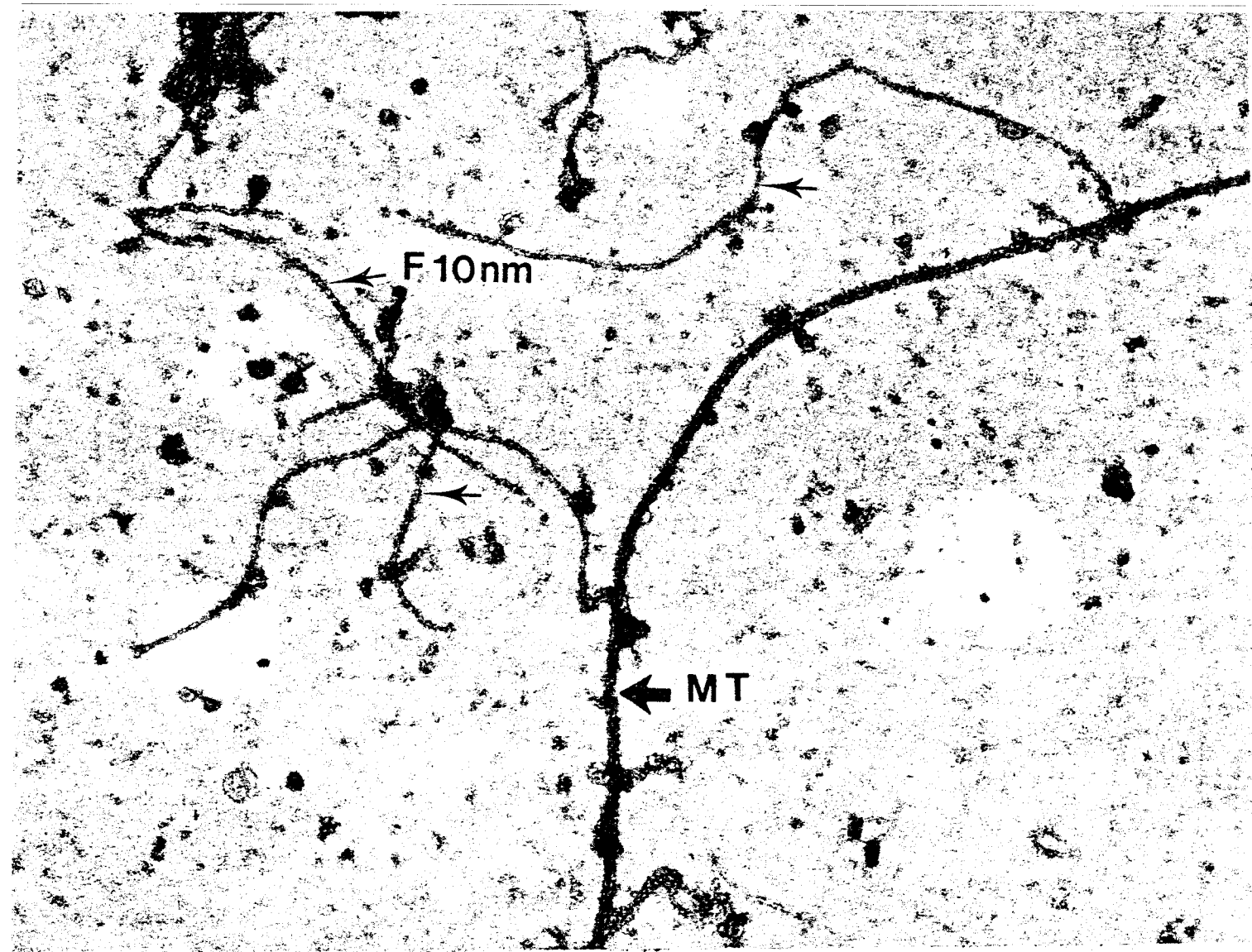


FIGURE 18

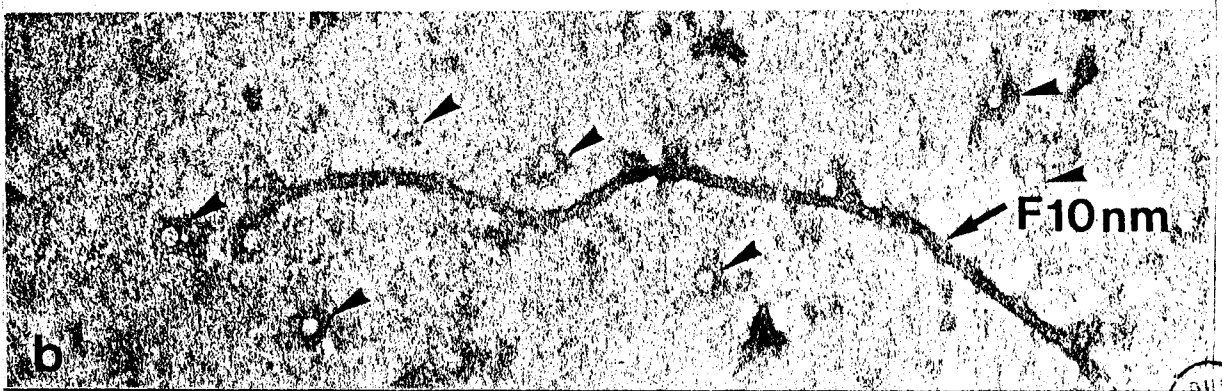
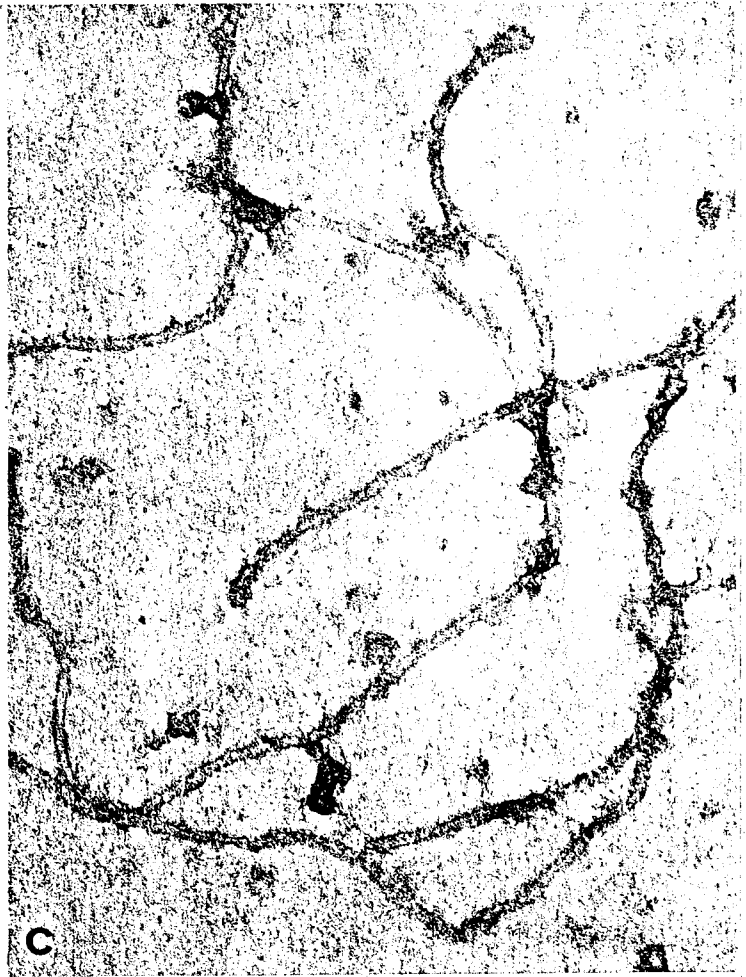
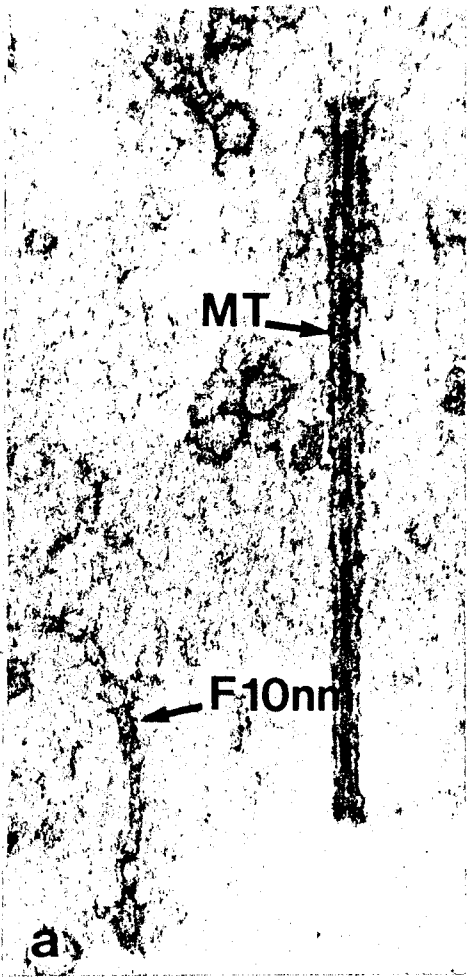
Filaments de 10 nm observés au cours des étapes de préparation des microtubules et après l'étape de purification des filaments dans le tampon Mes-NaCl 1 M.

a) Etape de polymérisation. On peut observer des microtubules et des filaments de 10 nm.

b) Etape de dépolymérisation. Les filaments de 10 nm sont environnés d'anneaux 36 S.

c) Filaments de 10 nm lavés par le tampon Mes-NaCl 1 M.

Grossissement: 120 000.



BHS
LILLE

COMPOSITION EN PROTEINES

La composition en protéines de la fraction purifiée contenant les filaments de 10 nm a été étudiée par électrophorèse en gel de polyacrylamide en milieu SDS (voir chapitre technique page 66).

Comme le montrent les électrophorèses figure 19, les filaments sont constitués d'une protéine majeure qui migre comme la tubuline et de protéines de haut poids moléculaire (70 000, 160 000, 210 000 et 300 000 daltons).

La protéine majeure migre exactement comme la tubuline. Lorsque les conditions d'électrophorèse permettent de séparer l'alpha et la bêta tubuline, la protéine majeure des filaments de 10 nm se sépare en deux bandes qui migrent comme les sous-unités de tubuline. (figure 19, B).

De même, cette protéine migre comme la tubuline lorsque cette dernière ne donne qu'une bande 55 K (figure 19, A).

Les conditions électrophorétiques qui permettent une bonne séparation de l'alpha et la bêta tubuline ne sont pas encore bien définies. Pour cette expérience, nous avons utilisé une carboxy-méthylation, selon les conditions décrites par EIPPER (1972), qui permet la séparation des deux tubulines.

Les protéines qui possèdent un poids moléculaire de 300 000 sont les MAPs 1 et 2 (Microtubule Associated Proteins) appelées également Facteur TAU 2 par l'équipe de KIRSCHNER (CLEVELAND et al., 1977, a et b).

Il nous restait donc à déterminer l'origine des trois protéines de poids moléculaires 210 000, 160 000 et 70 000 daltons que nous appellerons les protéines 210 K, 160 K et 70 K.

Au cours des deux premiers cycles de préparation, la composition en protéines des fractions de filaments de 10 nm est identique. Cependant, au troisième cycle, les microtubules sont très purifiés et les filaments de 10 nm ont pratiquement disparu.

Simultanément, on observe la disparition des protéines 210 K, 160 K et 70 K. Ces 3 protéines semblent donc associées à la présence des filaments de 10 nm. (DELACOURTE et al, 1977-a).

FIGURE 19

COMPARAISON DES PROTEINES DE LA FRACTION MICROTUBULAIRE ET

DE LA FRACTION DE FILAMENTS DE 10 nm. Les solutions protéiques F et MT ont été déposées en quantité croissante pour permettre une comparaison des protéines majeures et mineures.

A : La fraction de filaments de 10 nm est constituée d'une protéine majeure qui migre comme la tubuline, et de 3 protéines 210 K, 160 K et 70 K.

B : Les protéines ont été carboxyméthylées pour favoriser la séparation entre l'alpha et la bêta tubuline (EIPPER, 1972).

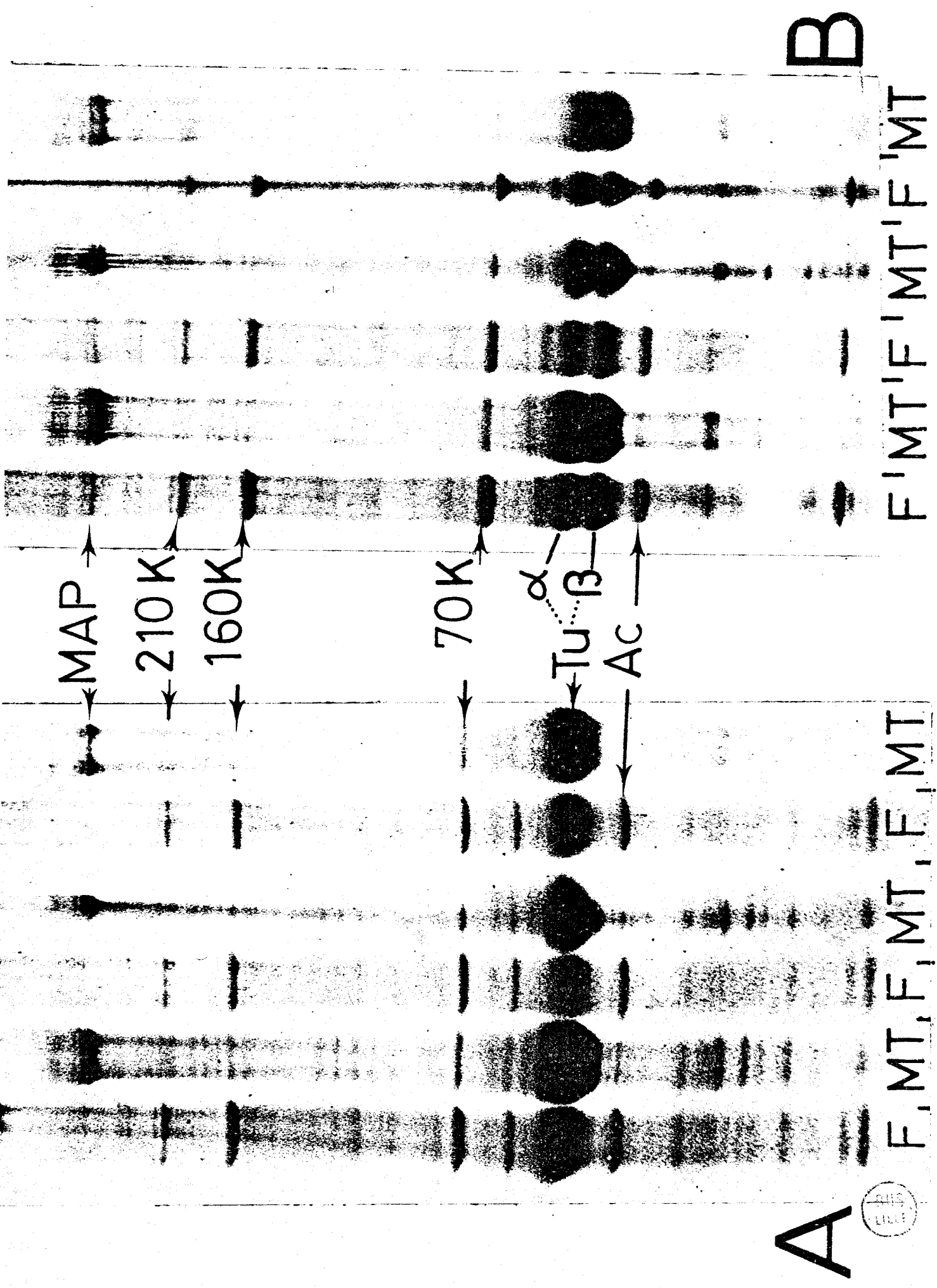
Nous pouvons observer que la protéine majeure des filaments de 10 nm donne, dans les mêmes conditions, 2 bandes qui migrent comme l'alpha et la bêta tubuline.

F: Filaments de 10 nm.

MT: Microtubules

MAPs: Microtubule Associated Proteins

Ac: Actine



A

B

F, MT, F, MT, F, MT, F, MT

F, MT, F, MT, F, MT, F, MT

MSL
LINE

Par contre, la présence de la tubuline et des MAPs dans la fraction contenant les filaments de 10 nm peuvent correspondre à un agrégat de protéines microtubulaires. Nous avons remarqué qu'au troisième cycle de préparation des microtubules, une petite quantité de matériel non-dépolymérisable dans le tampon Mes-NaCl 1M est constituée uniquement de tubuline et de MAPs et ne contient pas de filaments de 10 nm.

Il s'agit donc très probablement d'agrégats de protéines microtubulaires.

Ces résultats semblent indiquer que la fraction de filaments de 10 nm est constituée de deux éléments différents: les filaments de 10 nm et les agrégats de tubuline.

Nous avons donc essayé de solubiliser spécifiquement la tubuline se trouvant dans cette fraction.

Pour cela nous avons homogénéisé la préparation de filaments dans des tampons de force ionique élevée susceptible de solubiliser spécifiquement la tubuline. (tampon phosphate 0,05 M, iodure de potassium 1 M, ou avec des doses progressives de chlorure de sodium jusqu'à la saturation, et cela à différents pH entre 4 et 9).

Nous avons également essayé les détergents non-ioniques comme le Triton X 100 ou le Nonidet P 40 (*) qui dissolvent très bien la tubuline et les membranes.

Les tampons dénaturants comme l'urée ou le chlorhydrate de guanidine ont également été utilisés à des concentrations progressives.

Dans tous les cas, nous n'avons jamais obtenu de solubilisation sélective d'une des protéines qui composent la fraction des filaments de 10 nm.

Ces expériences ne nous ont donc pas permis de dire si la tubuline est liée très fortement aux filaments de 10 nm ou si elle se trouve sous forme d'agrégats insolubles dans les différents tampons essayés.

La similitude entre les filaments de 10 nm que nous avons isolés et les filaments intermédiaires du cerveau (ANDERTON et al., 1976) est évidente.

(*) Polyoxyéthylène octyl phénol (n=10 : Triton X 100
n=7,5: Nonidet P 40)

Nous avons remarqué que nos filaments de 10 nm possèdent un diamètre et une forme similaires aux neurofilaments et aux filaments gliaux. De plus, leur stabilité dans des tampons de force ionique élevée est une des caractéristiques des neurofilaments de Mammifères.

Cependant les sous-unités protéiques des filaments intermédiaires du cerveau sont décrites comme possédant un poids moléculaire voisin de 50 K (voir pages 39 à 41).

Seules, les études de LASEK et HOFFMANN (1976) indiquent qu'au transport axonal des neurofilaments sont associées trois protéines de poids moléculaire 200 K, 145 K et 68 K (chez le Rat).

Nous avons eu la chance de pouvoir collaborer avec Brian ANDERTON et nous avons pu comparer les filaments de 10 nm isolés au cours des préparations de microtubules avec sa préparation de neurofilaments qui contenait certes une protéine majeure 50 K, mais également trois protéines 210 K, 160 K et 70 K en quantité appréciable.

II) COMPARAISON DES FILAMENTS DE 10 nm AVEC LES NEUROFILAMENTS

A) Comparaison par électrophorèse-SDS.

Dans un premier temps, nous avons comparé le comportement électrophorétique des protéines de neurofilaments et des filaments de 10 nm, sur gel d'acrylamide-SDS.

Comme le montre la figure 20, les trois protéines de haut poids moléculaire (210K, 160 K et 70 K) sont des protéines communes aux deux types de filaments d'origine différente.

Pour les neurofilaments, nous observons la présence d'une protéine 50 K, qui migre un peu plus vite que la bêta-tubuline.

Cependant, si l'on retrouve trois protéines de même comportement électrophorétique dans les deux structures filamenteuses, rien ne prouve qu'il s'agit de protéines chimiquement identiques.

Nous avons donc entrepris une "comparaison chimique" de ces protéines, en utilisant la technique très fine des cartes peptidiques en gel d'acrylamide (voir la description de la technique page 72-74).

Pour chaque protéine, nous avons donc comparé les produits de protéolyse obtenus par hydrolyse enzymatique (pronase, subtilisine et papaïne) à ceux obtenus dans les mêmes conditions à partir de la protéine de même poids moléculaire mais d'origine différente.

Les conditions expérimentales utilisées, notamment le rapport enzyme/substrat et les temps de protéolyse dans le gel, sont celles décrites par CLEVELAND et al, 1977.

FIGURE 20

COMPARAISON DES FILAMENTS DE 10 nm AVEC LES NEUROFILAMENTS

A.M : Acto-myosine de Lapin, constituée principalement de la chaîne lourde de la myosine (200 K), et de l'actine (44 K).

NF : Neurofilaments préparés suivant la méthode de "flottation" (THORPE et al., 1979, a)

F 10 nm : Filaments de 10 nm isolés au cours des préparations de microtubules.

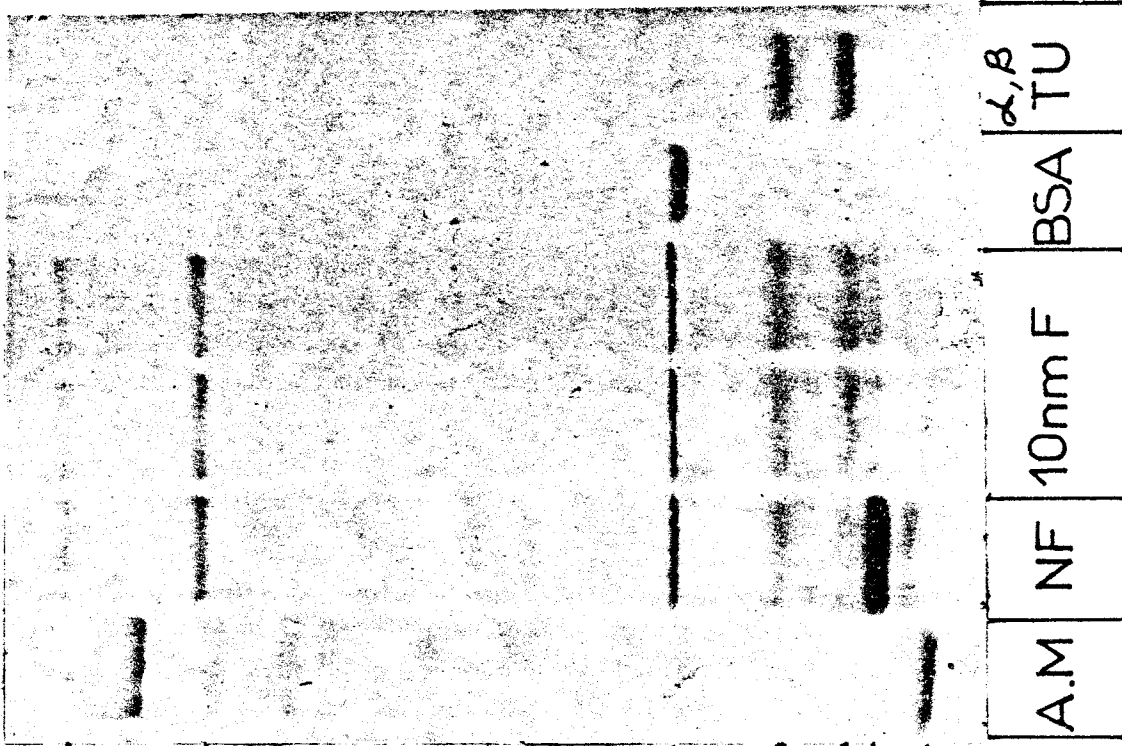
BSA : Témoin de Sérúm Albumine (68 K)

Tu : Témoin de tubuline

Trois protéines sont communes aux neurofilaments et à la fraction de filaments de 10 nm; Il s'agit des protéines 210 K, 160 K et 70 K.

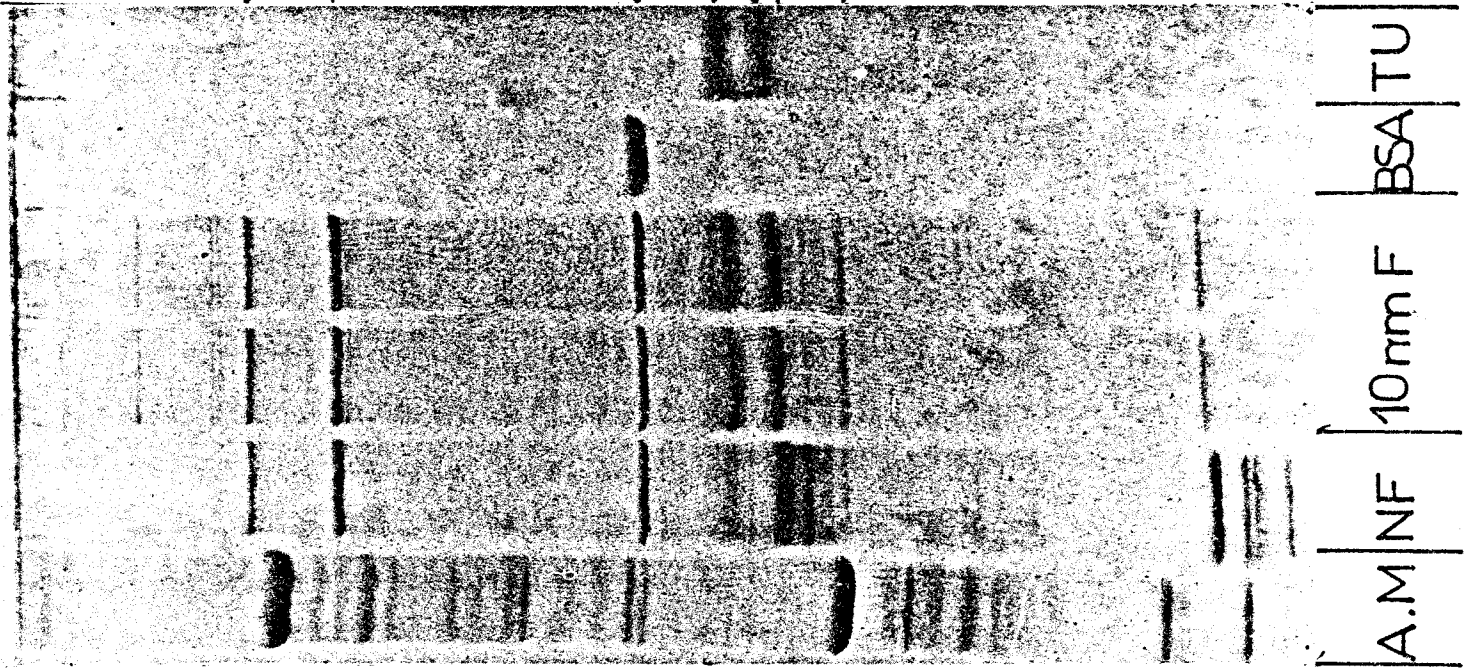
A : gel à 12 % de réticulation B : gel à 10 % de réticulation

B



A.M	NF	10nm F	BSA	α , β TU
-----	----	--------	-----	--------------------------

A



A.M	NF	10nm F	BSA	TU
-----	----	--------	-----	----



B) Comparaison des protéines constitutives des filaments de 10 nm et des neurofilaments par la technique des cartes peptidiques selon la méthode de CLEVELAND et al., 1977.

