

UNIVERSITE DU QUEBEC

MEMOIRE

PRESENTE A

L'UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAITRISE EN SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

PAR

EDITH CARON

ETUDE DE L'INTERACTION ENTRE L'ACTINE ET LES
POLYAMINES: SPERMIDINE ET SPERMINE

JUIN 1987

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

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

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

Il n'est pas nécessaire d'espérer pour
entreprendre ni de réussir pour persévérer

Saint-Exupéry

A ma mère Alice et à Luc

RESUME

Les polyamines, substances naturelles polycationiques longtemps considérées comme des catabolites de peu d'importance biologique, joueraient d'après certains auteurs un rôle fondamental au cours de la cytodierèse. La cytodierèse, étape finale de la division cellulaire, est induite par un anneau contractile constitué par l'arrangement parallèle de filaments d'actine. Selon certains auteurs, les polyamines, en particulier la spermidine et la spermine seraient les agents qui provoquent la polymérisation de l'actine de l'anneau contractile ou anneau de clivage. Nous avons donc étudié in vitro les caractéristiques de l'interaction entre les polyamines spermidine et spermine et l'actine, en prenant le Mg^{2+} comme ion de référence.

Nos résultats montrent que des concentrations de spermidine et de spermine, voisines de celles qui existent in vivo, polymérisent l'actine. Les concentrations critiques de polymérisation de l'actine par les polyamines sont du même ordre de grandeur que celle du Mg^{2+} ($\approx 20 \mu g/ml$). L'allure sigmoïdale des courbes de rendement de polymérisation de l'actine par ces trois cations indique une coopérativité positive. Nous avons déterminé que la spermine est plus

efficace pour polymériser l'actine que la spermidine qui est elle-même plus efficace que le Mg^{2+} .

La transformée de Hill nous a permis de calculer, pour chaque agent polymérisant, un nombre minimal de sites de fixation. Nous avons trouvé 3 sites pour la spermidine, 4 sites pour la spermine et 4 sites pour le Mg^{2+} . Les courbes de Hill nous ont permis de différencier 2 classes de sites et de calculer leurs constantes d'affinité. Celles-ci sont, pour chaque agent polymérisant, de l'ordre de $10^4 M^{-1}$ pour les sites de haute affinité et de l'ordre de $10^2 M^{-1}$ pour les sites de faible affinité.

Nous nous sommes particulièrement attachés à caractériser les sites de fixation de la spermidine sur l'actine par la méthode de Scatchard. Nous avons obtenu un nombre total de 8 sites de fixation sur l'actine pour la spermidine dont 3 ont une haute affinité ($K=2,6 \times 10^4 M^{-1}$) et 5 ont une faible affinité ($K=9,2 \times 10^2 M^{-1}$).

Enfin, nous avons montré que la variation des concentrations critiques de polymérisation de l'actine dépend de la nature et de la concentration de l'agent polymérisant.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier les personnes qui m'ont aidée à mener jusqu'à son terme ce projet de recherche:

- Le Docteur Claude Gicquaud, mon directeur de thèse qui m'a permis d'aller effectuer la partie expérimentale de ce travail en France et qui a supervisé la rédaction de ce mémoire.

- Le Docteur Christine Oriol-Audit du Collège de France, pour avoir accepté de diriger mon expérimentation. Grâce à son intérêt et ses connaissances, à sa disponibilité et aux nombreuses discussions pertinentes qu'elle a su initier et entretenir, le Docteur Oriol-Audit a représenté, pour moi, un maître, en plus d'être devenue une amie. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance.

- Le Docteur Raphaël Oriol de l'hôpital Broussais à Paris pour m'avoir procuré certaines facilités de locaux et de matériel. Sa gentillesse, sa bonne humeur et ses discussions intéressantes ont été un support additionnel. Je l'en remercie particulièrement.

- Les Docteurs Hélène-Marie Thérien et Julian Gruda.

TABLE DES MATIERES