Les résultats sont présentés dans les figures 21 et 22. Ils indiquent sans ambiguïté que les trois protéines 210 K, 160 K et 70 K des préparations de filaments de 10 nm et de neurofilaments sont identiques.

Nous avons également pu montrer que la protéine majeure des préparations de filaments de 10 nm était identique à la tubuline.

Cette étude a été continuée par Brian ANDERTON qui a comparé la bêta-tubuline des microtubules à la protéine 50 K des préparations de neurofilaments et qui a démontré que ces protéines sont différentes. De plus, la protéine 50 K pourrait être un produit de protéolyse de la protéine 70 K (THORPE et al., 1979 a).

La comparaison des neurofilaments avec les filaments de 10 nm isolés au cours de préparations nous a montré que trois protéines de 210 K, 160 K et 70 K sont communes à ces deux types de filaments.

Par contre, la protéine 50 K que l'on retrouve dans les préparations de neurofilaments est différente de la tubuline isolée avec les préparations de filaments de 10 nm.

Qu'elle est l'origine de la protéine 50 K?

Cette protéine est d'origine gliale (BIGNAMI et DAHL, 1977).

Cependant, les travaux d'ANDERTON montrent que la protéine 50 K pouvait être un produit de protéolyse de la protéine 70 K des neurofilaments. (THORPE et al., 1979-a).

Il semble donc bien établi que cette protéine 50 K n'entre pas dans la constitution des neurofilaments natifs.

FIGURE 21

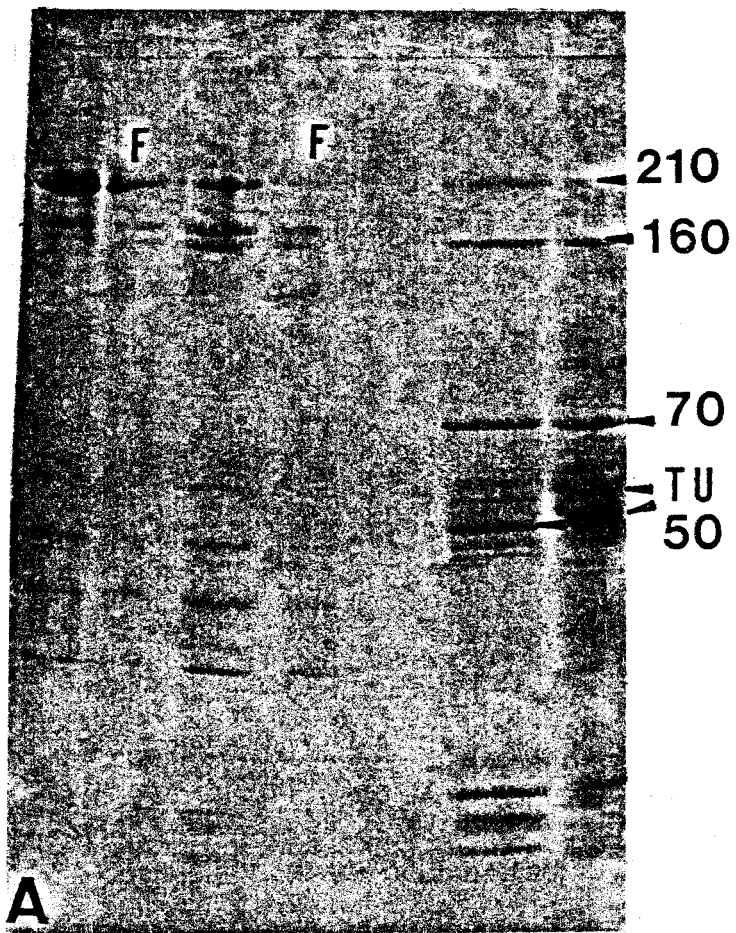
COMPARAISON DU TRIPLET DE PROTEINES DES NEUROFILAMENTS (NF)
AVEC CELUI DES FILAMENTS DE 10 nm(F).

Comparaison par la technique de CLEVELAND et al., (1977).

Les produits de protéolyse des protéines 210K des neurofilaments et des filaments de 10 nm, obtenus par action de la pronase, sont identiques (A). Il en est de même avec la papaïne et la subtilisine.

De la même manière, la carte peptidique de la protéine 160 K des neurofilaments et des filaments de 10 nm, obtenus par action de la pronase, sont identiques (B). Il en est de même avec la papaïne et la subtilisine.

Avec la protéine 70 K provenant des neurofilaments et des filaments de 10 nm, on obtient également des fingerprints comparables après la digestion par la subtilisine (C), la papaïne et la pronase.

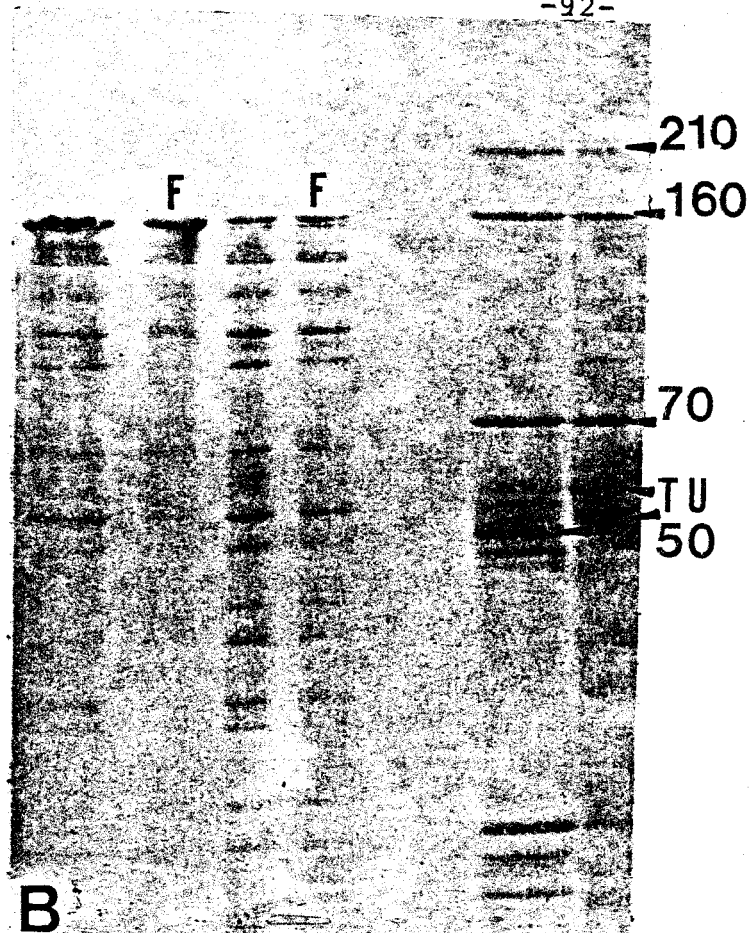


210K

NF

F

+ PRONASE

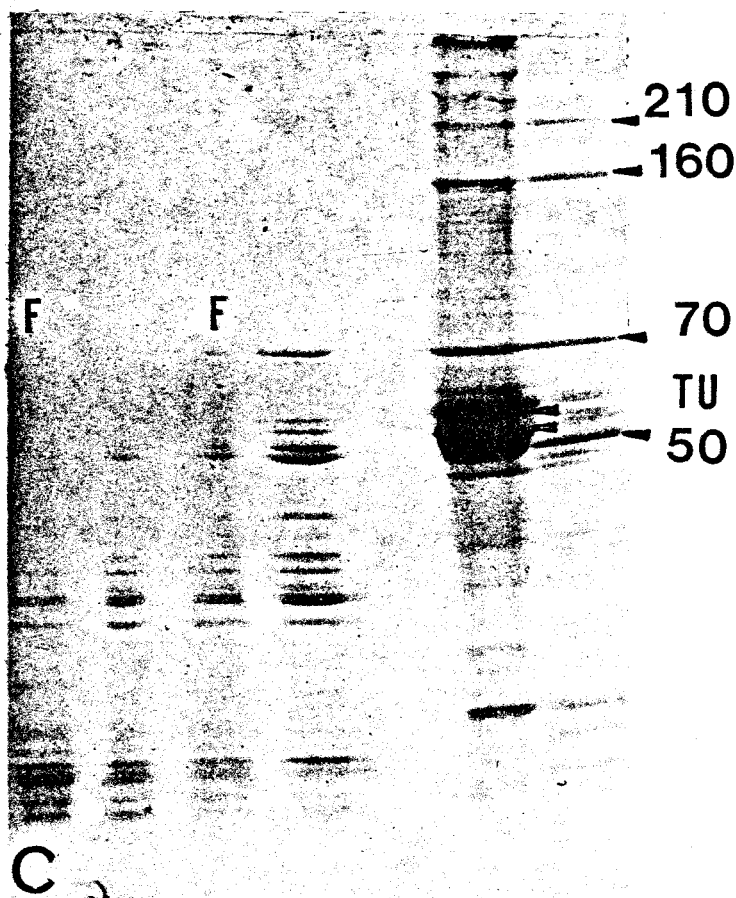


160K

NF

F

+ PRONASE



70K

F

NF

+ SUBTILISINE



FIGURE 22

A) COMPARAISON DE L'ALPHA-TUBULINE ET DE LA PROTEINE 57 K
DES FILAMENTS DE 10 nm.

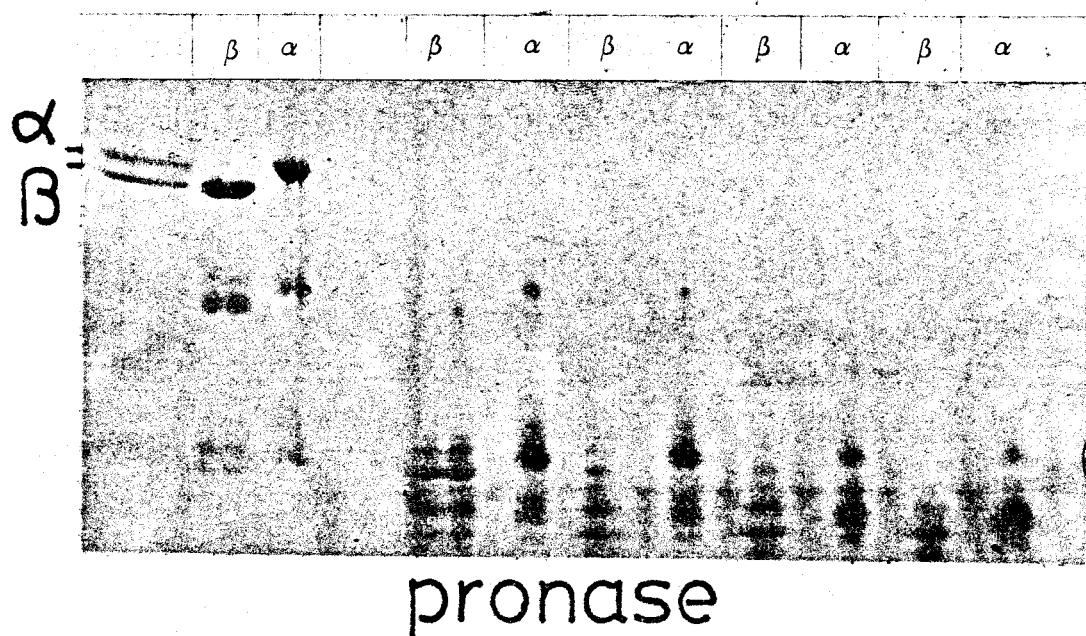
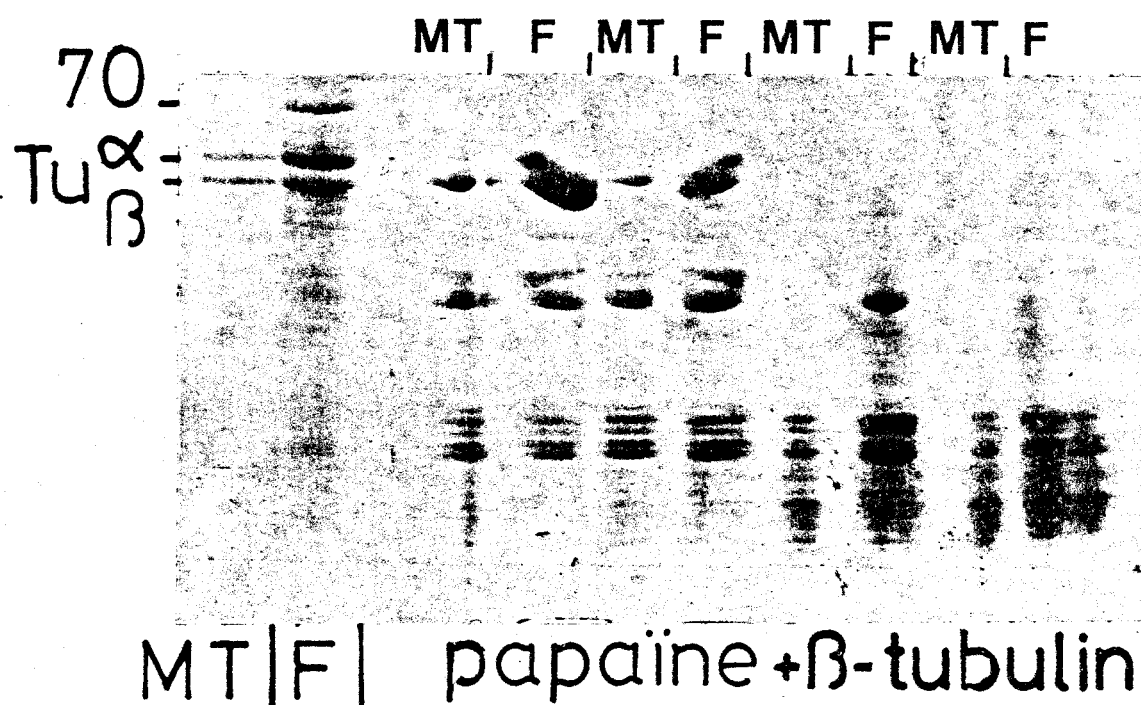
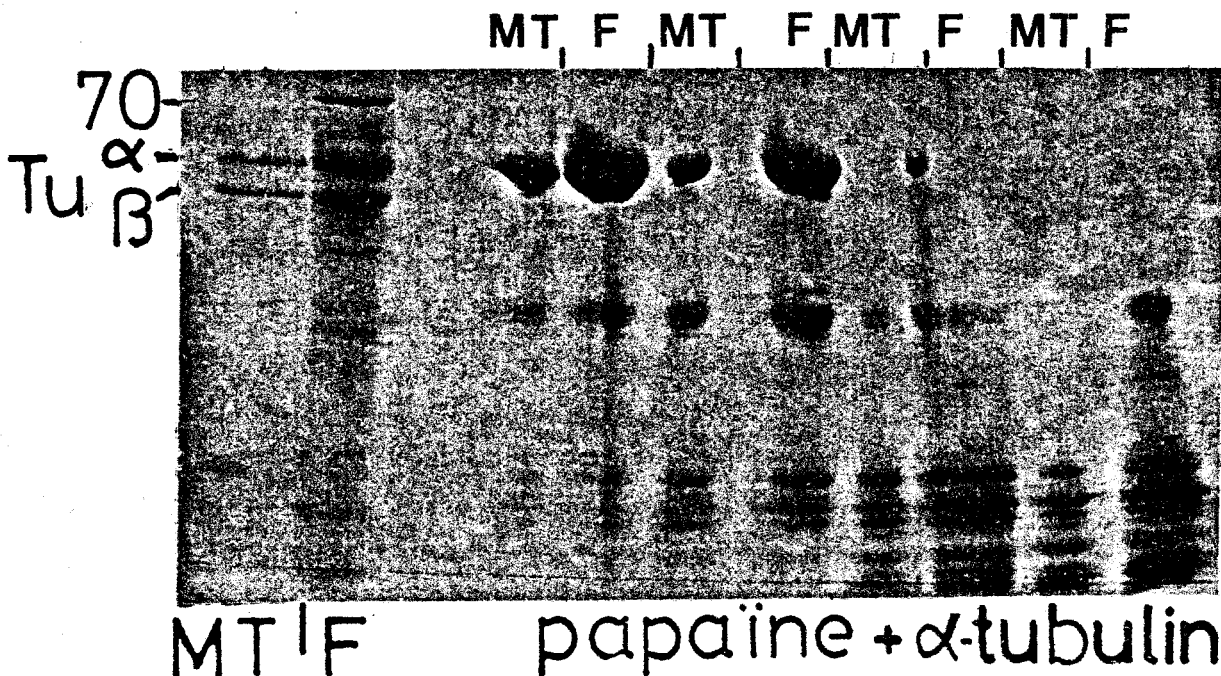
Les produits de protéolyse obtenus avec la papaïne(A),
la pronase et la subtilisine sont identiques.

B) COMPARAISON DE LA BETA-TUBULINE ET DE LA PROTEINE 53 K
DES FILAMENTS DE 10 nm.

Les produits de protéolyse obtenus avec la papaïne(B),
la pronase et la subtilisine sont identiques.

C) COMPARAISON DE L'ALPHA-TUBULINE ET DE LA BETA-TUBULINE.

Les produits de protéolyse obtenus avec la pronase(C),
la papaïne et la subtilisine sont différents.



BUS
LILLE

Ces deux résultats présentés par ANDERTON et al. et par BIGNAMI et DAHL ne sont pas contradictoires, car la protéine 50 K est hétérogène aussi bien en isoélectrofocalisation (THORPE et al., 1979,a) qu'en électrophorèse-SDS où nous avons pu observer que cette protéine peut se dédoubler. Une de ces protéines peut donc correspondre à la protéine gliale et l'autre au produit de protéolyse.

III) ORIGINE DE LA TUBULINE DANS LES PREPARATIONS
DE FILAMENTS DE 10 nm.

- A) Analyse et comparaison des préparations de
.....
filaments de 10 nm à partir de substrats différents.
.....

Les résultats obtenus sur la composition en protéines des neurofilaments isolés à partir du système nerveux périphérique (où la contamination par les cellules gliales est nettement moins importante, voir pages 46-50) confirment d'une manière définitive que seules les protéines 210 K, 160 K et 70 K sont les protéines constitutives des neurofilaments (ANDERTON et al., 1978 ; SCHLAEPFER et al., 1978 ; LIEM et al., 1978).

A partir de tous ces résultats, nous pouvons donc en déduire que la préparation de filaments de 10 nm isolés au cours des préparations de microtubules est constituée de trois protéines constitutives des neurofilaments que nous appelons NF 210 K, NF 160 K et NF 70 K.

Une question se pose alors: Pourquoi isole-t-on des protéines microtubulaires avec les protéines de neurofilaments?. Cette présence peut résulter d'une interaction in vivo et in vitro entre les microtubules (ou les protéines microtubulaires) et les neurofilaments, comme l'ont suggéré RUNGE et collaborateurs (1979, a et b) ; SHELANSKI et LIEM (1979) DELACOURTE et al., 1979 et WANG et al., 1980.

D'autre part, nous avons observé que la tubuline dénaturée et agrégée peut contaminer les préparations de filaments de 10 nm, mais nous n'avons pas réussi à le démontrer d'une manière nette.

Nous avons alors réétudié les préparations de filaments de 10 nm, en observant notamment des coupes ultra-fines des culots de centrifugation obtenus au cours de la préparation des filaments, après leur fixation, inclusion dans de l'araldite et coloration.

De plus, nous avons remarqué que les préparations de neurofilaments sont toujours effectuées à partir de la substance blanche qui est riche en axones, donc en NFs.

Par contre, les filaments de 10 nm ainsi que les microtubules, sont préparés à partir de cerveaux entiers ou d'hémisphères cérébraux: ce qui veut dire que le substrat de départ est alors riche en substance grise, et donc en corps cellulaires de neurones.

Dans les préparations à partir de la substance blanche, la protéine 50 K est toujours présente, même abondante. Avec les hémisphères cérébraux, la protéine 50 K est absente des préparations de filaments, mais c'est la tubuline qui est abondante.

A partir de toutes ces observations, nous avons entrepris une étude comparative des préparations de filaments de 10 nm obtenus à partir de deux substrats différents riches en substance blanche (tronc cérébral et moelle) et grise (hémisphères cérébraux).

Les conditions de préparation des filaments de 10 nm sont celles décrites dans le chapitre expérimental, page 60. Ces préparations sont effectuées simultanément, donc exactement dans les mêmes conditions.

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 23 .

Ils montrent :

- que les préparations de filaments de 10 nm faites à partir des hémisphères cérébraux sont en fait constituées d'une majorité de matériaux d'origine membranaire.

A cette préparation correspond, comme nous l'avons déjà montré, une composition en protéines avec la tubuline comme protéine majeure (60%) et le triplet de protéines de neurofilaments (moins de 15 % de la composition en protéines totale) (fig.23,A).

- qu'à partir de la substance blanche, les préparations présentent un aspect complètement différent.

A partir du tronc cérébral, les préparations sont moins contaminées par les membranes et vésicules et on peut distinguer nettement les filaments (figure 23,B).

En électrophorèse-SDS, nous observons que les préparations contiennent moins de tubuline mais qu'elles possèdent par contre une proportion beaucoup plus grande de protéines de neurofilaments (30% à 40%).

La protéine 50 000 est également présente (15% environ).

A partir de la moelle, les préparations de filaments de 10 nm sont pratiquement dépourvues de membranes et les filaments de 10 nm représentent la totalité de la préparation.

La tubuline et la protéine 50 000 sont présentes en faible quantité (respectivement 11 et 9%), tandis que les protéines des neurofilaments représentent 65% de la composition en protéines totale (figure 23,C).

D'après ces résultats, il semble qu'au fur et à mesure que l'on travaille avec des substrats riches en axones

-on améliore les rendements en neurofilaments

-on observe une diminution très nette de la contamination membranaire, et, simultanément, la proportion de tubuline dans les préparations diminue.

Etant donné que CARON et BERLIN (1979)* ont montré que les protéines microtubulaires pouvaient s'attacher très fortement aux membranes naturelles et artificielles, il semble donc

* et de FEIT et SHAY (1980)

que l'amélioration de la préparation des neurofilaments consiste, en partie, à éliminer les contaminants membranaires sur lesquels seraient attachés la tubuline et les MAPs.

Ces résultats montrent que les préparations de filaments de 10 nm isolés au cours des cycles de préparation de microtubules sont constituées de deux éléments distincts: les neurofilaments et les membranes sur lesquelles sont attachées des protéines microtubulaires.

Afin de vérifier que la tubuline n'interagit pas avec neurofilaments, nous avons préparé des neurofilaments à partir de la moelle de boeuf et, au cours des étapes de préparation, nous avons ajouté de la tubuline provenant de microtubules très purifiés.

Si les neurofilaments interagissent avec la tubuline, il est vraisemblable que ceux-ci vont entraîner la tubuline avec eux au cours de la centrifugation.

L'analyse des culots de neurofilaments sédimentés et lavés dans le tampon Mes indique que cette fraction n'est pas enrichie en tubuline. Elle est identique à la préparation de la figure 23-C.

Il n'y a donc pas d'interactions évidentes entre les neurofilaments et les protéines microtubulaires (DELACOURTE et al., 1980 a,b; PLANCKE et DELACOURTE, 1980).



FIGURE 23

PREPARATION DE FILAMENTS DE 10 nm A PARTIR DES HEMISPHERES CEREBRAUX (A), DU TRONC CEREBRAL (B) ET DE LA MOELLE (C).

Observations en microscopie électronique de coupes ultra-fines de culots de préparation (voir page 66), à un grossissement de 60 000, et composition en protéines correspondantes, établies par électrophorèse-SDS.

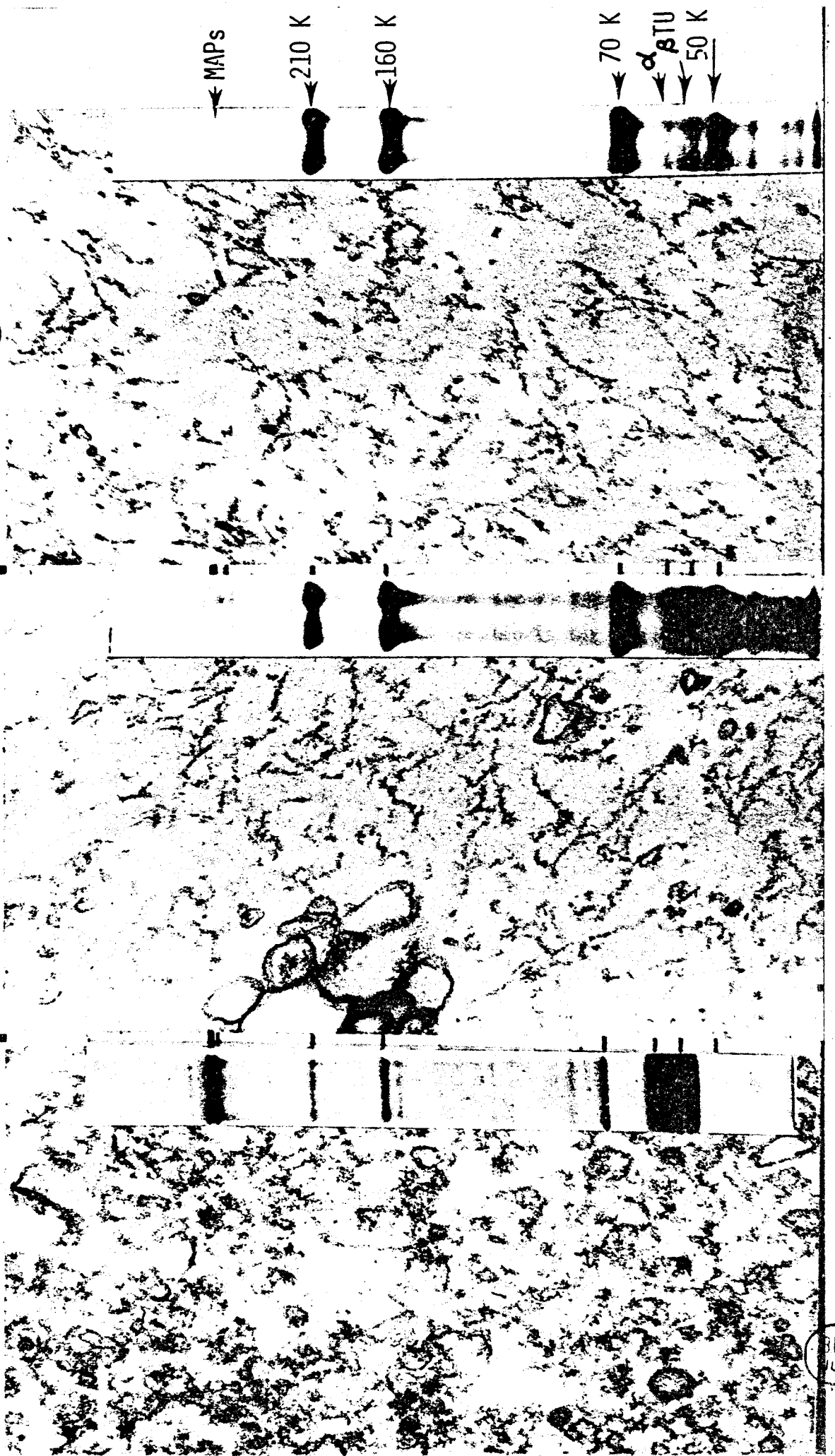
- A) La préparation à partir des hémisphères cérébraux est essentiellement composée de matériel membranaire. A cette préparation sont associées les protéines microtubulaires (tubuline et MAPs) et le triplet de protéines des neurofilaments (NF 210 K, NF 160 K et NF 70 K).
- B) Préparation à partir de la substance blanche (tronc cérébral).
La préparation contient moins de membranes et est enrichie en filaments de 10 nm. On observe parallèlement une diminution de la quantité de protéines microtubulaires et une augmentation des protéines NF 210 K, NF 160 K et NF 70 K.
- C) Préparation à partir de la moelle.
Le matériel membranaire a pratiquement disparu et la préparation ne contient que des filaments de 10 nm. La majorité des protéines sont représentées par le triplet de protéines NF 210 K, NF 160 K et NF 70 K. La tubuline et la protéine 50 K ne représentent que 10 et 8 % du mélange protéique (détermination à partir des électrophorégrammes).

A

B

I

C



B) Purification des filaments de 10 nm par gel-filtration

BERKOWITZ et collaborateurs (1977) ont montré que les filaments de 10 nm isolés au cours des différentes étapes de la préparation des microtubules, et purifiés par une étape supplémentaire de gel-filtration, sont constitués de la tubuline (protéine majeure) et des protéines de neurofilaments.

Ces résultats sont en faveur d'une interaction forte entre les filaments de 10 nm et la tubuline.

Mais il reste à démontrer que cette préparation n'est pas contaminée par du matériel membranaire.

Nous avons donc refait la même expérience, et isolé les filaments de 10 nm dans le pic d'exclusion d'une gel-filtration faite sur un Bio-Gel A 50 M (Bio Rad). Ces filaments ont été centrifugés et des coupes fines du culot ont été observées en microscopie électronique

Les résultats présentés figure 24 indiquent que la préparation purifiée contient encore de grandes quantités de membranes sur lesquelles sont probablement liées les protéines microtubulaires.

Il est vraisemblable que les contaminants membranaires que l'on trouve dans les préparations possèdent des coefficients de sédimentation et des poids moléculaires apparents très voisins des filaments de 10 nm, qui sont eux-mêmes un matériel très hétérogène.

Ceci expliquerait pourquoi les techniques de centrifugation et de gel-filtration ne permettent pas d'amélioration nette de la qualité de la préparation.

FIGURE 24

Purification des filaments de 10 nm par gel-filtration.

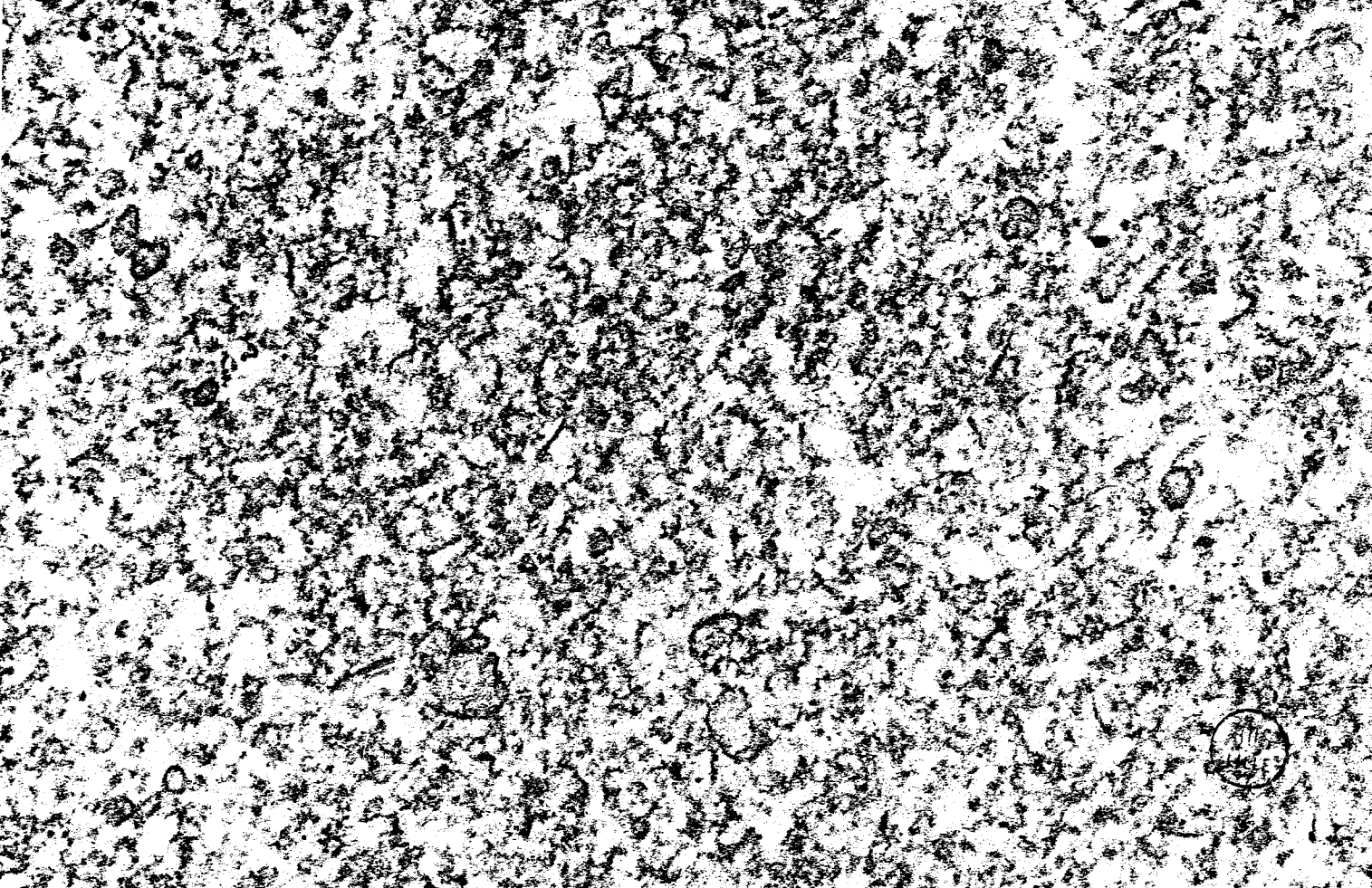
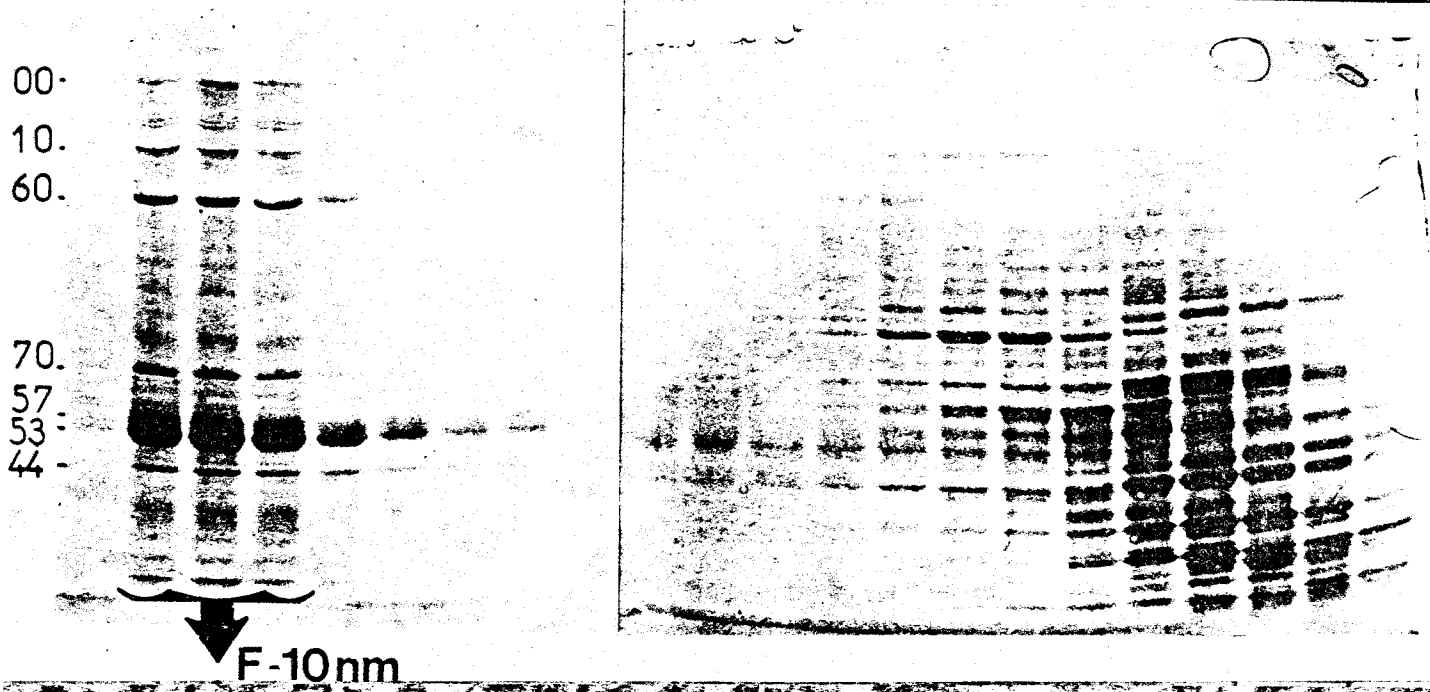
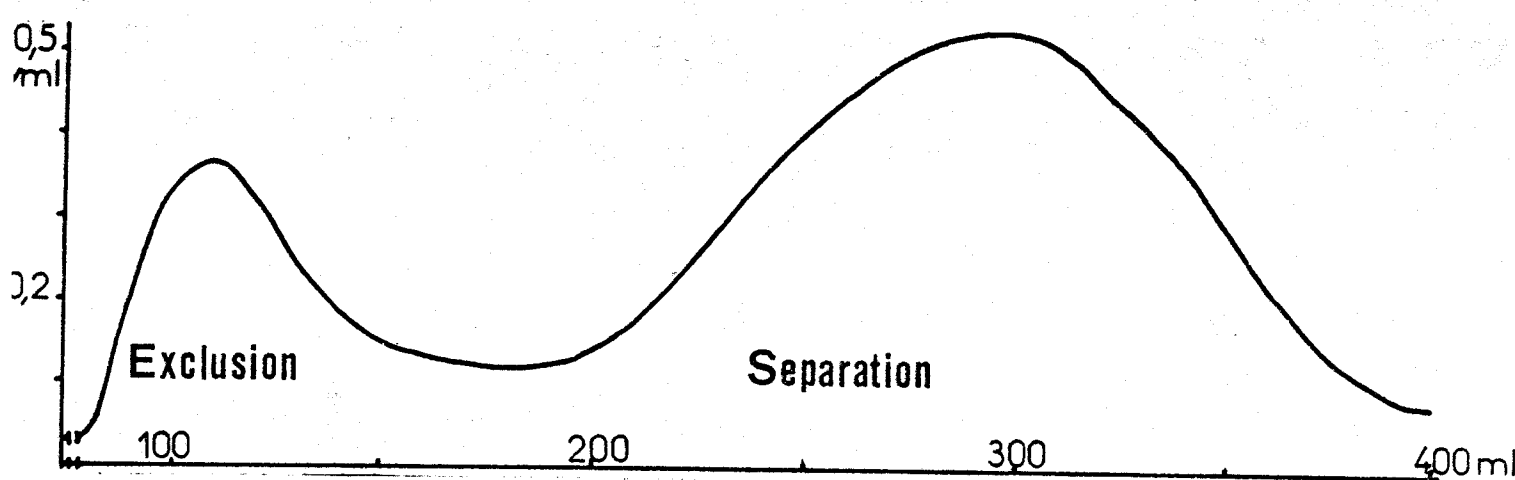
Les filaments de 10 nm sont isolés dans le pic d'exclusion d'une gel-filtration sur Bio-Gel A-50m.

Ensuite, les filaments sont centrifugés et le matériel sédimenté est observé en microscopie électronique (coupes ultra-fines du culot de centrifugation).

La fraction de filaments de 10 nm obtenue est largement contaminée par du matériel membranaire (grossissement 60 000).

Dans le pic d'exclusion contenant les filaments de 10 nm, sont isolées les protéines microtubulaires (MAPs 300 K, l'alpha-tubuline 57 K et la bêta-tubuline 53 K), le triplet de protéines des neurofilaments (NF 210 K, NF 160 K et NF 70 K), ainsi que l'actine (44 K).

Les protéines solubles de l'homogénat de cerveau se trouvent dans le pic de séparation.



IV) MISE AU POINT D'UNE METHODE DE PREPARATION DES NEUROFILAMENTS

Les préparations de filaments de 10 nm à partir de la moelle ne sont pas contaminées par du matériel membranaire (voir le chapitre précédent) et sont constituées essentiellement des protéines de neurofilaments.

Le dosage des protéines par enregistrement densitométrique des gels d'acrylamide-SDS et par intégration des pics est présenté sur la figure 25.

Les protéines de neurofilaments (NF 210K, NF 160 K et NF 70 K) représentent 65% de la composition totale, la tubuline environ 11% et la protéine 50 K environ 8 à 9 %.

La préparation observée en microscopie électronique, après une coloration par contraste négatif, est présentée sur la figure 25.

Nous observons la présence de nombreux filaments d'un diamètre régulier de 10 nm, longs, flexibles, lisses, sans point de branchement, et qui sont identiques aux neurofilaments décrits par de nombreux auteurs qui ont travaillé sur les NFs du système nerveux central et périphérique (SCHLAEPFER, 1977; SCHLAEPFER et FREEMAN, 1978).

Nous pensons donc que la préparation faite à partir de la moelle, et qui est basée sur le protocole expérimental décrit dans le chapitre précédent, est mieux qu'une préparation de filaments de 10 nm. Elle est en fait une préparation de neurofilaments puisque les filaments obtenus en ont la composition en protéines et l'aspect. Notre préparation est d'ailleurs une amélioration nette par rapport à ce qui est proposé dans la littérature.

A partir du système nerveux central, les préparations décrites contiennent au maximum 20% de protéines de neurofilaments et elles contiennent une protéine 50 K qui représente entre 25% et 50% de la composition totale (YEN et al, 1976; THORPE et al, 1979, a).

Les préparations de neurofilaments obtenus à partir du système nerveux périphérique semblent plus pures (MORI et KUROKAWA, 1979).

En utilisant les techniques décrites par ces auteurs, nous avons observé qu'il y a une contamination importante par du collagène. De plus, le substrat de départ étant constitué par des nerfs périphériques, on devine aisément que les rendements ne sont pas très bons (peu de substrat au départ, doublé d'un mauvais rendement car les nerfs sont difficiles à homogénéiser).

La préparation que nous proposons présente beaucoup d'avantages :

-elle est rapide (moins de 8 heures).

-elle donne d'excellents rendements (300 mg pour 300 g de moelle) - Travail effectué en une journée avec une centrifugeuse Beckman Spinco L 50.

-Il n'y a pas de protéolyse au cours de la préparation. Nous l'expliquons par le fait que la préparation est effectuée rapidement, que la moelle peut être obtenue très fraîche, et certainement au fait que ce matériel contient beaucoup moins d'enzymes protéolytiques que les hémisphères cérébraux.

Cette absence de protéolyse se concrétise par des bandes d'électrophorèse qui ne sont pas dédoublées et, dans l'hypothèse où la protéine 50 000 serait un produit de protéolyse de la protéines 70 000 (THORPE et al, 1979, a), par la faible proportion de cette protéine dans la préparation.

- la moelle peut être conservée à -20°C, sans altérer la qualité de la préparation

-l'aspect cristallin des culots de neurofilaments obtenus, ainsi que les contrôles en microscopie électronique indiquent l'absence de contamination membranaire.

FIGURE 25

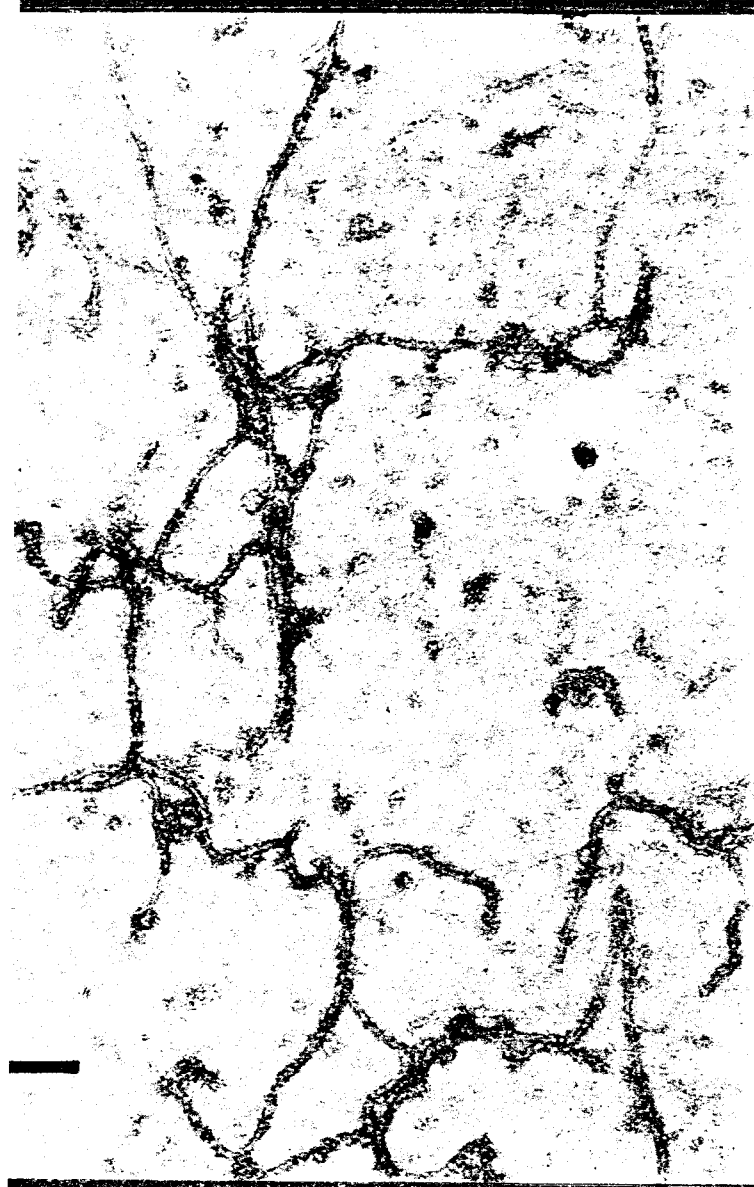
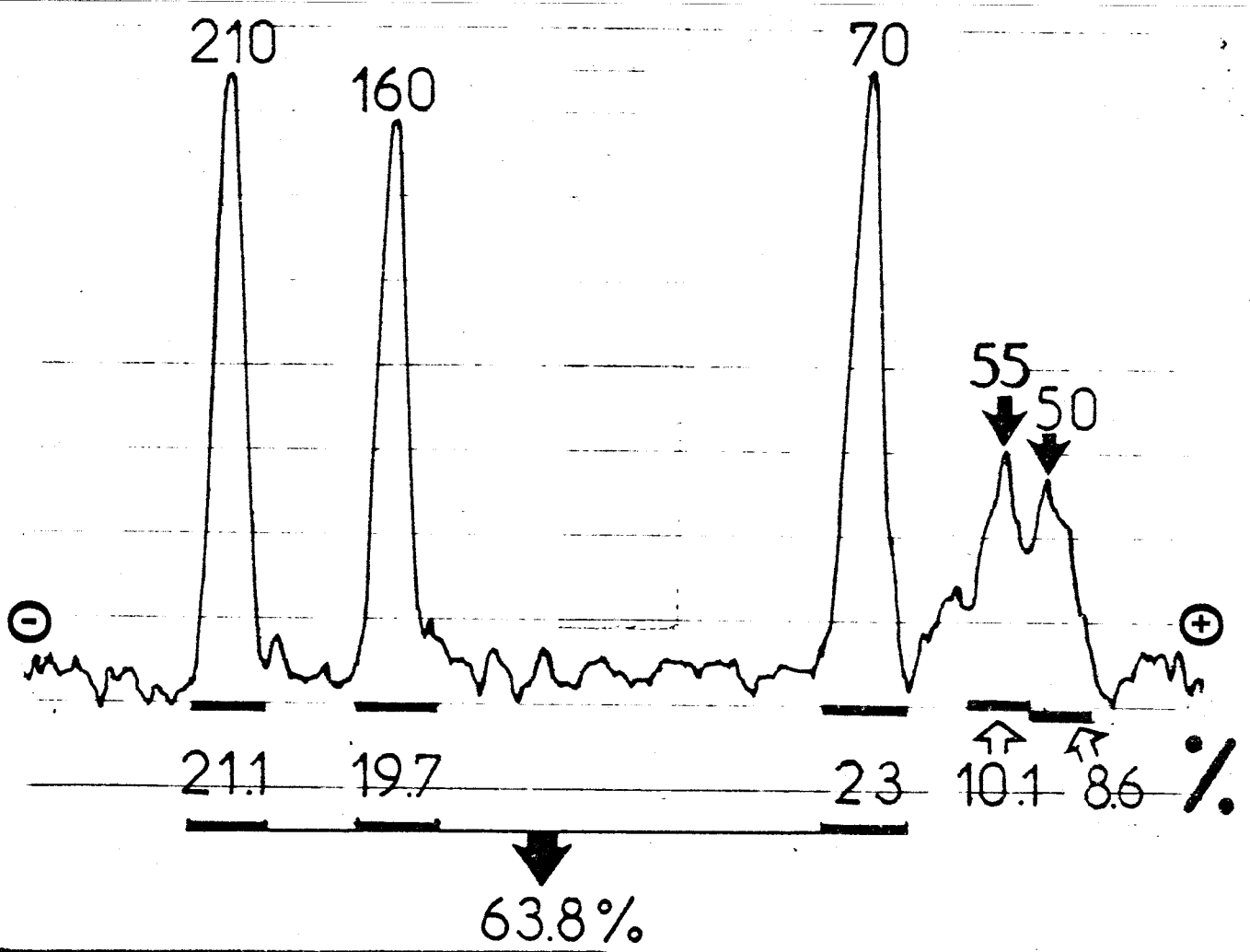
PREPARATION DE NEUROFILAMENTS A PARTIR
DE LA MOELLE DE BOEUF

Partie supérieure: Electrophoregramme de la préparation de neurofilaments .(Electrophorèse-SDS).

Les protéines de neurofilaments(NF 210 K + NF 160 K + NF 70 K) représentent 64 % des protéines totales.

La tubuline (55K) et la protéine 50 K représentent respectivement 10,1 % et 8,6%.

Partie inférieure: Neurofilaments observés après un coloration négative à l'acétate d'uranyle à deux grossissements différents. Chaque barre représente 100 nanomètres.



V) SEPARATION DES PROTEINES DU TRIplet PAR GEL FILTRATION
ET RECONSTITUTION DES NEUROFILAMENTS

La quantité et la qualité des neurofilaments obtenus par notre méthode nous ont permis de séparer le triplet de protéines par gel-filtration et d'étudier ensuite la reconstitution des neurofilaments à partir des sous-unités protéiques.

Les neurofilaments sont des structures très stables qui ne sont dissociées que dans des tampons dénaturants.

Les neurofilaments ont donc été dissociés dans un tampon chlorhydrate de guanidine 5 M ,Tris 0,1 M ,pH 8,3 qui est utilisé également pour la gel-filtration. Toutes ces opérations sont également effectuées en milieu légèrement réducteur (2 mM de dithiothréitol).

Nous avons essayé également la stabilité de différents gels dans le tampon chlorhydrate de guanidine 5 M,Tris 0,1 M et retenu le gel Sepharose,Cross Link 4 B.

Les conditions expérimentales sont décrites page 75.

Les résultats obtenus,présentés figure 26 ,montrent que l'on peut séparer les protéines de neurofilaments en trois fractions distinctes:

- A) les protéines 210 000 et 160 000.
- B) les protéines 160 000 et 70 000 .
- C) la protéine 70 000 avec la protéine 160 000 à l'état de traces.
- D) Une fraction qui rassemble les 3 protéines a également été reconstituée(Fraction A + Fraction B + Fraction C)
Cette fraction est appelée la Fraction D.

Ces quatre fractions ont été dialysées contre le tampon Mes, glycerol 4 M à 4°C,pendant 5 jours ,en changeant le tampon de dialyse tous les jours.

Les agrégats qui se sont formés pendant la dialyse sont ensuite éliminés par centrifugation et le surnageant est utilisé pour les expériences de reconstitution.

Chaque fraction est chauffée à 37°C pendant 20 minutes et observée en microscopie électronique.

Les résultats présentés (figures 27, 28, 29) montrent qu'à partir des différentes fractions protéiques, plusieurs types de filaments peuvent être reconstitués.

La fraction A donne des filaments très longs, bien définis et d'un diamètre moyen de 6 nm (figure 27).

La fraction B (protéine 160 000 et 70 000) reforme des filaments de 10 nm qui sont comparables aux filaments normaux.

La fraction C (protéine 70 000 + traces de protéines 160 000) reforme des filaments courts, peu définis et d'une largeur de 15 à 20 nm.

La fraction D (NF 210 + NF 160 + NF 70) reforme des filaments comparables aux neurofilaments natifs.

Ces résultats préliminaires indiquent:

-que les protéines dénaturées dans le tampon guanidine-HCl peuvent être renaturées et reformer des filaments.

Celles-ci sont identiques aux neurofilaments natifs lorsque la fraction de départ est composée des protéines NF 210, 160 et 70.

-les fractions A, B et C forment 3 types de filaments différents ce qui semble indiquer que chaque protéine joue un rôle complémentaire dans la constitution du neurofilament.

-ils indiquent que la méthodologie que nous avons employée pour l'étude de reconstitution des neurofilaments donne de bons résultats. Des renseignements plus précis pourront être obtenus en utilisant des fractions NF 210, NF 160 ou NF 70 pures, ce qui semble réalisable si l'on utilise plusieurs étapes de gel-filtration pour isoler ces protéines.

L'étude de reconstitution des neurofilaments pourra également être affinée lorsque nous posséderons des anticorps spécifiques de chaque protéine.

FIGURE 26

SEPARATION DES PROTEINES DE NEUROFILAMENTS PAR GEL-FILTRATION

(Sephacrose Cross Link 4 B ou CL 4B)

Les protéines de la préparation de neurofilaments (voir page 114-115) sont séparées sur un gel Sepharose CL 4B, dans un tampon chlorhydrate de guanidine 5 M, Tris 0,1 M, pH 8,3.

Les fractions obtenues ont été analysées par électrophorèse-SDS.

La distribution des protéines dans l'éluat est représentée au dessus de la courbe d'élution: Trois fractions différentes ont été collectées. Il s'agit de la fraction A (NF 210 K + NF 160 K), de la fraction B (NF 160 K + NF 70 K) et de la fraction C (NF 70 K).

Les protéines possédant un poids moléculaire voisin de 50 K sont les contaminations de tubuline et de G.F.A. Ces protéines n'ont pas été récupérées .

Excl: Pic d'exclusion. Cette fraction est opalescente. Elle correspond probablement à du matériel non-dissocié dans le tampon chlorhydrate de guanidine.

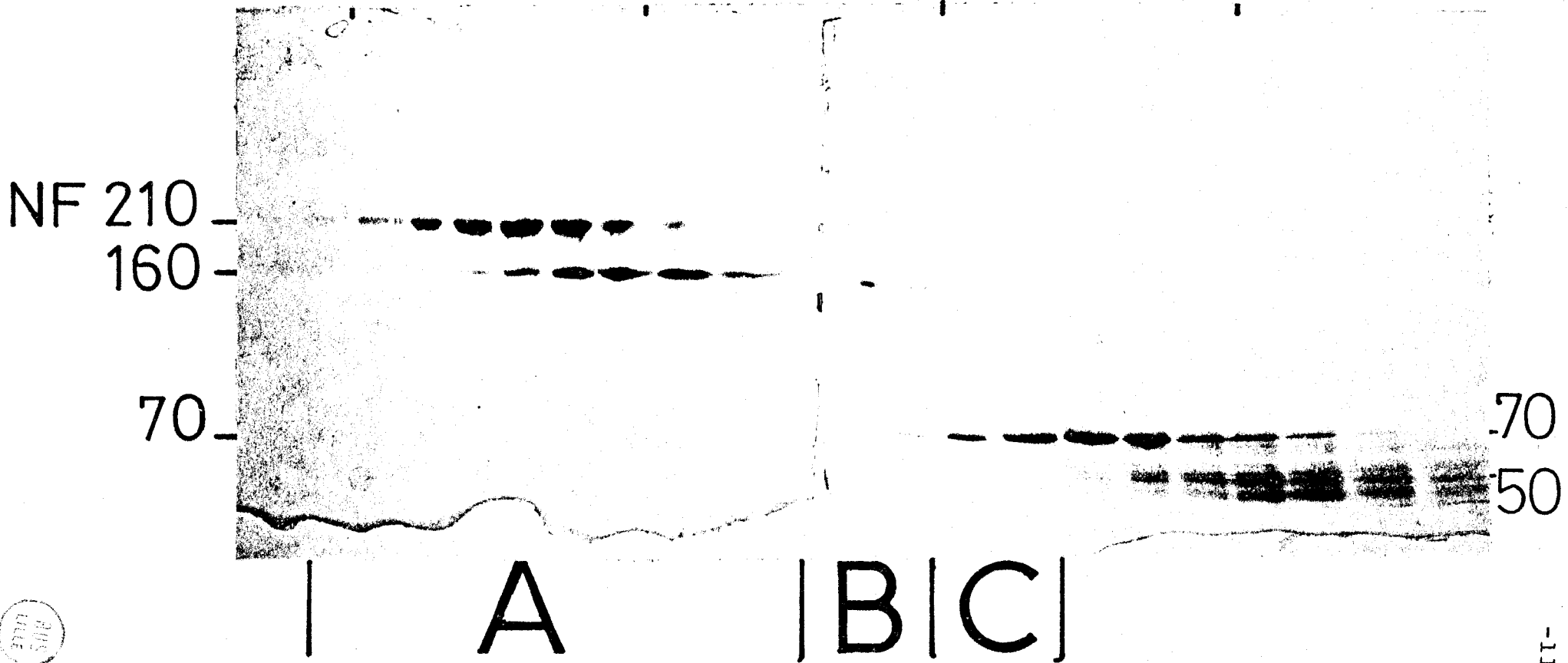
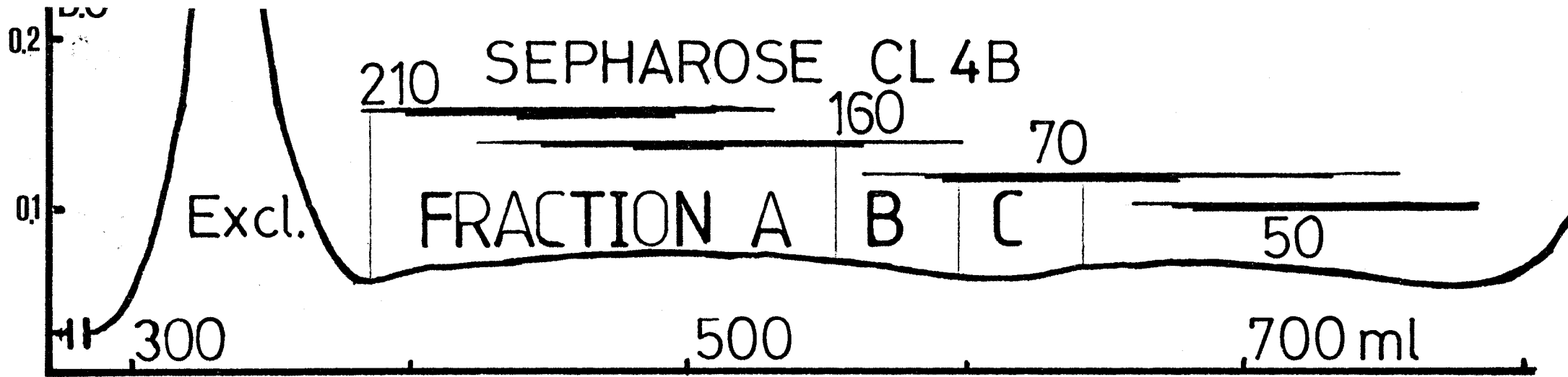


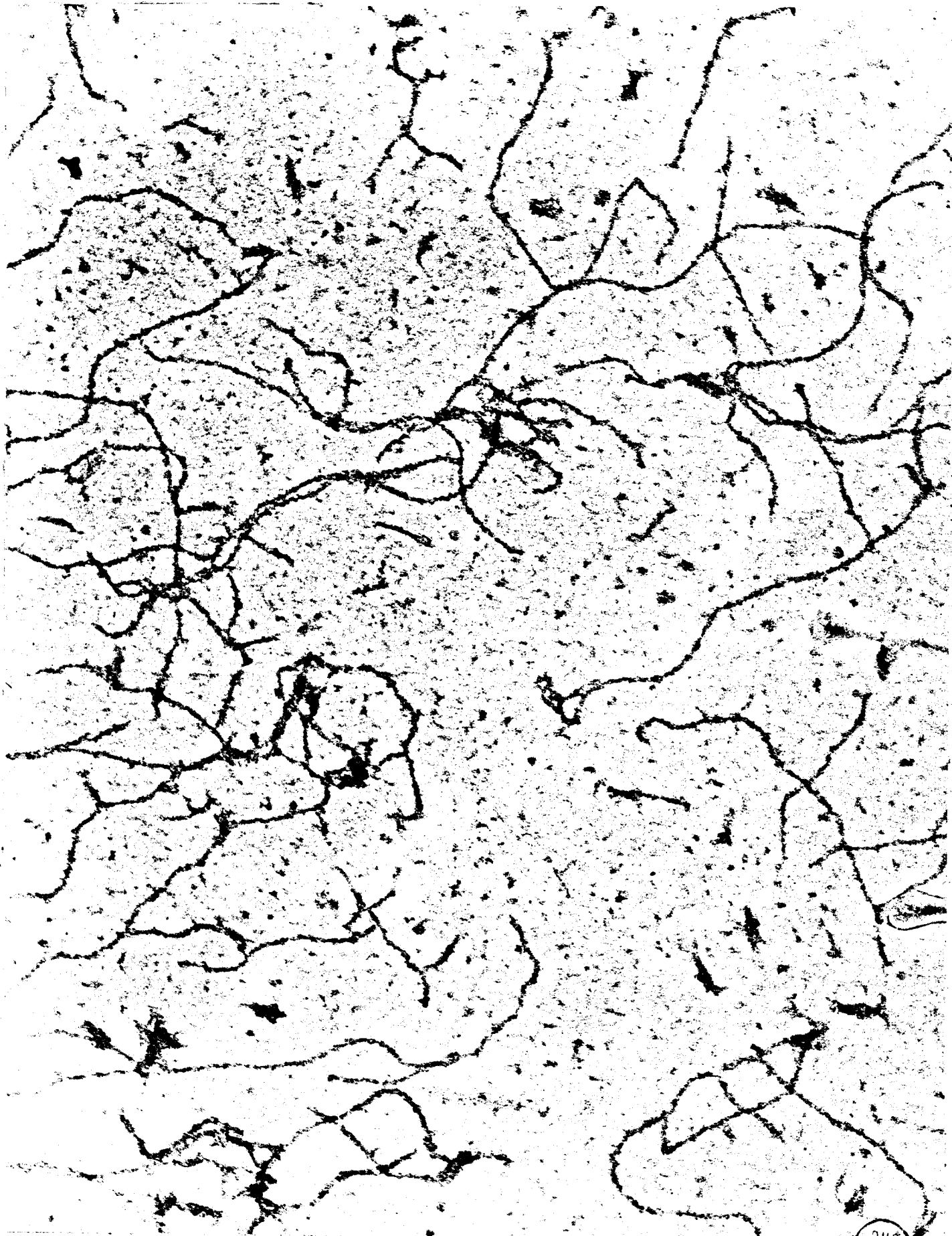
FIGURE 27.

RECONSTITUTION DES NEUROFILAMENTS

Filaments obtenus a partir de la fraction A (NF 210 + NF 160).

Ces filaments longs et flexibles ont un diamètre de 6 nm.

Grossissement: 100 000



BUS
LILLE

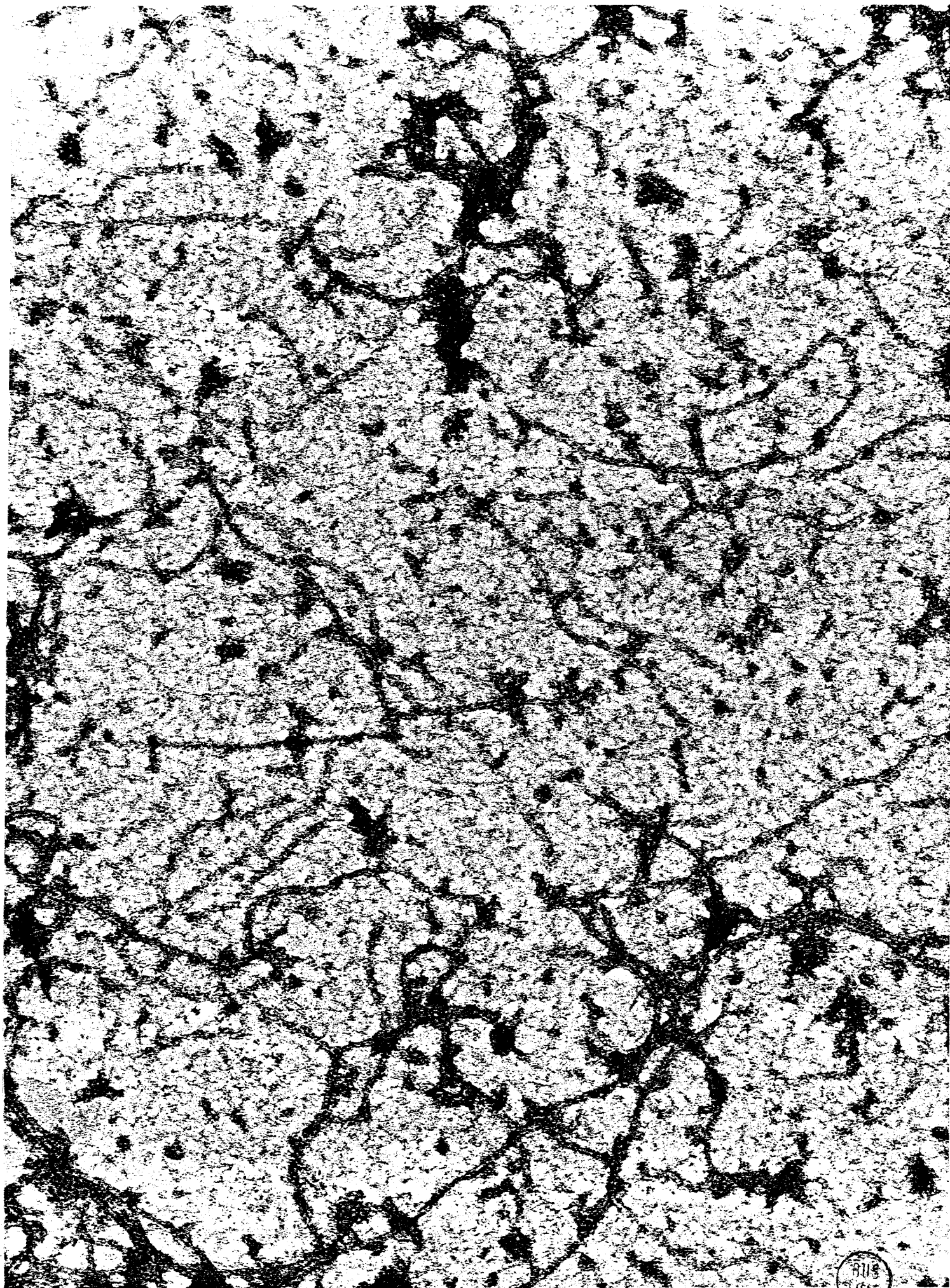
FIGURE 28

ETUDE DE LA RECONSTITUTION DES NEUROFILAMENTS

Filaments obtenus à partir de la fraction B (NF 160 k + NF 70 K)

Les filaments repolymérisés présentent un diamètre et une forme comparables à ceux des neurofilaments natifs (voir page 82)

Grossissement : 100 000.




ALL
LIFE


FIGURE 29


ETUDE DE LA RECONSTITUTION DES NEUROFILAMENTS

Filaments réassociés à partir de la fraction C (NF 70 K).

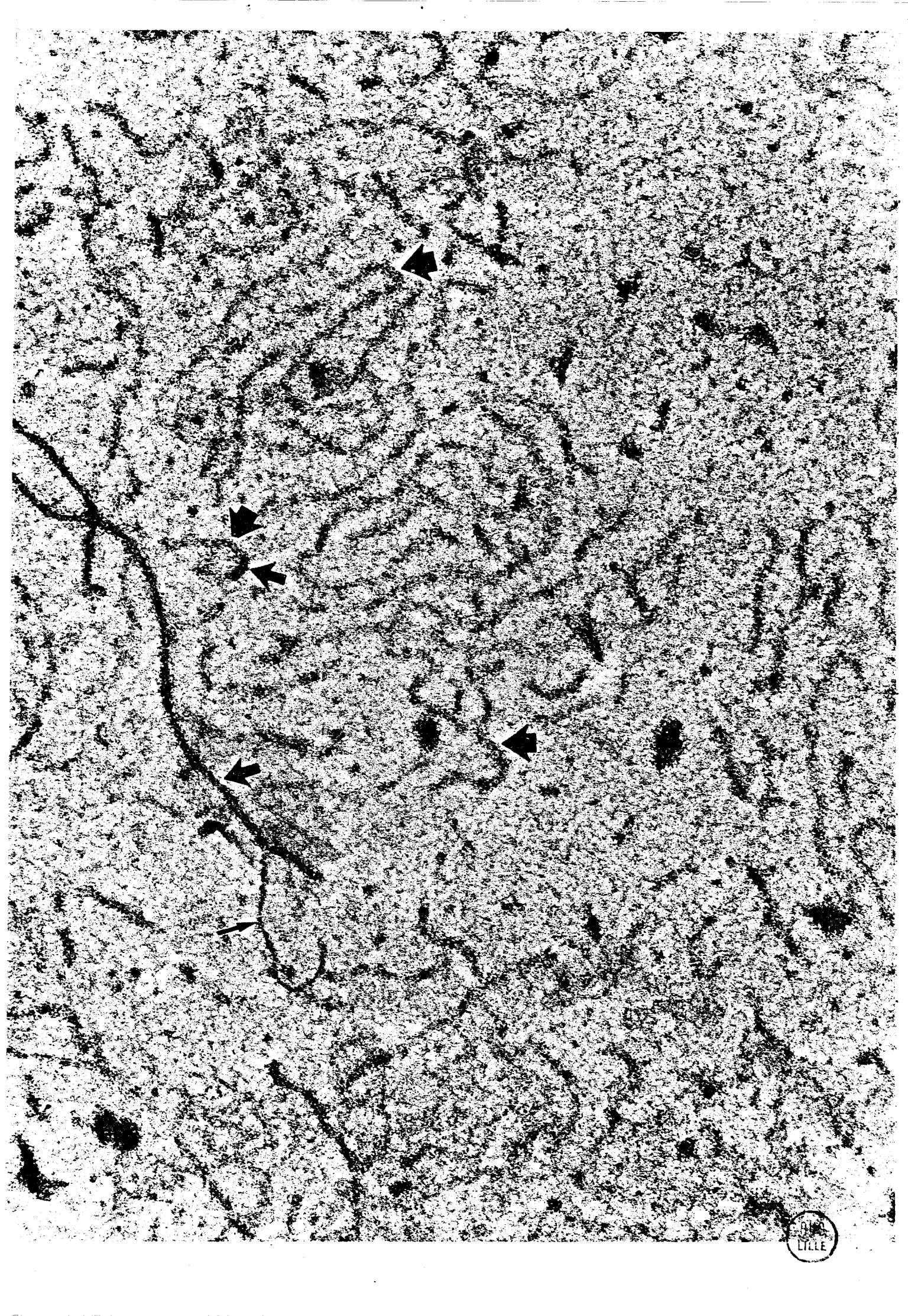
La majorité des filaments obtenus sont courts et peu définis. Ils possèdent un diamètre de 15 à 20 nm. Ces filaments sont marqués par des flèches .

Nous observons également des filaments de 10 nm qui proviennent probablement de l'association des protéines 70 K avec la protéine 160 K qui se trouve à l'état de trace.

Des anticorps spécifiques nous permettraient de voir si une ou deux protéines entrent dans la constitution de ces filaments (marqués par une flèche ).

D'autre part, nous observons également un filament plus fin (marqué d'une flèche ) qui possède un diamètre voisin des filaments présentés figure 27.

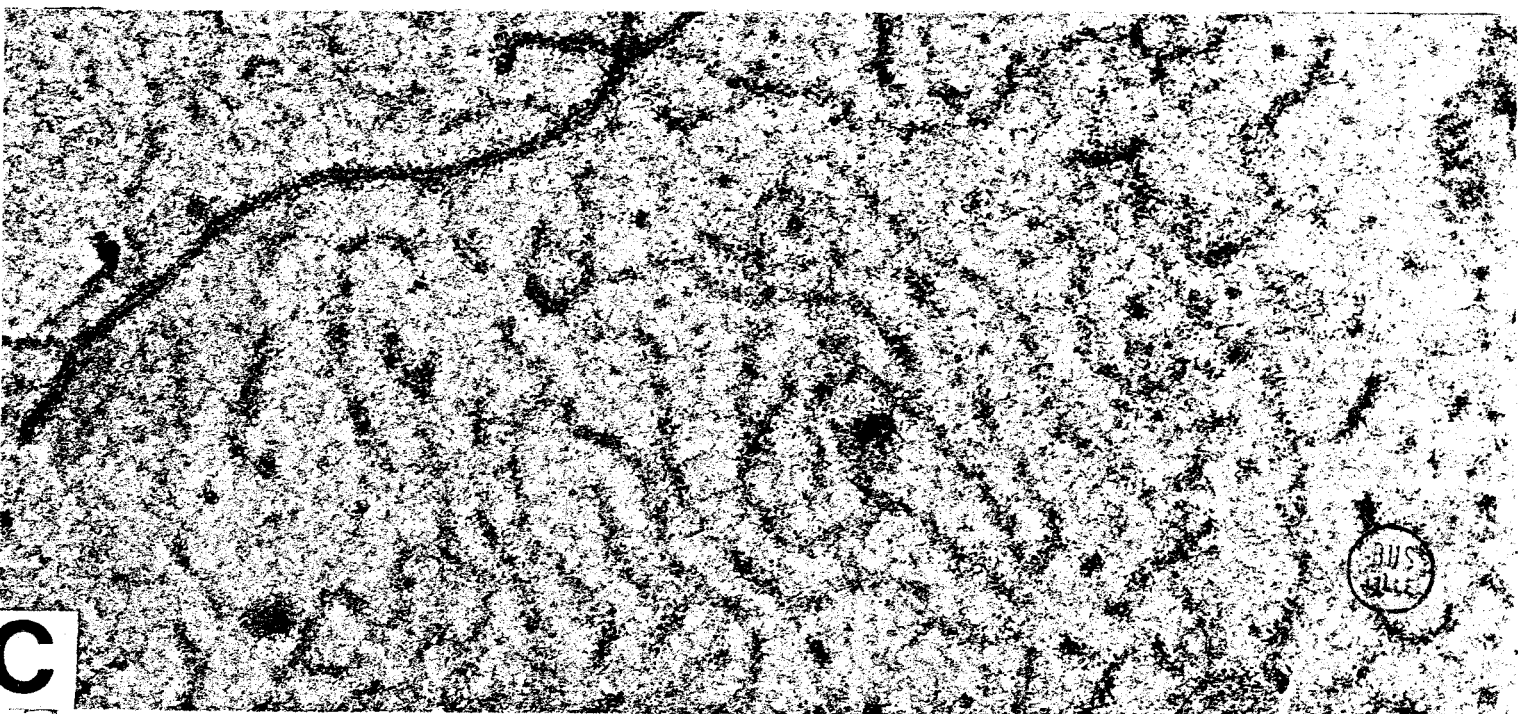
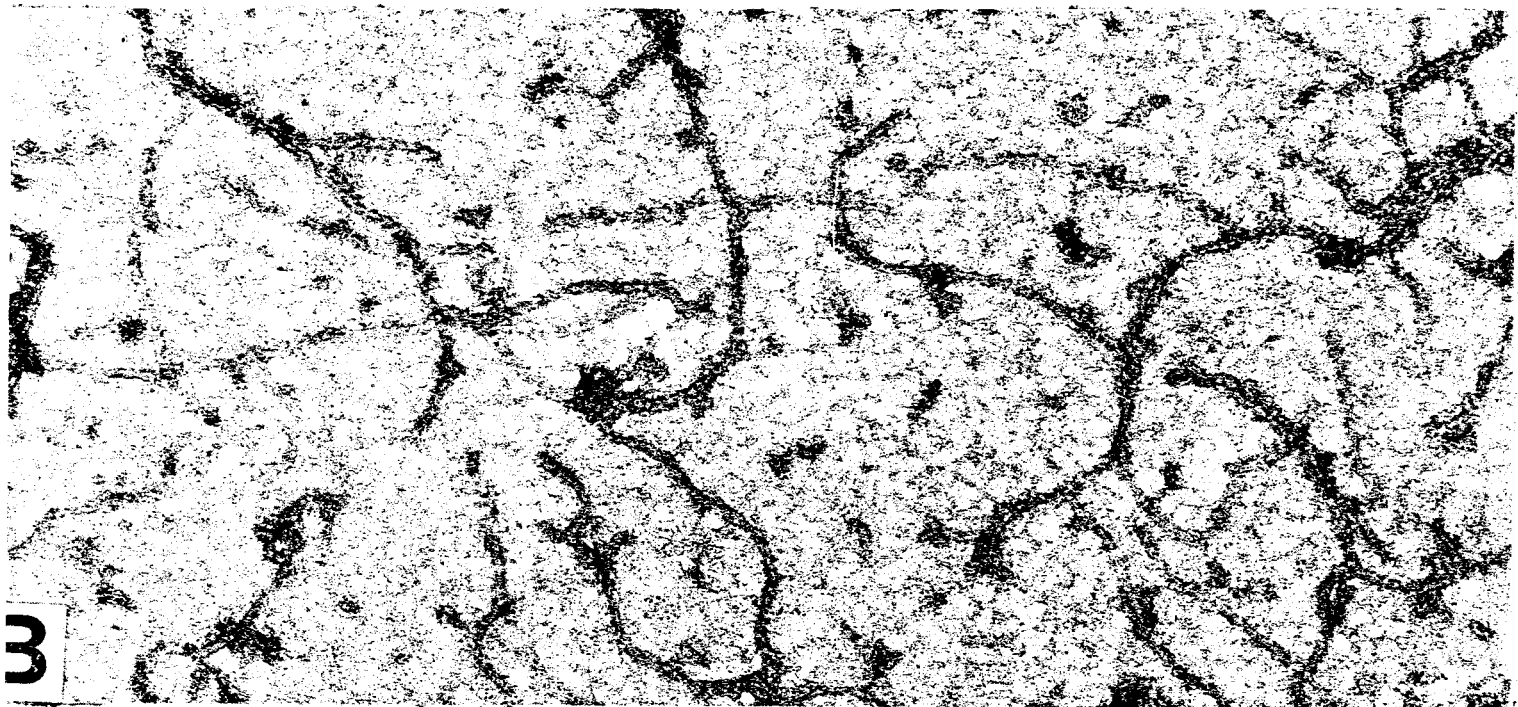
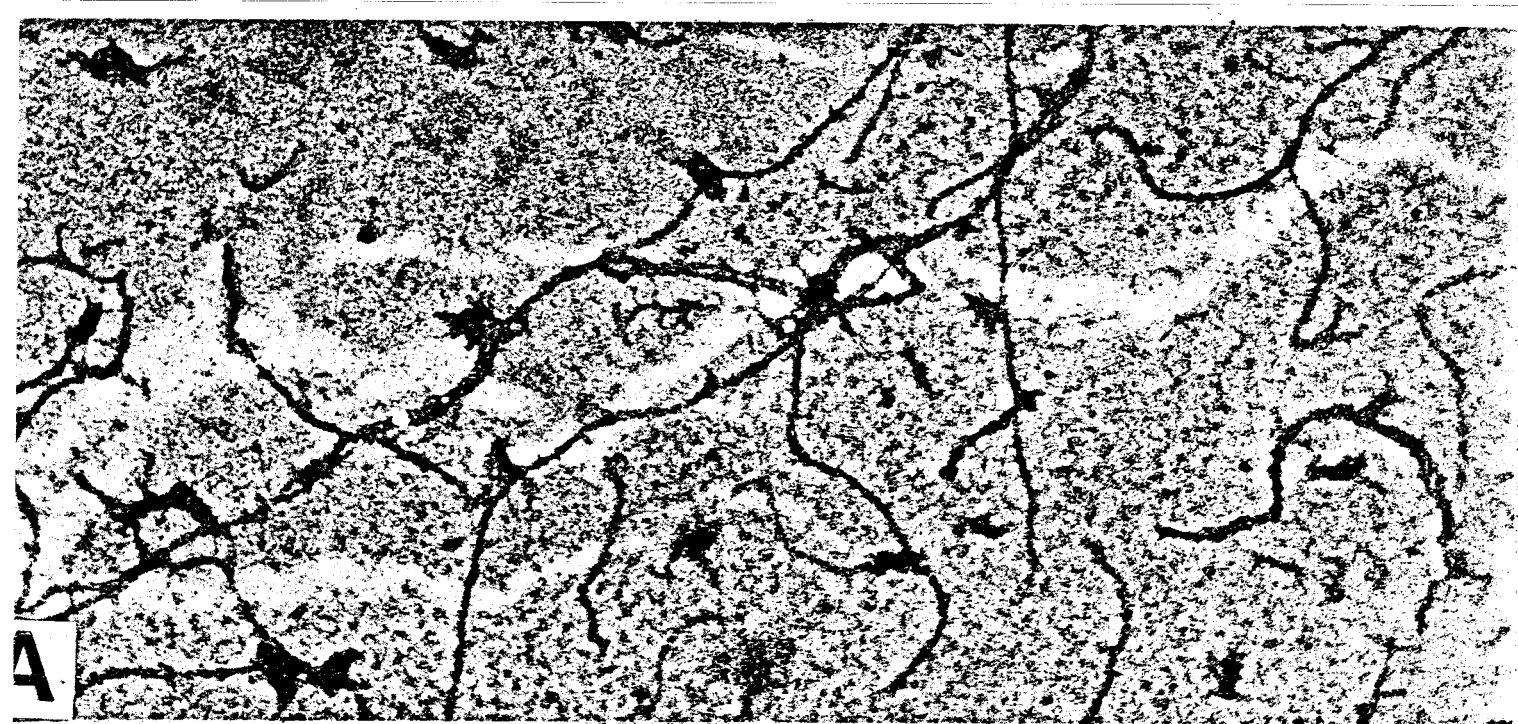
Grossissement: 100 000



COMPARAISON DES FILAMENTS OBTENUS A PARTIR DES FRACTIONS A,B,C.

(comparaison des figures 27,28 et 29).

Grossissement: 100 000.



VI) MISE AU POINT D'UNE METHODE D'EXTRACTION DES PROTEINES
DE NEUROFILAMENTS

Les neurofilaments ne sont dissociés et solubilisés que dans des tampons dénaturants ayant une concentration en urée 8M ou en chlorhydrate de guanidine 5M.

Cette propriété, très spécifique, a été mise à profit pour extraire rapidement les protéines de neurofilaments.

Pour cela, la substance blanche (la moelle par exemple) est homogénéisée dans un tampon de force ionique élevée (tampon phosphate 0,05 M, NaCl 1M, pH 8,0) et l'homogénat est centrifugé à 110 000 g pendant une heure à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot qui contient les neurofilaments est homogénéisé dans un tampon phosphate-urée 8 M ou chlorhydrate de guanidine 5 M. L'homogénat est centrifugé et les protéines de neurofilaments se trouvent dans le surnageant (THORPE et al., 1979-b). Les résultats de l'extraction sont présentés figure 30 et 31. Nous avons utilisé la méthode sur deux substrats différents: les hémisphères cérébraux et la moelle.

A partir des hémisphères cérébraux, l'extrait est constitué d'abord par de la tubuline, puis nous trouvons en quantité égale la protéine 50 K, l'actine, et les protéines NF 210, 160 et NF 70. Un "doublet" de protéine de 250 K est également présent.

L'extrait urée 8 M de la moelle est particulièrement riche en protéine 50 K. Il contient un peu d'actine et de tubuline. et une proportion notable de protéines de neurofilaments (10 à 20 % environ).

Nous avons mis cette méthode au point pour essayer de résoudre le problème de la composition en protéines des neurofilaments quand celle-ci n'était pas encore bien établie.

Elle montre que "l'extrait urée" de la substance blanche, obtenu dans des conditions où il y a très peu de protéolyse (extraction rapide faite sur un substrat très frais, en présence d'inhibiteur d'enzymes protéolytiques comme l'EDTA 10 mM et le pCMB^(*) à 5 mM) contient une grande quantité de protéines de 210 K, 160 K et 70 K; et que la protéine 50 K est très abondante dans l'extrait. Ceci montre que cette dernière protéine ne peut pas provenir entièrement d'une protéolyse

(*) : para-chloro mercuribenzoate

Elle doit correspondre à la GFA (Glial Fibrillary Acidic protein) qui est la protéine constitutive des filaments gliaux.

D'après RUEGER et al., 1979, la GFA est une protéine que l'on trouve en abondance sous forme soluble dans le système nerveux central.

Or, l'extrait contenant les protéines solubles de la substance blanche (figure 30, a), contient peu, ou pas, de protéine 50 K alors que l'extrait urée 8 M (figure 30, b) en contient des quantités extrêmement importantes.

D'après ces résultats, il semble que les filaments gliaux soient aussi stables que les neurofilaments et qu'il y ait très peu de GFA sous forme soluble (dans les conditions expérimentales où il n'y a pas de protéolyse).

L'extrait urée 8 M des hémisphères cérébraux (figure 31, A) contient une grande quantité de tubuline qui n'a pas été solubilisée au cours de la première extraction dans un tampon non-dénaturant.

Après dialyse de l'urée, la tubuline reste sous forme insoluble. Il est probable que cette tubuline reste liée à des particules membranaires.

La méthode que nous venons de décrire est surtout intéressante pour l'étude biochimique des protéines du cytosquelette lorsque les quantités de substrat sont faibles (quelques grammes).

Nous avons commencé à appliquer cette technique aux tissus nerveux pathologiques (tumeurs neuronales et gliales, maladie d'Alzheimer (démence précoce), etc.

Elle peut également être utilisée pour la préparation d'antigènes, après isolement des protéines par électrophorèse préparative.

Comme cela est montré dans le chapitre suivant, cette méthode nous a permis de déterminer rapidement la composition en protéines des neurofilaments d'Oiseaux.

EXTRACTION DES PROTEINES DU CYTOSQUELETTE DU TISSU NERVEUX.

STD: Témoin actomyosine: 200 K = chaîne lourde de la myosine; 44 K = actine

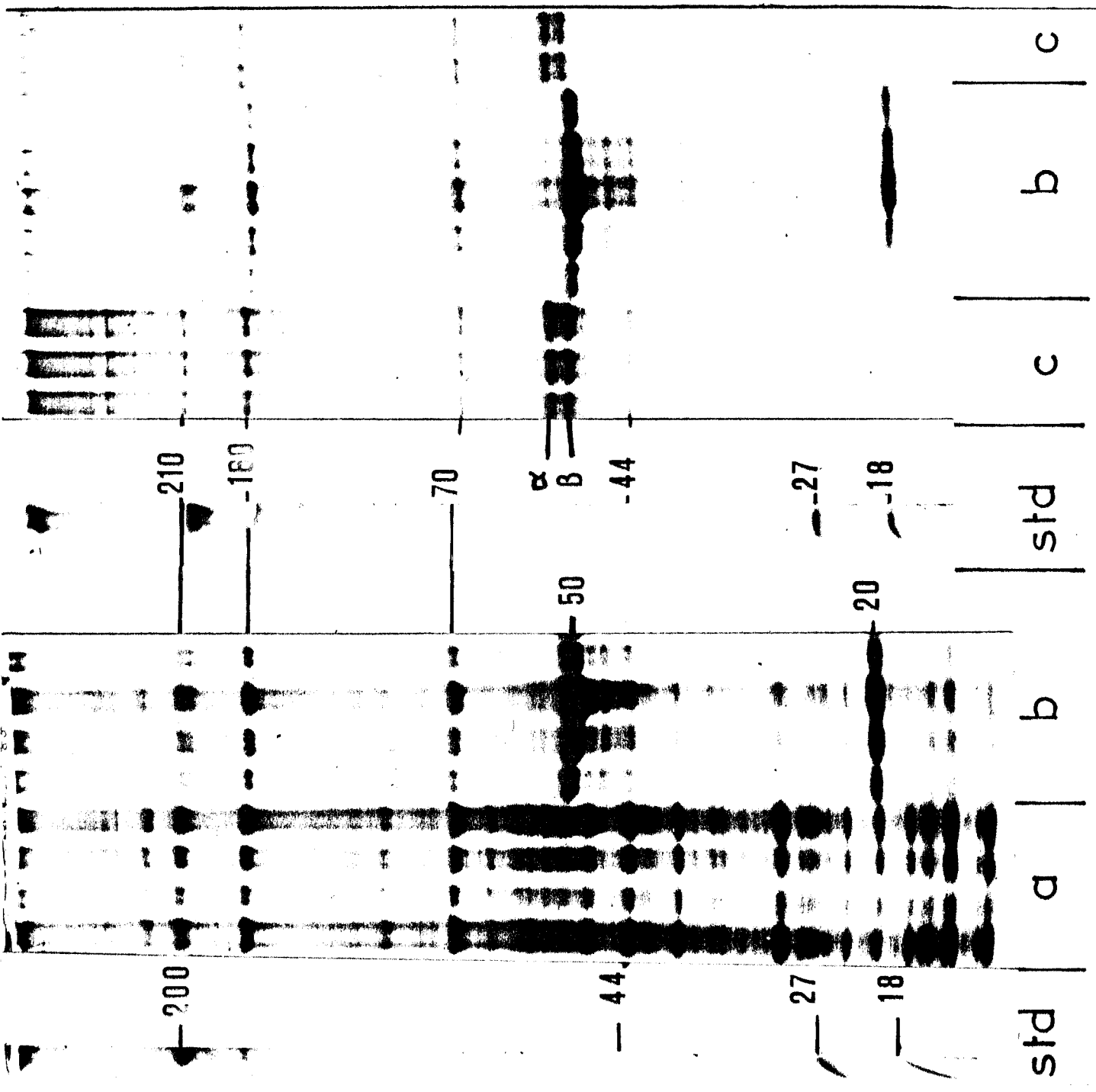
27 K et 18 K = chaînes légères de la myosine.

a : Extraction des protéines solubles par homogénéisation de la moelle de boeuf dans un tampon phosphate 0,05 M, pH 8. Surnageant 110,000 g.

b : Extrait urée 8M de la moelle de boeuf. On peut noter un enrichissement net en protéine 50 000 (GFA) et en protéines de neurofilaments (NF 210, NF 160 et NF 70). La protéine 20 K est probablement la protéine majeure de la myéline.

c : Microtubules de premier cycle préparés à partir du cerveau de boeuf.

Les différentes fractions étudiées sont analysées à différentes concentrations pour mieux observer les protéines mineures et majeures;



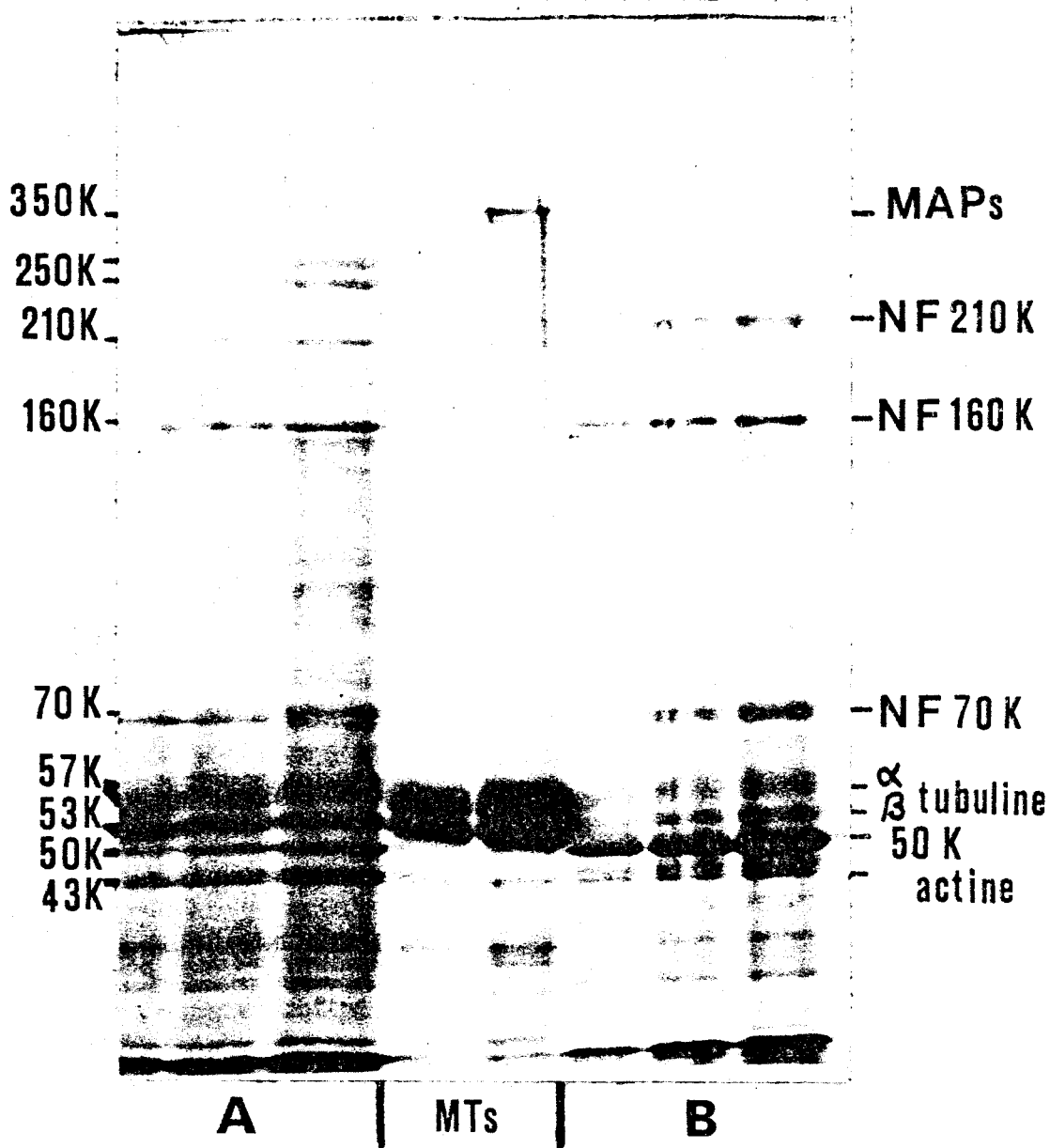


FIGURE 31

Extrait urée 8 M obtenu à partir des hémisphères cérébraux(A) et de la moelle(B) de boeuf.

La fraction A est riche en tubuline.Elle contient également la protéine 50 K,l'actine (43K) et les protéines de neurofilaments(210 K,160 K et 70 K).Un doublet de protéines d'environ 250 K est également présent.

La fraction B est surtout riche en GFA(50 K).Elle contient également les protéines de neurofilaments,la tubuline et l'actine.

MTs:Microtubules



VII) DETERMINATION DE LA COMPOSITION EN PROTEINES DES NEUROFILAMENTS D'OISEAUX.

Nous avons signalé que deux types de neurofilaments avaient été décrits. Il s'agit des neurofilaments de Mammifères constitués de trois protéines d'un poids moléculaire voisin de 210 K, 160 K et 68 K, et des neurofilaments d'Invertébrés qui possèdent des axones géants faciles à isoler: les neurofilaments de Calmar sont constitués de deux sous-unités protéiques de 200 K et 65 K; les neurofilaments de Myxicola sont constitués de deux sous-unités protéiques de 160 K et 152 K (voir pages 2-44).

Nous avons alors pensé qu'il serait intéressant d'étudier les neurofilaments d'Oiseaux qui sont, phylogéniquement assez éloignés des Mammifères, tout en possédant quand même quelques points communs (Vertébrés homéothermes).

D'autre part, le seul laboratoire français qui travaille sur le transport axonal lent (Equipe du Professeur DROZ, C.E.N de Saclay) travaille sur les nerfs de Poulet.

Il était donc important de déterminer la composition en protéines des neurofilaments de Poulet afin de pouvoir interpréter les autoradiographies des protéines véhiculées par le transport axonal lent (notamment les protéines de neurofilaments, voir page 54). Cette étude a été réalisée avec Ghislaine FILLIATREAU, du C.E.N de Saclay, qui travaille sur ce thème de recherches, sous la direction du Docteur LUIGI DI GIAMBERARDINO.

Nous avons utilisé trois techniques différentes pour déterminer la composition en protéines des neurofilaments de Dindon et de Poulet.

La première technique utilisée a consisté à isoler l'axoplasme de 15 grammes de nerf sciatique de Poulet et à essayer la technique d'isolement des neurofilaments de boeuf décrite page 60.

Les résultats ont été négatifs et les rendements nuls. Ceci provient probablement de la consistance différente des nerfs périphériques qui sont constitués d'une grande partie de fibres

de collagène. Ces fibres leur donnent une grande résistance mécanique et l'axoplasme est très difficile à extraire.

Nous avons alors utilisé la technique d'extraction des protéines de neurofilaments, en utilisant la moelle de Dindon comme substrat de départ (THORPE et al., 1979-b). L'extrait chlorhydrate de guanidine obtenu, présenté figure 32 contient une protéine majeure 50 K, de la tubuline (55K) et de l'actine (43 K).

Nous trouvons également un triplet de protéines de 205 K, 156 K et 69 K. Ce triplet présente beaucoup de similitudes avec le triplet de protéines des neurofilaments de Mammifères.

Nous avons également utilisé une technique décrite par SCHLAEPFER et FREEMAN (1978) qui consiste à isoler les neurofilaments natifs de l'axoplasme de nerf sciatique par centrifugation dans des gradients discontinus de sucrose (entre 1,5 et 0,5 M de sucrose).

Chaque fraction obtenue a été examinée en microscopie électronique et la fraction riche en neurofilaments a été étudiée par électrophorèse analytique en milieu SDS (Figures 33 et 34).

La composition en protéine de cette fraction, présentée figure 33 montre la présence de bandes de collagène (colorées en rouge par le Bleu de Coomassie G 250, à pH acide (MICKO et SCHLAEPFER, 1978). Nous trouvons également les protéines solubles de l'axoplasme, notamment une protéine très abondante de 68 K, une autre de 60 K, la tubuline et l'actine. Dans la région des protéines de haut poids moléculaire, nous retrouvons le "triplet" de protéines 205 K, 156 K et 69 K.

Nous pensons donc que les neurofilaments d'Oiseaux sont constitués d'un triplet de protéines d'un poids moléculaire assez voisin de celui des neurofilaments de Mammifères.

D'autres études biochimiques seront nécessaires pour préciser les similitudes et les différences entre ces deux structures.

Ces études nous ont montré que l'isolement des neurofilaments à partir du système nerveux périphérique est difficile à réaliser. Ceci provient d'abord des faibles quantités de substrat qui sont disponibles. Ceci résulte également de la quantité importante de fibres de collagène formant une gaine autour des axones, qui rendent l'extraction de l'axoplasme difficile, et qui, de plus, contaminent la préparation.

Le système nerveux périphérique possède cependant l'avantage d'être pauvre en matériel d'origine gliale, donc pauvre en filaments gliaux qui peuvent contaminer la préparation de neurofilaments. Il existe en effet des cellules de Schwann qui forment une gaine de myéline. Ces cellules sont de la même origine que les cellules gliales (neuroectoderme) mais elles se trouvent en quantité moindre.

A notre connaissance, rien n'a été fait sur l'étude du cytosquelette de ces cellules.

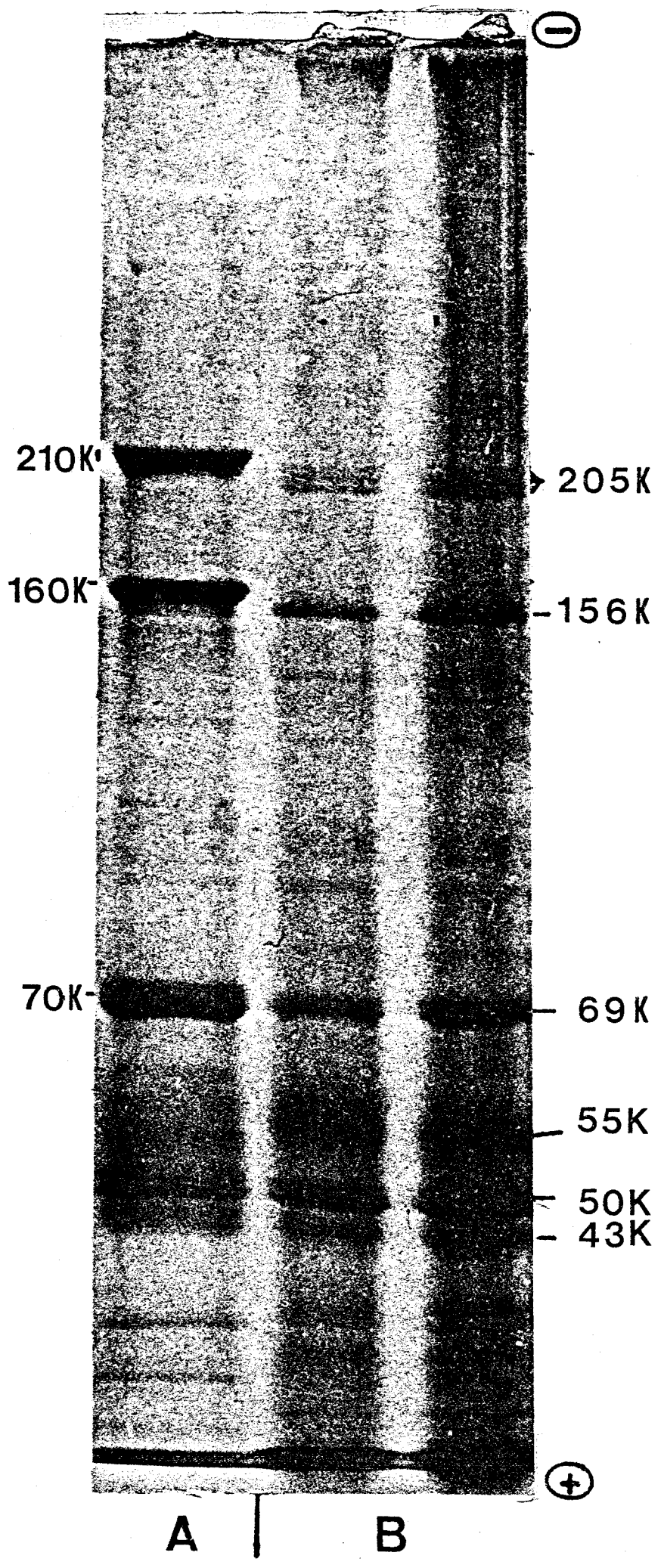
La méthode d'extraction des protéines du cytosquelette (notamment des protéines de neurofilaments) par des tampons dénaturants s'est donc révélée la plus déterminante pour une première approche sur l'étude du cytosquelette des cellules nerveuses d'Oiseaux. Elle nous permettra vraisemblablement d'étudier la constitution des neurofilaments
provenant du tissu nerveux d'autres espèces.

FIGURE 32

COMPARAISON DES NEUROFILAMENTS DE BOEUF AVEC L'EXTRAIT
UREE 8 M DE LA MOELLE DE DINDON.

Les neurofilaments de Boeuf(A) sont constitués de 3 protéines 210 K, 160 K et 70 K.

L'extrait de la moelle de Dindon contient la protéine 50 K, la tubuline(55K) et l'actine(43 K). Il contient également 3 protéines d'un poids moléculaire voisin du "triplet" des neurofilaments de boeuf. Il s'agit des protéines 205 K, 156 K et 69 K.



BUS
LIFE

FIGURE 33

DETERMINATION DES POIDS MOLECULAIRES DES PROTEINES
DE NEUROFILAMENTS D'OISEAUX.

A) Electrophorégramme des neurofilaments de Boeuf

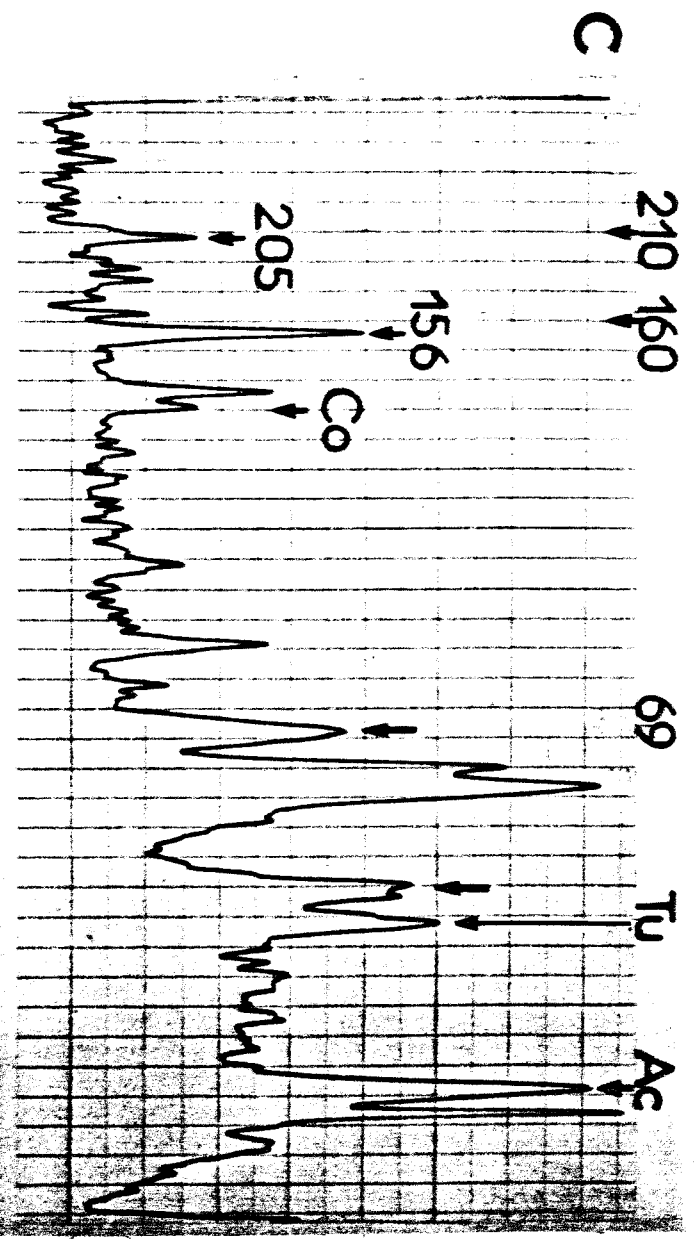
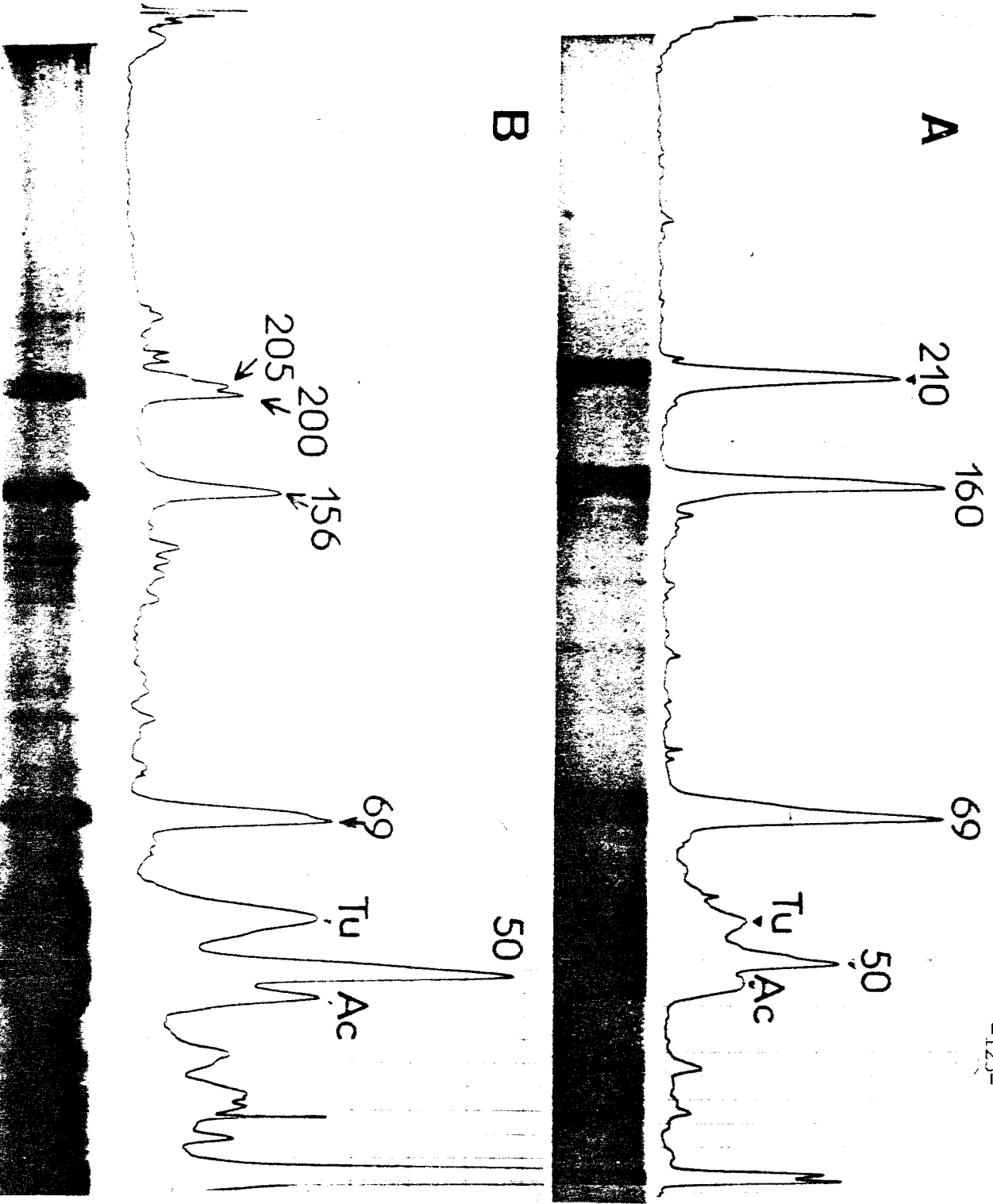
B) Electrophorégramme de l'extrait urée 8 M de la moelle de Dindon.

Nous pouvons distinguer la présence d'un "triplet" de protéines de 205 K (et un dédoublement à 200 K), 156 K et 69 K.

C) Protéines correspondant à une fraction enrichie en neurofilaments. La préparation est faite à partir du nerf sciatique de Poulet.

Les protéines 205 K, 156 K et 69 K sont présentes.

Les autres protéines correspondent au collagène (CO), à la tubuline (Tu) et à l'actine.



245
1975

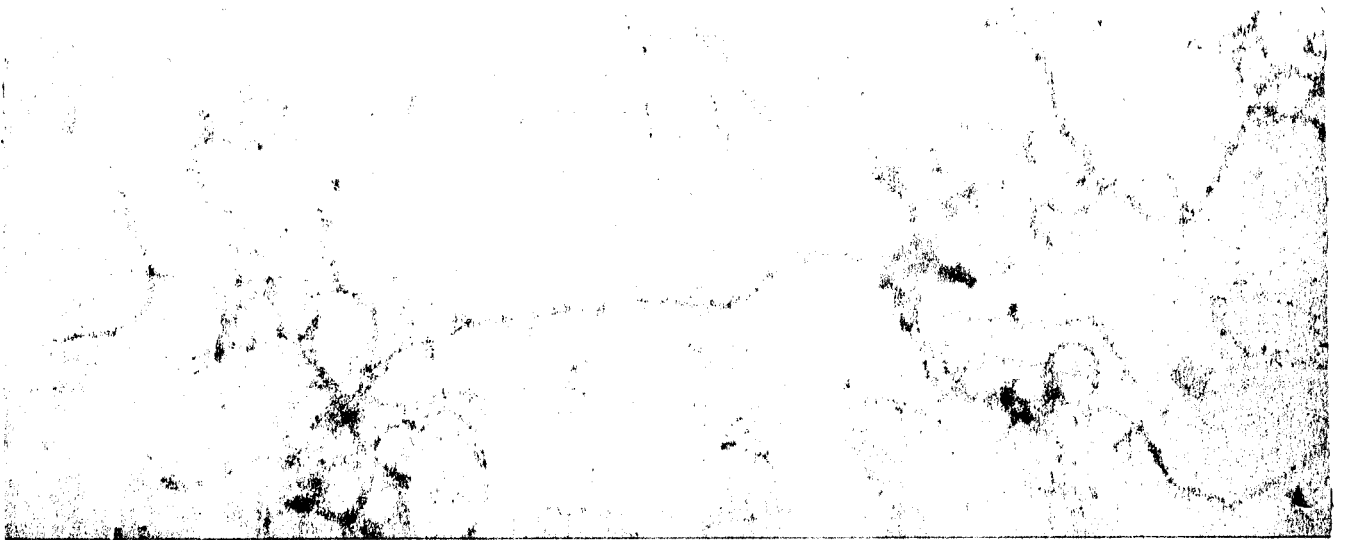
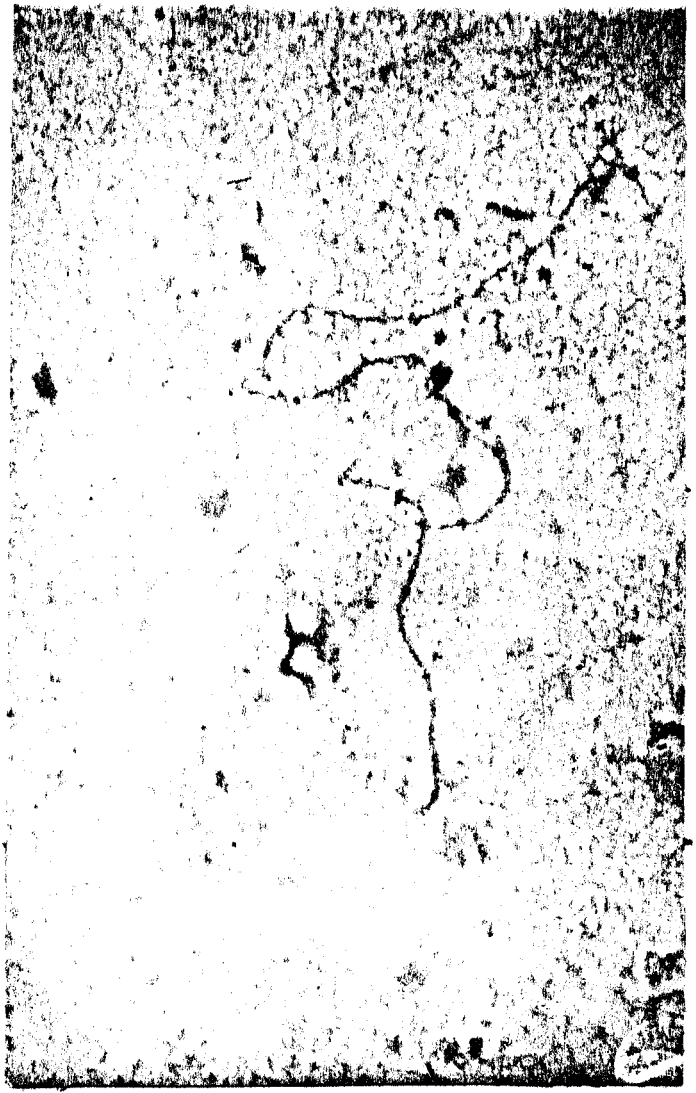
FIGURE 34

NEUROFILAMENTS ISOLÉS A PARTIR DU NERF SCIATIQUE DE POULET

Présentation de trois vues différentes d'une préparation de neurofilaments isolés dans un gradient discontinu de sucrose.

Ces neurofilaments paraissent un peu moins réguliers que les neurofilaments de Boeuf.

Grossissement: 50 000.



BHS
LILLE

VIII) ISOLEMENT ET ETUDES DES MICROFIBRILLES FORMEES A PARTIR DES PROTEINES MICROTUBULAIRES DE PREMIER CYCLE.

Les filaments de 10 nm contaminent nettement les microtubules obtenus au cours des deux premiers cycles de préparation.

Pour améliorer les préparations de microtubules, nous avons pensé qu'il était possible de centrifuger plus efficacement les contaminants au cours des étapes de dépolymérisation. Mais si l'on augmente la force de centrifugation, on risque d'éliminer en même temps les associations de tubuline à 4°C qui seront également dans le culot de centrifugation, notamment les anneaux 36 S et les petits protofilaments.

Nous avons alors dépolymérisé les microtubules par un tampon Mes-NaCl 1 M, afin de dépolymériser également les anneaux 36 S. Ceci devait nous permettre de centrifuger les filaments de 10 nm sans perdre de matériel d'origine microtubulaire.

Effectivement, après une centrifugation à 140 000 g max pendant 1 heure à 4°C, on peut éliminer une plus grande quantité de filaments (Figure 35-A).

Ensuite nous avons dialysé le surnageant contenant les protéines microtubulaires contre du tampon Mes afin d'éliminer le NaCl, pour réinduire un cycle de polymérisation (Figure 35-B).

Au cours de cette dialyse, nous avons remarqué une gélification très nette de la solution protéique.

L'observation en microscopie électronique nous a indiqué qu'il s'était formé un réseau microfibrillaire.

Les images les plus significatives de ce réseau sont présentées figure 36.

Cet arrangement microfibrillaire semble assez hétérogène mais il possède néanmoins un aspect caractéristique que nous avons toujours retrouvé chaque fois que nous avons reproduit l'expérience.

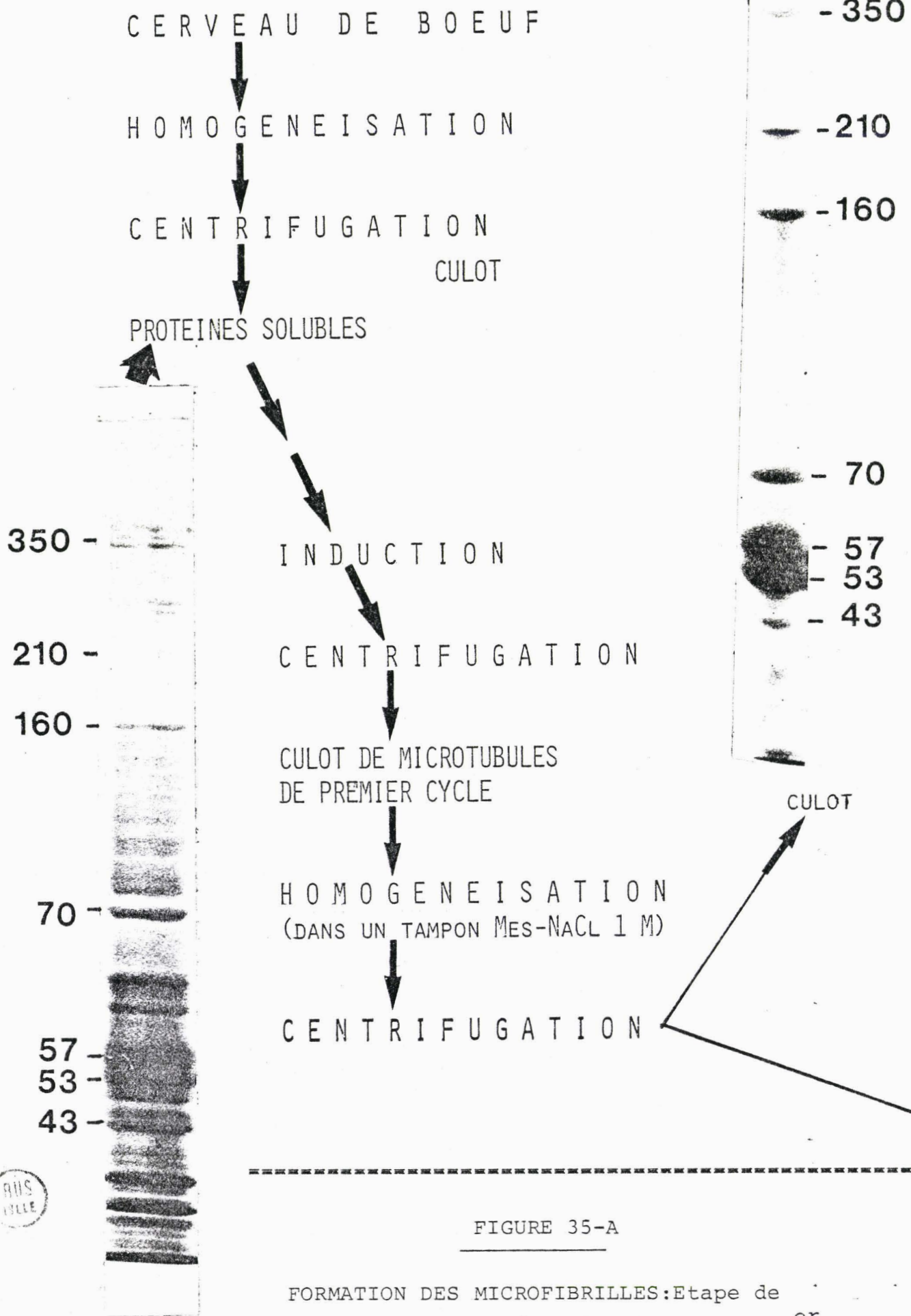
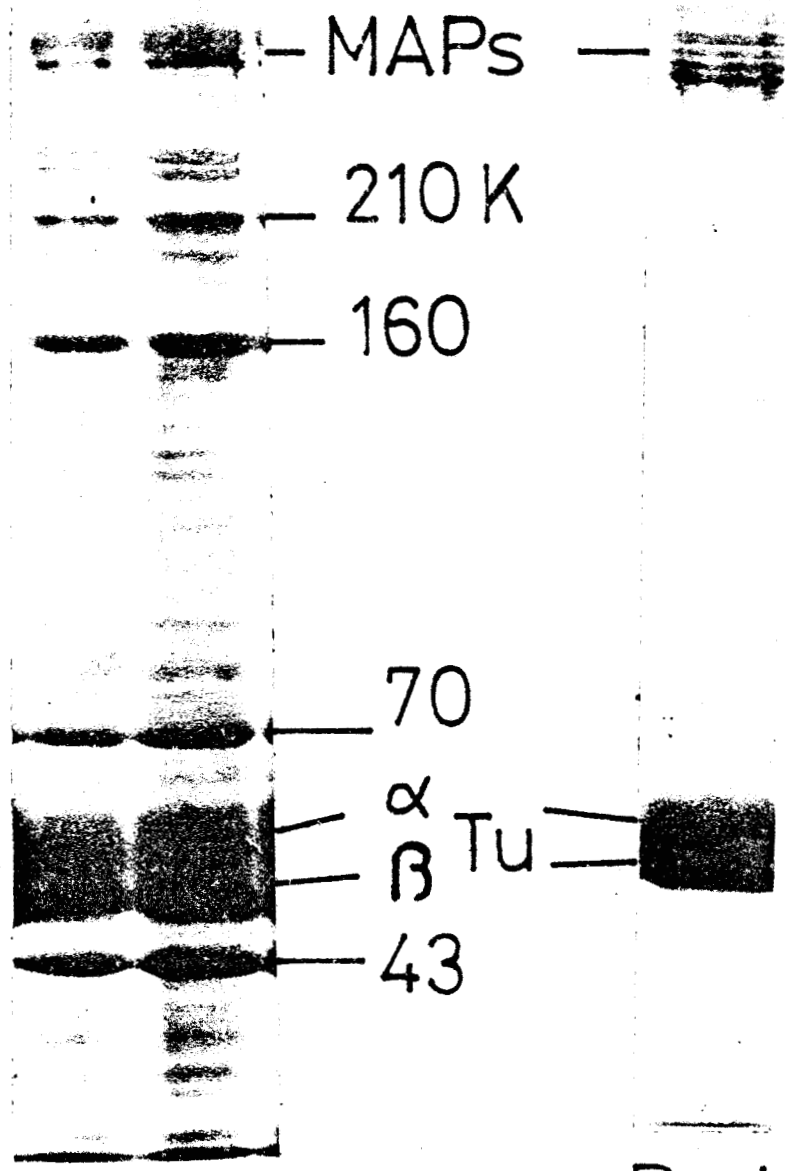


FIGURE 35-A

FORMATION DES MICROFIBRILLES: Etape de dépolymérisation des microtubules de 1^{er} cycle dans un tampon de force ionique élevée.



Microfibrilles

Proteines microtubulaires



CENTRIFUGATION
(FORMATION DES MICROFIBRILLES)

SURNAGEANT → DIALYSE (CONTRE DU TAMPON MES)

FIGURE 35-B



FORMATION ET ISOLEMENT DES MICROFIBRILLES.

Lorsque les protéines microtubulaires sont en solution dans le tampon Mes-NaCl 1M, nous n'observons aucune structure particulière, sauf peut être quelques rares filaments de 10 nm. Dès que le NaCl est éliminé, nous observons l'apparition progressive mais rapide de ce réseau (DELAOURTE et al., 1977-b; 1978).

Les microfibrilles peuvent être isolées facilement, par centrifugation à 4°C. Elles sont constituées essentiellement des protéines microtubulaires (tubuline et MAPs), de l'actine et des protéines de neurofilaments.

L'observation de coupes fines du culot de microfibrilles montre que l'on isole en même temps une grande quantité de membranes (figure 37).

Il semble donc que la formation des microfibrilles corresponde à une gélification non spécifique des différentes protéines du milieu. La quantité de microfibrilles représente 30% de l'ensemble des protéines de la solution de départ qui sont les protéines microtubulaires de premier cycle.

Nos résultats préliminaires ne permettent pas de conclure sur la nature des microfibrilles et des interactions responsables de leurs formations. Il est possible que le NaCl, en dépolymérisant totalement les associations de tubuline, permette un nouvel arrangement des protéines microtubulaires, après élimination du NaCl par dialyse.

La formation des microfibrilles résulte peut être d'un réarrangement désordonné des protéines du milieu, dû à une perturbation de l'environnement des protéines dont le rôle est de se polymériser, ou de s'agréger lorsque les conditions ne sont plus favorables.

La formation des microfibrilles peut également refléter une activité particulière de la cellule nerveuse. En effet, les recherches sur le cytosquelette semblent indiquer que les différents éléments de ce cytosquelette (microtubules, filaments d'actine, filaments intermédiaires) sont en fait reliés entre eux pour former un réseau

tridimensionnel dans la cellule (voir la conclusion générale)

Seule, une investigation plus poussée de ces recherches permettra de déterminer l'importance et l'intérêt du phénomène.

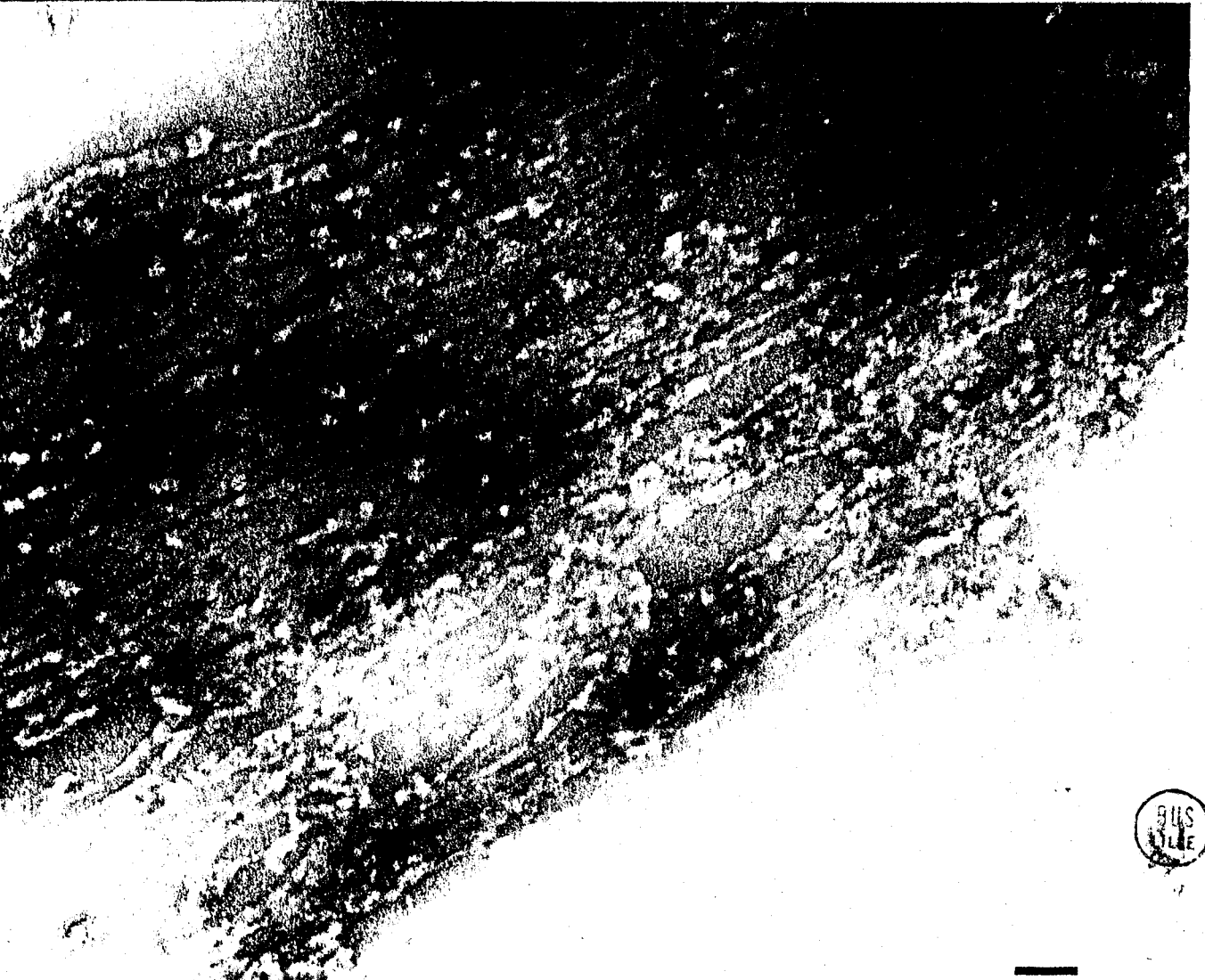
FIGURE 36

OBSERVATION DES MICROFIBRILLES PAR COLORATION NEGATIVE.

Les microfibrilles semblent constituées d'un réseau de filaments d'un diamètre approximatif de 6 nm, reliés entre eux par des pontages.

Ce réseau est également décoré d'éléments granuleux.

Chaque barre représente 50 nm.



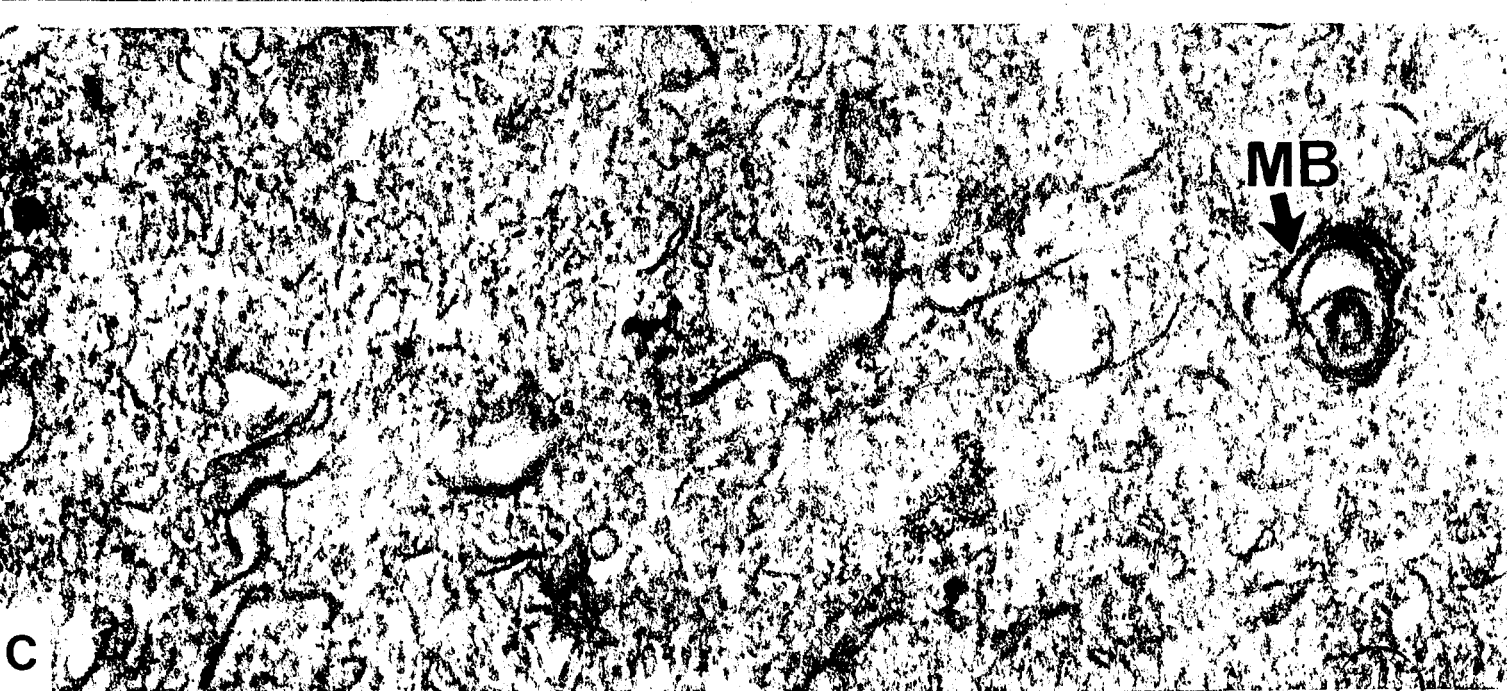
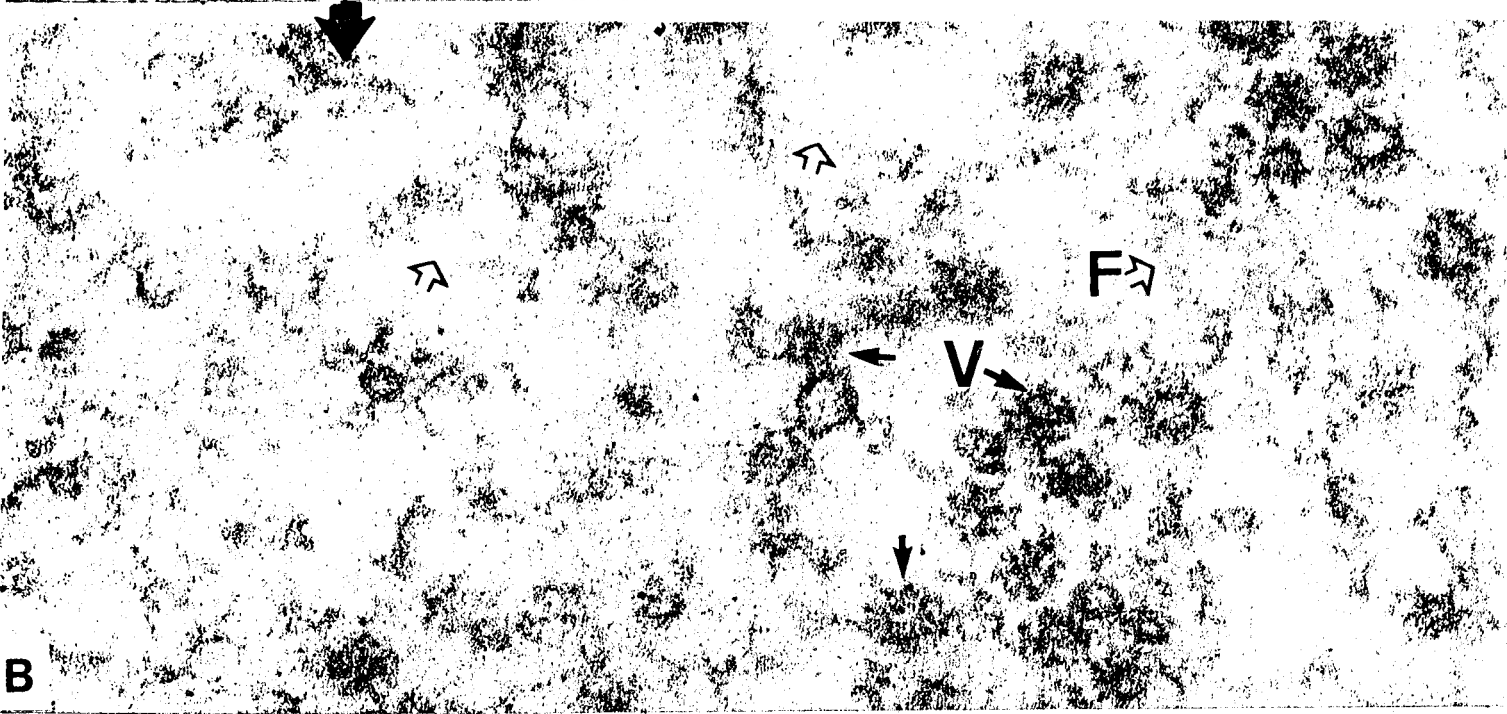
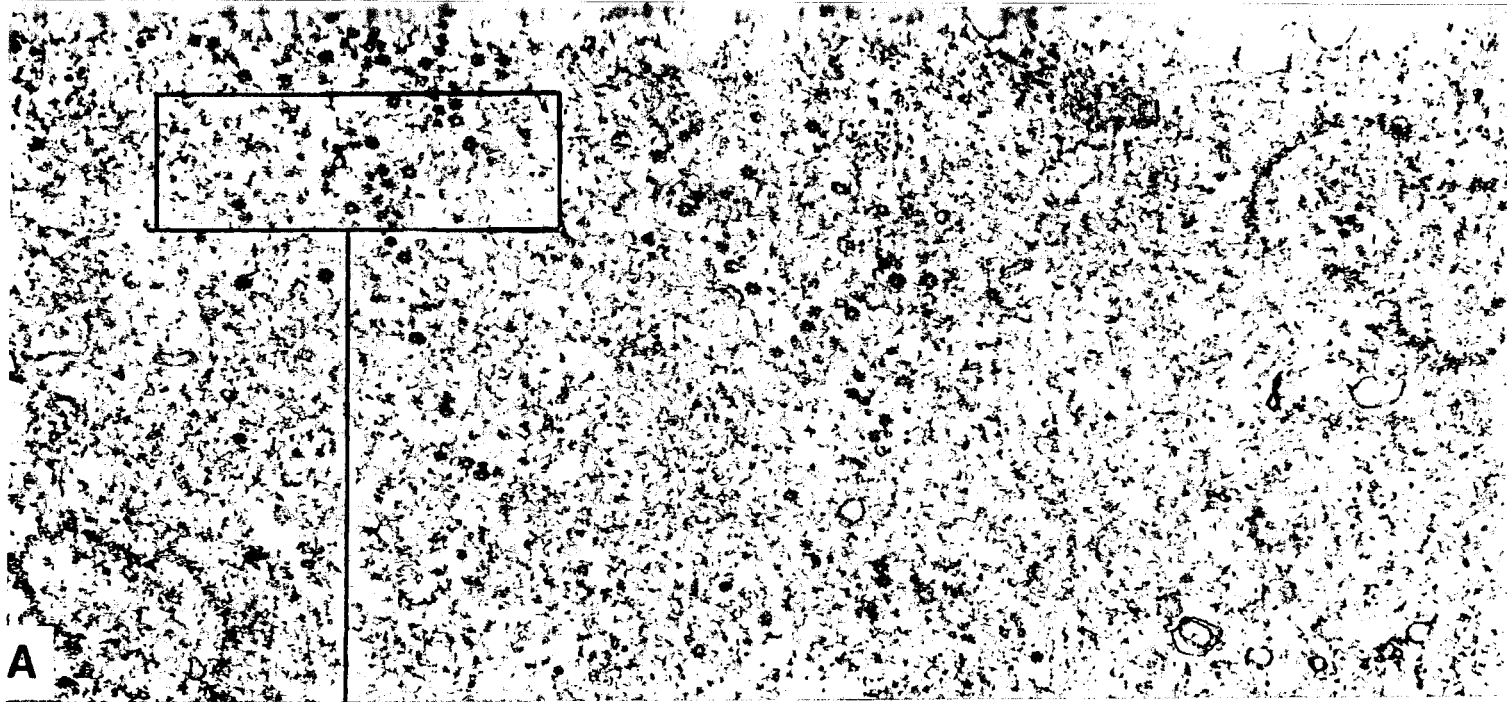
9115
111E

FIGURE 37

OBSERVATIONS DE COUPES ULTRA-FINES D'UNE PREPARATION DE
MICROFIBRILLES ISOLEES PAR CENTRIFUGATION.

- A) Une partie du culot contient des structures filamenteuses comparables aux filaments de 10 nm décrits page 107. On observe également la présence de nombreuses vésicules dentelées. X 60 000.
- B) Même observation mais à un grossissement supérieur (240 000).
- C) Partie du culot de préparation qui contient de nombreuses structures membranaires. X 60 000.

F : Filament
V: Vesicules
MB: Membranes.



I X) C O N C L U S I O N G E N E R A L E

LES FILAMENTS DE 10 nm ISOLES AU COURS DES PREPARATIONS DE MICROTUBULES SONT DES NEUROFILAMENTS

Au cours des préparations de neurotubules, nous avons été intrigués par la quantité importante de filaments de 10 nm que l'on isole au cours des cycles de dépolymérisation.

Ces filaments peuvent être le reflet d'une activité physiologique de la cellule nerveuse. Nous avons essayé d'en déterminer leur rôle et leur origine.

L'analyse par électrophorèse a montré que la fraction enrichie en filaments de 10 nm est toujours constituée d'une protéine majeure possédant le même caractère électrophorétique que la tubuline, et de trois protéines mineures de poids moléculaire 210 K, 160 K et 70 K.

Ces filaments ressemblent beaucoup aux neurofilaments, qui sont les filaments intermédiaires des cellules nerveuses.

Ils présentent notamment un diamètre et une forme similaires (filaments longs, flexibles, sans point de branchement) et des propriétés physico-chimiques identiques, en particulier ces deux types de filaments ne sont dissociés que dans des tampons dénaturants (urée 8 M, chlorhydrate de guanidine 5 M et dodecyl sulfate de sodium).

Ceci nous a amené à entreprendre une étude comparative entre les filaments obtenus au cours des préparations de microtubules, et des neurofilaments préparés à partir du tronc cérébral de Boeuf, selon la technique classique de "flottation" mise au point par SHELANSKI et al., (1971) et améliorée par ANDERTON (THORPE et al., 1979)

En collaboration avec Brian ANDERTON, nous avons observé:

- que la préparation de neurofilaments est constituée d'une protéine majeure 50 K et d'un triplet de protéine 210 K, 160 K et 70 K.
- que la fraction purifiée de filaments de 10 nm est constituée du même triplet (comparaison par la technique très fine des cartes peptidiques en électrophorèse-SDS), et de la tubuline.

Il nous reste à expliquer la présence de la tubuline associée aux filaments de 10 nm. S'agit t-il d'une interaction très forte entre la tubuline et ces filaments?

Cette interaction peut s'expliquer puisqu'il semble y avoir des pontages entre les microtubules et les neuro-filaments dans l'axoplasme. Ces deux structures peuvent former un réseau dans l'axone, et servir de support structural au transport axonal lent comme l'ont suggéré LAZEK et HOFFMAN (1976).

Plusieurs équipes américaines observent ce phénomène, sans toutefois pouvoir y apporter une explication précise (RUNGE et al., 1979 a et b; SHELANSKI et LIEM, 1979; WANG, ASAI et LAZARIDES, 1980).

Des coupes ultra-fines de culots de filaments de 10 nm sédimentés après leur purification ont été examinées. Simultanément, nous avons effectué une étude comparative des préparations de filaments obtenus à partir de différents substrats: les hémisphères cérébraux, le tronc cérébral et la moelle.

Les résultats obtenus indiquent que les préparations contiennent en fait deux types de matériaux distincts: des filaments de 10 nm et des contaminants membranaires.

Les préparations de filaments de 10 nm à partir des hémisphères cérébraux contiennent en fait peu de filaments et beaucoup de matériel d'origine membranaire.

Par contre, les préparations provenant de la moelle sont constituées uniquement de filaments.

Ces résultats ont ouvert deux voies de recherches différentes:

1) MISE EN EVIDENCE D'UNE INTERACTION TUBULINE-MEMBRANE

a) Contamination des préparations de microtubules et de neurofilaments par un complexe membranes-protéines microtubulaires.

La présence de la tubuline dans les préparations de filaments de 10 nm est très probablement associée à la contamination membranaire.

Cette interaction tubuline-membrane a été observée par plusieurs équipes (CARON et BERLIN, 1979 ; FEIT et SHAY, 1980). Ces auteurs montrent qu'à 37°C, les protéines microtubulaires (tubuline et MAPs) s'attachent très fortement aux membranes.

Ce phénomène est important car il retentit sur la qualité des préparations de microtubules et de filaments de 10 nm. Au cours des cycles de polymérisation à 37°C, les protéines microtubulaires vont se fixer sur les membranes encore présentes dans la solution protéique. Ce matériel membranaire va alors contaminer les préparations et peut amener des artéfacts expérimentaux. Dans certaines conditions, il peut être confondu avec les anneaux 36 S qui sont les sites initiateurs de la polymérisation.

En effet, dans des conditions expérimentales non-dénaturantes, les membranes semblent fixer des quantités importantes de protéines microtubulaires. Les protéines

propres à la constitution des membranes ne représenteraient alors qu'une faible proportion du complexe membrane-protéines microtubulaires. Donc, globalement, les membranes possèdent la même composition en protéines que les anneaux 36 S. Elles possèdent en outre un comportement en gel-filtration qui est identique aux anneaux 36 S.

D'autre part, c'est la présence de ces membranes dans les préparations de filaments de 10 nm qui a fait croire qu'il pouvait y avoir une interaction entre les neuro-filaments et les microtubules in vitro.

L'évaluation de la contamination membranaire n'est pas facilement quantifiable. La technique d'observation en microscopie électronique après coloration négative, sous évalue sérieusement cette estimation.

Il reste alors une autre technique plus quantitative, qui est l'observation de coupes fines de préparations centrifugées. Il faut bien reconnaître que cette technique est longue et fastidieuse.

Nous avons remarqué qu'un simple examen de l'apparence des culots de préparation peut nous apporter rapidement des renseignements précis. En effet, lorsqu'il y a absence de membranes dans une préparation de microtubules ou de neurofilaments, les culots sont transparents, voir cristallins.

D'autre part, la présence de membranes dans une préparation de microtubules ou de neurofilaments semble pouvoir être facilement détectable par électrophorèse en milieu SDS. Les protéines constitutives des membranes, qui possèdent des poids moléculaires très variés, se répartissent uniformément au cours de l'électrophorèse et forment un fond coloré uniforme après la coloration spécifique des protéines par le Bleu de Coomassie. L'absence de ce fond coloré sur les gels d'électrophorèse a toujours été associée avec des préparations "propres".

b) Présence d'un pool de TUBULINE "insoluble".

Le matériel insoluble obtenu à partir d'un homogénat de cerveau, non-incubé à 37°C, contient une grande quantité de tubuline, qui se trouve probablement liée aux membranes.

Il y a donc deux pools de tubuline, l'un qui est en équilibre dynamique avec les microtubules, et l'autre qui fait partie du matériel insoluble.

Une quantification précise de ces deux pools reste à faire. Nous avons montré que la tubuline insoluble, extraite avec des tampons dénaturants, se trouve en grande quantité dans les hémisphères cérébraux.

La proportion de tubuline insoluble se trouvant dans la substance blanche (tronc cérébral et moelle) est nettement plus faible.

La présence de la tubuline insoluble semble donc être plus en relation avec l'activité des corps cellulaires ou des dendrites, qui sont situés principalement au niveau du cortex, qu'avec l'activité de l'axone (qui constitue principalement la substance blanche).

Le rôle de la tubuline "insoluble" reste à établir. Il est vraisemblable qu'elle corresponde à une activité importante de la cellule nerveuse.

2) PREPARATION DES NEUROFILAMENTS

La préparation que nous avons décrite à partir de la moelle est en fait une préparation de neurofilaments puisque le matériel que nous obtenons présente le même aspect et la même composition en protéines que les neurofilaments décrits dans la littérature.

En fait, nous confirmons que la qualité du substrat de départ joue un rôle considérable sur la qualité des neurofilaments obtenus. La moelle semble être le substrat idéal. La technique de "flottation" décrite par THORPE et al. (1979) appliquée sur la moelle, donne également d'excellents résultats (communication personnelle).

Une étude comparative des rendements et de la qualité des neurofilaments obtenus par ces deux techniques différentes (cycles de polymérisation et "flottation") est en cours.

La technique que nous utilisons pour préparer les neurofilaments dérive de la technique de préparation des microtubules. Seul, le GTP, qui est indispensable pour la polymérisation de la tubuline, et qui n'influe pas sur la quantité de neurofilaments obtenus, n'est pas utilisé. L'étape d'élévation de la température à 37°C et de centrifugation à 30°C est commune aux deux techniques. Mais dans le cas de la préparation des neurofilaments, y a-t-il une véritable polymérisation?

Peut-on trouver les protéines de neurofilaments sous forme soluble, comme on le voit pour la tubuline et l'actine?
Il semble que non: les protéines de neurofilaments extraites à partir du système nerveux central et périphérique se trouvent sous forme d'agrégats ou de filaments courts possédant des poids moléculaires apparents supérieurs à 5 millions de daltons. En effet, les protéines de neurofilaments extraites dans des conditions non-dénaturantes, se trouvent dans le volume d'exclusion de gel-filtrations possédant une zone de travail entre 4 millions et 400 000 daltons.

Lorsque l'on chauffe la solution protéique contenant les protéines de neurofilaments, il est possible que les petits fragments de neurofilaments s'assemblent (ou s'agrègent). Il en résulte une augmentation de la taille des particules, ce qui permet ensuite de les centrifuger.

Nous pensons qu'il s'agit d'une polymérisation plutôt que d'une agrégation puisque les filaments obtenus sont identiques aux neurofilaments natifs isolés et décrits par d'autres auteurs (SCHLAEPFER, 1977; SHELANSKI et LIEM, (1979). En collaboration avec Brian ANDERTON, nous avons commencé une étude qui a pour but d'expliquer les mécanismes de polymérisation des neurofilaments.

Les grandes quantités de matériel obtenu nous ont permis d'aborder d'autres études physico-chimiques sur les neurofilaments, études qui étaient limitées au préalable par les faibles quantités de matériel obtenu et les grandes quantités de contaminants présents dans les préparations.

INTERACTION NEUROFILAMENTS-TUBULINE.

La présence de la tubuline dans les préparations de filaments de 10 nm résulte en fait d'une contamination membranaire. En éliminant les membranes, le pourcentage de tubuline passe de 60 % à moins de 10 %.

Ce pourcentage de 10% est en fait nettement surestimé. L'examen détaillé des gels d'acrylamide-SDS sur lesquels sont quantifiées les protéines montre qu'au niveau de la bande de tubuline, se juxtaposent également d'autres bandes protéiques.

Les techniques courantes d'enregistrement densitométrique et d'intégration d'électrophorégramme ne sont pas suffisamment résolutive pour faire la différence entre la tubuline et les protéines possédant un comportement électrophorétique très proche. Ces protéines peuvent être, par exemple, le facteur TAU 1 qui migre comme l'alpha-tubuline (CLEVELAND et al., 1977, a-b).

Cependant, bien que le pourcentage de tubuline soit faible, il serait intéressant de pouvoir le quantifier avec exactitude. En effet, cette tubuline peut provenir des dernières traces de la contamination membranaire qui est difficile à éliminer totalement avec un protocole de préparation aussi simple.

Nous devons également envisager que la faible fraction de tubuline restant dans la préparation interagit avec les neurofilaments.

L'immunologie nous apportera probablement la réponse puisque, dans le cas d'une interaction NFs-tubuline, les neurofilaments de notre préparation seront décorés par les anticorps anti-tubuline. Nous envisageons de faire prochainement cette expérimentation.

Dans le cas où la tubuline présente dans la préparation est liée aux neurofilaments, nous pouvons envisager deux cas extrêmes:

1) - La tubuline occupe tous les sites d'interactions situés sur les neurofilaments. Ces neurofilaments n'auront donc plus d'affinité pour d'autres molécules de tubuline ajoutées au milieu.

2) - Tous les sites d'interactions ne sont pas occupés. Dans ce cas, en ajoutant de la tubuline à la préparation de neurofilaments, nous devrions isoler des neurofilaments fixant une plus grande quantité de tubuline.

Nous avons montré que ces neurofilaments, incubés en présence d'une forte concentration de protéines microtubulaires (dépourvue de toute contamination membranaire) ne réagissaient pas avec celles-ci.

Il semble donc qu'il n'y ait pas d'interaction évidente entre la tubuline et les neurofilaments, du moins in vitro.

Nos résultats indiquent que les filaments de 10 nm isolés au cours des préparations de microtubules sont des neurofilaments, mais qu'ils ne représentent pas un bon modèle d'étude pour une interaction neurofilament-tubuline ou neurofilament-microtubule, comme cela a été suggéré par SHELANSKI et LIEM, 1979 et RUNGE et al. (1979 a-b)

In situ, on peut observer des pontages entre les microtubules et les neurofilaments (RICE et al., 1980). Ces pontages observés chez Loligo Paletii sont en faveur d'une interaction microtubule-neurofilaments. Par contre, les axones géants de Myxicola contiennent une grande quantité de neurofilaments, mais les microtubules y sont absents (GILBERT et al., 1975).

LASEK et HOFFMANN(1976) ont suggéré que les microtubules et les neurofilaments forment un réseau dans l'axoplasme et que ce réseau se déplace dans l'axoplasme à la vitesse du transport axonal lent. Cette théorie suppose qu'il y a des interactions entre les microtubules et les neurofilaments.

Les travaux les plus récents semblent indiquer, par des analyses fines du transport axonal lent, que les microtubules et les neurofilaments se déplacent à des vitesses légèrement différentes, et que l'on peut bloquer le déplacement des microtubules sans modifier le déplacement des neurofilaments (FILLIATREAU, 1980 ; KOMIYA et KUROKAWA, 1980).

Nos résultats montrant qu'il n'y a pas d'interaction entre les microtubules et les neurofilaments in vitro semblent en accord avec les travaux récents.

Il est donc probable que les microtubules et les neurofilaments se déplacent séparément dans l'axone. Cependant, des méthodologies nouvelles ou affinées seront nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires du transport axonal lent.

RECONSTITUTION DES NEUROFILAMENTS IN VITRO

Le meilleur moyen pour comprendre comment se polymérise un neurofilament, pour connaître sa sous-structure, et pour mieux étudier son interaction éventuelle avec d'autres structures, est d'isoler chaque protéine du triplet et d'étudier ensuite la recombinaison de ces protéines.

Les résultats que nous avons eus après séparation des protéines par gel-filtration sont préliminaires. En effet, nous avons pu séparer les deux protéines 210 K et 160 K de la protéine 70 K. Cependant nous n'avons pas réussi à isoler chaque protéine à l'état pur.

La formation de structures différentes à partir des protéines 210 K et 160 K (filaments longs et fins) et à partir de la protéine 70 K (filaments courts, peu définis et larges), et la formation de filaments de 10 nm à partir des protéines 160 K + 70K, indiquent que la protéine 70 K et les deux hauts poids moléculaires 210 K et 160 K jouent des rôles complémentaires et différents dans la constitution du neurofilament.

La préparation de polypeptides purs est en cours dans notre laboratoire. (ainsi que dans plusieurs laboratoires américains!).

Les connaissances sur les mécanismes de polymérisation des neurofilaments devraient donc évoluer très rapidement .

ETUDE DES NEUROFILAMENTS D'OISEAUX.

Il nous a semblé intéressant d'étudier les neurofilaments d'Oiseaux pour deux raisons différentes: On connaissait seulement la composition en protéines des neurofilaments de Mammifères, du Calmar et de l'Annélide Myxicola. Les neurofilaments de Mammifères étant très différents des neurofilaments d'Invertébrés, nous avons voulu les comparer à des neurofilaments du tissu nerveux d'un groupe plus proche, à savoir celui des Oiseaux.

D'autre part, le Poulet est un bon modèle d'étude du transport axonal. Pour suivre les protéines se déplaçant avec le transport axonal lent, notamment les neurofilaments, il était indispensable de connaître leur composition en protéines.

Pour isoler les neurofilaments de nerfs sciatiques de Poulet, nous avons tout d'abord essayé notre méthode de préparation qui donne de bons résultats avec la moelle de Boeuf. Les résultats ont été très médiocres car les nerfs contiennent beaucoup de fibres de collagène et il est très difficile d'extraire l'axoplasme.

Il nous a donc fallu utiliser d'autres techniques, notamment celles mises au point pour extraire rapidement les protéines du neurocytosquelette avec des tampons dénaturants (THORPE et al., 1979, b).

Nous avons également isolé des fractions enrichies de neurofilaments natifs dans un gradient discontinu de sucrose centrifugé à haute vitesse.

Ces deux techniques ne nous ont pas permis d'obtenir des filaments aussi purs que les neurofilaments de Boeuf. Nous pouvons cependant conclure que les neurofilaments d'Oiseaux (Dindon et Poulet) sont constitués d'un triplet de protéine de poids moléculaire 205 K, 156 K et 69 K et qu'ils semblent donc très proches des neurofilaments de Mammifères.

La technique d'extraction des protéines de neurofilaments par des tampons dénaturants nous a permis de déterminer rapidement la composition en protéines des neurofilaments d'Oiseaux. Elle pourra être appliquée à d'autres espèces et nous permettra de mieux comprendre la transformation de ces filaments au cours de l'évolution.

L'actine et la tubuline, qui sont des protéines globulaires, possèdent de nombreux sites d'interactions, et n'ont pas évolué au cours du temps.

Par contre, les protéines de neurofilaments sont des protéines à structure fibreuse qui, apparemment, se sont modifiées considérablement au cours de l'évolution. Nous rappellerons que les neurofilaments de Myxicola sont constitués de 2 protéines 160 et 152 K et que ceux de Loligo Palelii sont formés de 2 protéines 200 et 65 K.

Les neurofilaments sont donc un bon substrat pour l'étude phylogénique d'une structure protéique du cytosquelette. Les neurofilaments se sont considérablement modifiés au cours du temps et ils semblent dériver d'un filament ancestral commun à tous les filaments intermédiaires car il existe un anticorps monoclonal qui reconnaît tous les filaments intermédiaires (B. ANDERTON, communication personnelle).

LES NEUROFILAMENTS SONT-ILS DES STRUCTURES DYNAMIQUES?

La technique d'extraction des protéines du neurocytosquelette va également nous permettre d'étudier la distribution des protéines de neurofilaments et de la tubuline, dans les différentes parties du système nerveux central et périphérique.

Les protéines de cytosquelette peuvent être classées en 2 parties en fonction de leur solubilité.

-il y a d'abord les protéines solubles dans des tampons de force ionique élevée et contenant des détergents non polaires. Il s'agit essentiellement de la tubuline, de l'actine et de la myosine.

-ensuite il y a les protéines solubilisées par des tampons dénaturants (urée 8 M, chlorhydrate de guanidine 5 M). Ces protéines sont essentiellement les protéines de neurofilaments, la tubuline attachée aux membranes, l'actine des microfilaments stables et la GFA des filaments gliaux.

Nous envisageons d'étudier en détail la distribution de ces protéines.

Ceci nous permettra de répondre à une question importante soulevée par RUEGER et al. (1980) qui pensent qu'à très faible force ionique, les filaments gliaux se dépolymérisent. Les travaux de ZACKROFF et GOLDMAN (1979) semblent confirmer cette hypothèse. (revue générale: ANDERTON, B. (1980)). Ces auteurs montrent que les filaments intermédiaires dialysés contre un tampon de faible force ionique se dépolymérisent.

Ils concluent donc que les filaments intermédiaires, en général, ne seraient pas aussi stables qu'on a bien voulu le décrire (ANDERTON et al. 1975) et qu'ils pourraient être, comme les microtubules, dans un équilibre dynamique entre la forme polymérisée et la forme dépolymérisée.

Nous avons remarqué que les conditions de dialyse de ZACKROFF et GOLDMAN n'évitent pas du tout la protéolyse.

D'autre part, RUEGER et al., (1980) ne font pas très bien la distinction entre les protéines solubles et les surnageants d'une centrifugation effectuée à une vitesse assez faible (50 000 g-30 minutes).

Ce surnageant contient encore du matériel insoluble qui n'a pas été centrifugé. Donc, le dosage d'une protéine "soluble" devrait passer par des techniques qui permettent la détermination du poids moléculaire apparent et du coefficient de sédimentation (gel-filtration et ultracentrifugation).

Nous avons commencé l'étude permettant la quantification des protéines de neurofilaments et de filaments gliaux sous forme soluble ou dissociée. Les premiers résultats semblent indiquer que ces filaments intermédiaires du tissu nerveux sont très stables, et exclusivement sous forme polymérisée.

Il s'agit de résultats préliminaires, mais ces études devraient permettre de mieux préciser si les filaments intermédiaires sont des structures stables ou non. Dans le cas d'une très grande stabilité, nous pourrions donc penser que ces filaments jouent avant tout un rôle architectural. Dans le cas d'un équilibre dynamique permanent entre la forme polymérisée et la forme dépolymérisée, le rôle des neurofilaments pourrait alors être comparé à celui des microtubules et des filaments d'actine.

FORMATION DES MICROFIBRILLES

Nous avons modifié le protocole de préparation des microtubules pour mieux éliminer les filaments de 10 nm. Pour cela, nous avons dépolymérisé totalement les microtubules par un tampon Mes-NaCl 1M à 4°C et centrifugé les filaments à haute vitesse. Le surnageant obtenu, qui contient nettement moins de filaments, est dialysé contre le tampon de polymérisation pour réinduire un cycle de polymérisation de microtubules. Au cours de la dialyse, nous avons observé la formation d'un réseau microfibrillaire. Ces microfibrilles, isolées par centrifugation, sont constituées de protéines microtubulaires, d'actine, de protéines de neurofilaments et de membranes.

Quel est le mécanisme de formation des microfibrilles?
Actuellement, nous ne pouvons qu'émettre des hypothèses. Nous avons remarqué que la proportion d'actine dans les microfibrilles est importante. Il est probable que l'actine joue un rôle déterminant dans la formation de ce réseau. Mais étant donné qu'il y a quatre constituants différents isolés avec le réseau: les protéines microtubulaires, l'actine, le triplet des neurofilaments et les membranes, il nous faudra d'abord isoler les structures réellement impliquées dans la formation du réseau pour comprendre le mécanisme d'assemblage.

Si, comme le suggère WOLOSEWICK et PORTER (1979), il existe des filaments microtrabéculaires qui lieraient entre eux les différents éléments du cytoplasme, il est possible que la sous-unité protéique de ces filaments soit présente dans la préparation. Cette protéine lierait alors entre eux les membranes avec les autres éléments du cytosquelette pour former les microfibrilles.

GRIFFITH et POLLARD (1978) ont observé des interactions entre les protéines microtubulaires et l'actine. Ces interactions pourraient participer à la formation du réseau microfibrillaire.

De nombreux auteurs s'orientent vers l'étude des interactions entre les différents éléments du cytosquelette et entre celles du cytosquelette et des membranes.

La formation des microfibrilles pourrait alors être un bon modèle d'étude pour la compréhension des mécanismes d'interaction.

=====

La composition en protéines des neurofilaments est maintenant bien admise et la préparation de ces filaments ne pose plus de problème.

Une voie de recherche est donc ouverte ,qui devrait déboucher sur une meilleure connaissance des mécanismes du transport axonal et sur une meilleure connaissance de la biologie du neurone. Nous souhaitons continuer à travailler sur ce thème de recherche, qui mènera à une amélioration de la connaissance générale, et qui devrait aboutir également à mieux comprendre certains aspects pathologiques du tissu nerveux .

- ANDERTON, B.H., BELL, C.W and GILBERT, D.S (1976)
Neurofilaments
Biochem.Soc.Trans, 4, 544-548. citées pages 18, 82, 150

- ANDERTON, B.H., AYERS, M and THORPE, R (1978)
Neurofilaments from mammalian central and peripheral nerve share certain polypeptides
FEBS Letters, 96, 159-163 pages 38, 41, 96

- ANDERTON, B.H (1980)
Intermediate filament cycles
Nature, 283, 716 pages 18, 150

- AMOS, L.A. (1977)
Arrangement of high molecular weight associated proteins on purified mammalian brain microtubule.
J.Cell.Biol, 72, 642-654. page 34

- AMOS, L.A. (1979).
Structure of microtubules.
in "Microtubules" edited by ROBERTS, K and HYAMS, J.S.
Academic Press.LONDON, Vol 2 , 1-64. page 23

- AUROUX, M et HAEGEL, P (1974).
Embryologie. Editeur MASSON. Paris. p10 pages 50, 74

- BERKOWITZ, S.A., KATAGIRI, J., BINDER, H.K and WILLIAMS, R.C.Jr (1977).
Separation and characterization of microtubule proteins from calf brain.
Biochemistry, 16, 5610-5617. pages 75, 101

- BIGNAMI, A and DAHL, D. (1977)
Specificity of the glial fibrillary acidic protein for astroglia
J.Histochem.Cytochem, 25, 466-469. pages 18, 38, 90

- BRAY, D. (1977).
Actin and myosin in neurones: a first review
Biochimie, 59, 1-6. pages 17, 19

- BURRIDGE, K and BRAY, D. (1975).
Purification and structural analysis of myosins from brain.
J. Mol. Biol, 99, 1-4. page 19

- CARON, J.M and BERLIN, R.D. (1979)
Interaction of microtubule proteins with phospholipid vesicles.
J. Cell. Biol, 81, 665-671. pages 98, 139

- CLEVELAND, D.W., FISHER, S.G., KIRSCHNER, M.W and LAEMMLI, U.K.
(1977).
Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulphate and analysis by gel electrophoresis.
J. Biol. Chem, 252, 1102-1106. pages 72, 74, 87, 90

- CLEVELAND, D.W., HWO, S.Y and KIRSCHNER, M.W. (1977-a).
Purification of Tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin.
J. Mol. Biol, 116, 207-225. pages 34, 37, 82

- CLEVELAND, D.W., HWO, S.Y and KIRSCHNER, M.W. (1977-b).
Physical and chemical properties of purified Tau factor and the role of TAU in microtubule assembly.
J. Mol. Biol, 116, 227-247. pages 34, 37, 82

- CLEVELAND, D.W., SPIEGELMAN, B.M and KIRSCHNER, M.W. (1979).
Conservation of microtubule-associated proteins.
J. Biol. Chem, 254, 12670-12678. page 37

- DAVID-PFEUTY, T., ERICKSON, H and PANTALONI, D. (1977).
Guanosine triphosphatase activity of tubulin associated with microtubule assembly.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5372-5376. page 26

- DAVID-PFEUTY, T., LAPORTE, J and PANTALONI, D. (1978)
GTPase activity at ends of microtubules
Nature, 272, 282-283. p 26

- DAVID-PFEUTY, T., SIMON, C and PANTALONI, D. (1979)
Effect of antimitotic drugs on tubulin GTPase activity and self-assembly.
J. Biol. Chem, 254, 11696-11702. p 26

- DAVISON, P. F and WINSLOW, B. (1974).
The protein subunit of calf brain neurofilament.
J. Neurobiology, 5, 119-133. p 39

- DAVISON, P. F and HONG, B. H. (1977)
Structural homologies in mammalian neurofilament proteins.
Brain Research, 134, 287-295. p 40

- DAY, W. A. (1977).
Solubilization of neurofilaments from central nervous system myelinated nerve.
J. Ultrastructure. Research, 60, 362-372. p 41, 43, 44

- DEBRABANDER, M., AERTS, F., VAN DE VEIRE, R and BORGERS, M. (1975).
Evidence against interconversion of microtubules and neurofilaments
Nature, 253, 119-120. p 75

- DELACOURTE, A., PLANCOT, M. T., HAN, K. K., HILDEBRAND, H and BISERTE, G. (1977-a).
Investigation of tubulin fibers formed during microtubule polymerization cycles
FEBS Letters, 77, 41-46. p 82

- DELACOURTE, A., PLANCOT, M. T., BOUTTEAU, F., HAN, K. K., HILDEBRAND, H. F et BISERTE, G. (1977-b).
Préparation de microtubules hautement purifiés et mise en évidence d'un arrangement nouveau des molécules de tubuline à basse température.
Biochimie, 59, 479-486. p 37, 131

- DELACOURTE, A., BELIN, M. T., HILDEBRAND, H. F and BISERTE, G. (1978).
Separation of pig brain microtubular proteins into three distinct fractions: microtubules, 10 nm filaments and microfibrils.
Cytobiologie, 18, 193-194. Abstract. p 131

- DELACOURTE, A., KRIVOSIC, I., BOUTTEAU, F et BISERTE, G. (1979).
Composition en protéines des neurofilaments de mammifères.
Biol. Cell, 35, 57a. Abstract. p 96

- DELACOURTE, A., FILLIATREAU, G., BOUTTEAU, F., BISERTE, G
and SCHREVEL, J. (1980-a).
*Study of the 10 nm filament fraction isolated during the standard
microtubule preparation.*
Biochem. J, 191, 543-546. p 60, 99

- DELACOURTE, A., BOUTTEAU, F., BISERTE, G and SCHREVEL, J. (1980-b).
Study of the 10 nm filaments isolated during neurotubule preparations.
Communication au colloque de la Société de Chimie Biologique
-Motilité cellulaire-Montpellier. p 99

- DUSTIN, P. (1978)
dans "MICROTUBULES" Edité par Springer-Verlag, Berlin. Heidelberg.
p 23, 27, 30

- EIPPER, B. A. (1972).
*Rat brain microtubule proteins purification and determination of
covalently bound phosphate and carbohydrate.*
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2283-2287. p 82, 83

- ERICKSON, H. P. (1974)
*Assembly of microtubules from preformed, ring-shaped protofilaments
and 6S tubulin.*
J. Supramol. Structure, 2, 393-411. p 32

- FEIT, H and SHAY, J. W (1980).
The assembly of tubulin into membranes
Biophys. Biochem. Res. Com, 94, 324-331. p 98, 139

- FILLIATREAU, G. (1980)
Quelques aspects dynamiques du cytosquelette axonal.
Thèse de Doctorat 3ème cycle. Université Pierre et Marie Curie. Paris
p 20,56,146
- FRANKE, W.W., SCHMID, E., OSBORN, M and WEBER, K. (1978)
Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 5034-5038. p 18
- GASKIN, F and KRESS, Y. (1977).
Zinc ion-induced assembly of tubulin
J. Biol. Chem, 252, 6918-6924. p 25
- GIBBONS, I. R. (1975)
Molecular basis of flagellar motility in sea urchin spermatozoa
In: MOLECULES AND CELL MOVEMENT.
Edited by S. INOUE and R. E STEPHENS, New York : Raven Press;
Amsterdam: North-Holland. pp 207-232. p 34
- GILBERT, D. S., NEWBY, B. J and ANDERTON, B. H. (1975)
Neurofilament disguise, destruction and discipline.
Nature, 256, 586-589. p 42, 145
- GILBERT, D. (1978)
10 nm filaments.
Nature, 272, 577-578. p 78
- GRIFFIN, W. J., HOFFMAN, P. N., CLARK, A. W., CAROLL, P. T
and PRICE, D. L. (1978)
*Slow axonal transport of neurofilaments proteins:
Impairment of β, β' -iminodipropionitrile administration.*
Science, 202, 633-635. p 56
- GRIFFITH, L. M., and POLLARD, T. D. (1978)
*Evidence for action filament-microtubule interaction
mediated by microtubule-associated proteins.*
J. Cell. Biol, 78, 958-965. p 152

- GROSS, G.W (1975) -159-
The microstream concept of axoplasmic and dendritic transport
Advances in Neurobiology, 12, 283-296 p 51

- HAIMO, L.T., TELZER, B.R and ROSENBAUM, J.L (1979)
Dynein binds to and crossbridges cytoplasmic microtubules
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 5759-5763 p 34

- HILDEBRAND, H.F. (1978)
Rhabdomyosarcomes et Leiomyosarcomes chimio-induits par le Ni₃S₂
chez le rat et le lapin et Rhabdomyosarcomes spontanés humains
Thèse de Doctorat d'Etat. Faculté des Sciences de LILLE p 79

- HOLTROP, M.E., RAISZ, L.G and SIMMONS, H.A. (1974)
The effects of colchicine on the ultrastructure of osteoclasts
J. Cell. Biol., 60, 346-355. p 51

- IQBAL, K; , GRUNDKE-IQBAL, I., WISNIEWSKI, H.M and TERRY, R.D. (1977)
On neurofilament and neurotubule protein from human autopsy tissue
J. Neurochemistry, 29, 417-427. p 40

- JOHNSON, L.S and SINEX, F.M. (1974).
On the relationship of brain filaments to microtubules.
J. Neurochemistry, 22, 321-326. p 39

- JORGENSEN, A.O., SUBRAHMZNYAN, L., TURNBULL, L and KALNINS, V.I.
 (1976) *Localization of the neurofilament protein*
in neuroblastoma cells by immunofluorescent staining.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 9, 3192-3196. p 40

- KEATES, R.A.B and HALL, R.H. (1975)
Tubulin requires an accessory protein for self assembly into microtubules
Nature, 257, 418-421. p 77

- KIRSCHNER, M.W. (1979)
Microtubule assembly and nucleation
Int. Rev. Cytobiol, 54, 1-65. p 30, 32

- KOMIYA, Y and KUROKAWA, M. (1980)
Preferential blockade of the tubulin transport by colchicine.
Brain. Research, 190, 505-509. p 146

- KRISHMAN, P and HSU, D. (1971)
Binding of colchicine H³ to vinblastine paracrystals in culture cells
J. Cell. Biol, 48, 407-410. p 51

- KRISHMAN, N., KAISERMAN-ABRANOF, I. R and LAZEK, R. (1979).
Helical structure of neurofilament isolated from Myxicola and Squid axons.
J. Cell. Biol, 82, 323-335. p 42, 43

- KUCZMARSKI, E. R and ROSENBAUM, J. L. (1979-a).
Chick brain actin and myosin
J. Cell. Biol, 80, 341-355. p 17

- KUCZMARSKI, E. R and ROSENBAUM, J. L (1979-b).
Studies on the organization and localization of actin and myosin in neurons
J. Cell. Biol, 80, 356-371. p 17

- LAZARIDES, E. (1980)
Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space.
Nature, 283, 249-256. p 18, 52

- LAEMMLI, U. K. (1970)
Cleavage of structural proteins during head assembly of bacteriophage T4.
Nature, 227, 680-685. p 70

- LAEMMLI, U. K and FAVRE, M. (1973).
Maturation of the head of Bacteriophage T4
J. Mol. Biol, 80, 575-599. p 70

- LASEK, R. J and HOFFMAN, P. N. (1976)
The neuronal cytoskeleton, axonal transport and axonal growth.
Cell motility (eds: GOLDMAN, R., POLLARD, T and ROSENBAUM, J)
Cold Spring Harbour Laboratory pp 1021-1050 p 39, 41, 53-55
86, 138, 141

- LASEK, R. J., KRISHNAN, N and KAISERMEN-ABRAMOF, I. R. (1979)
*Identification of the subunit proteins of 10 nm neurofilaments
isolated from axoplasm of squid and Myxicola giant axons.*
J. Cell. Biol, 82, 336-346. p 42, 43

- LASEK, R.J. (1980)
Axonal transport: a dynamic view of neuronal structures.
Trends in Neuronal Sciences, 87-91. p 56

- LIEM, R.K.H., YEN, S.H., LORIA, J and SHELANSKI, M.L. (1977)
Immunological and biochemical comparison of tubulin and intermediate brain filament protein.
Brain Research, 132, 167-171. p 40

- LIEM, R.K.H., YEN, S.H., SALOMON, G.D and SHELANSKI, M.L. (1978).
Intermediate filaments in nervous tissue
J. Cell. Biol, 79, 637-645. p 38, 41, 96

- LIEM, R.K.H., SELKOE, D.J., YEN, S.H., SALOMON, G.D and SHELANSKI, M.L. (1979)
New insights on the composition of neurofilaments dans "Congenital and acquired cognitive disorders".
(Edited by Robert KATZMAN) Raven Press, New York, pp 145-151.
pp 18

- LU, R.C and ELZINGA, . . (1978)
The primary structure of tubulin. Sequences of the carboxyl terminus and seven other cyanogen bromide peptides from the alpha chain.
Biochem. Biophys. Acta, 537, 320-328. p 24

- LUDUENA, R.F and WOODWARD, D.O. (1973)
Isolation and partial characterization of alpha and beta tubulin from outer doublets of sea urchin sperm and microtubules of chick brain.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 3594-3598. p 24

- MICKO, S.D and SCHLAEPFER, W.W. (1978)
Protein composition of axons
J. Neurochem, 30, 1041-1049. p 120

- MORI, H and KUROKAWA, M. (1979)
Purification of neurofilaments and their interaction with vinblastine.
Cell. Struct. Funct, 4, 163-167. p 105

- NOBACK, C.R and DEMAREST, R.J. (1975)
The human nervous system. Basic principles of neurobiology.
Second edition. Mc GRAX HILL International student edition.
p 47
- PENNINGROTH, S.M and KIRSCHNER, M.W. (1977)
Nucleotide binding and phosphorylation in microtubule assembly in vitro.
J. Mol. Biol, 115, 643-673. p 26
- PLANCKE, Y and DELACOURTE, A. (1980)
*Removing of tubulin from neurofilaments obtained during
the early cycles of microtubule preparation*
Biol. Cell. vol 39, n°1. Abstract. p 99
- PONSTIGL, H., LITTLE, M., KRAUHS, E and KEMPF, T. (1979)
Carboxyl-terminal aminoacid sequence of alpha tubulin from porcine brain
Nature, 282, 423-424. p 24
- REYNOLDS, E.S. (1963)
*The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain
in electron microscopy*
J. Cell. Biol, 17, 208-212. p 61
- REYNOLDS, J.A and TANFORD, C. (1970)
The gross conformation of protein-sodium dodecyl sulfate complexes
J. Biol. Chem, 245, 5161-5165. p 66
- RICE, R.V., ROLANSKY, P.F., PASCOE, N and HOUGHTON, S.M. (1980)
*Bridges between microtubules and neurofilaments visualized by
stereoelectron microscopy.*
J. Ultrastruct. Res, 71, 303-310. p 145
- RUEGER, D.G., HUSTON, J.S., DAHL, D and BIGNAMI, A. (1979)
*Formation of 100 Å filaments from purified glial fibrillary acidic
proteins in vitro*
J. Mol. Biol, 135, 53-68. p 18, 116, 150, 151
- RUNGE, M.S., DETRICH, H.W and WILLIAMS, R.C. Jr. (1979-a)
*Identification of the major 68 000-dalton protein of microtubule
preparation as a 10 nm filament protein and its effect on microtubule
assembly in vitro*
Biochemistry, 18, 1689-1698. p 138, 145

- RUNGE, S.M., HEWGLEY, P.B., PUETT, D., and WILLIAMS, R.C. Jr (1979-b)
Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity in 10 nm filaments and microtubule preparation from bovine brain.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 76, 2561-2565. p 138, 145

- SCHLAEPFER, W.W. (1977)
Immunological and ultrastructural studies of neurofilaments isolated from rat peripheral nerve.
J.Cell.Biol, 74, 226-240 p 41

- SCHLAEPFER, W.W and FREEMAN, L.A. (1978)
Neurofilament proteins of rat peripheral nerve and spinal cord
J.Cell.Biol, 78, 653-662 p 38, 41, 96, 104, 120

- SCHWARTZ, J.H. (1980)
The transport of substances in nerve cells
Scientific American, 242, 122-135. p 56

- SELKOE, D.J., LUCKENBILL-EDDS, L and SHELANSKI, M.L. (1978)
Effects of neurotoxic industrial solvents on cultured neuroblastoma cells: methyl n-butyl ketones, n-hexane and derivatives
J.Neuropath.Exp.Neurol., 37, 768-781 p 51

- SHELANSKI, M.L., ALBERT, S., DE VRIES, G.H and NORTON, W.T. (1971)
Isolation of filaments from brain
Science, 174, 1242-1245 p 39, 137

- SHELANSKI, M.L., GASKIN, F and CANTOR, C.R. (1973)
Microtubule assembly in the absence of added nucleotides
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 70, 763-768 p16, 29, 58, 77

- SHELANSKI, M.L and LIEM, R.K.H. (1979)
Neurofilaments
J.Neurochemistry, 33, 5-13 p 18, 51, 96, 138, 145

- SLOBODA, R.D., DENTLER, W.L and ROSENBAUM, J.L (1976)
Microtubule-associated proteins and the stimulation of tubulin assembly
Biochemistry, 15, 4497-4505 p 34

- STOCKEN, N (1970)
Die Eignung von Pioloform F für die Herstellung electronenmikroskopischer
Mikroskopie, 26, 185-189 p 61

- TAYLOR, E.W. (1965)
The mechanism of colchicine inhibition of mitosis.
Kinetics of inhibition and the binding of H³-colchicine
J.Cell.Biol., 25, 145-160 p 22

- THORPE, R., DELACOURTE, A., AYERS, M., BULLOCK, C and ANDERTON, B.H
(1979-a)
The polypeptides of isolated brain 10 nm filaments and their
association with polymerized tubulin.
Biochem.J., 181, 275-284 p 90, 95, 104, 105, 120,
137, 142, 148

- THORPE, R., DELACOURTE, A and ANDERTON, B.H. (1979-b)
The isolation of brain 10 nm filament polypeptides from urea-
extracts of brain white matter
FEBS Letters, 103, 148-151 p 115, 120

- TIMASHEEF, S.N. (1979)
The in vitro assembly of microtubules from purified brain tubulin.
Trends in Biochem.Sci., 4, 61-65 p 25

- WANG, C., ASAI, D.J and LAZARIDES, E. (1980)
The 68,000-dalton neurofilament-associated polypeptide is a component
of non-neuronal cells and of skeletal myofibrils
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 77, 1541-1545 p 96, 138

- WEISENBERG, R.C., DEERY, W.J and DICKINSON, P.J. (1976)
Nucleotide interactions during polymerization of tubulin
Cell.Motility. Edited by GOLDMEN, R., POLLARD, T and ROSENBAUM, J.
Cold.Spring Harbour Laboratory pp1123-1132 p 26

- WISNIEWSKI, I., SHELANSKI, M.L and TERRY, R.D. (1968)
Effects of mitotic spindle inhibitors on neurotubules and neurofilaments in anterior horn cells
J.Cell.Biol,38,224-229 p 51

- WOLOSEWICK, J.J and PORTER, K.R. (1979)
Microtrabecular lattice of the cytoplasmic ground substance. Artifact or reality
J.Cell.Biol,82,114-139 p 17

- WUERKER, R.B. (1970)
Neurofilaments and glial filaments
Tissue and Cell,2,1-9 p 38

- YEN, S.Y., DAHL, D., SCHACHNER, M and SHELANSKI, M. (1976)
Biochemistry of the filaments of brain
Proc.Natl.Acad.Sci.USA,73,529-533. p40, 104

- ZACKROFF, R.V and GOLDMAN, R.D. (1979)
In vitro assembly of intermediate filaments from baby hamster kidney (BHK-21) cells
Proc.Natl.Acad.Sci.USA,76,6226-6230 p 150

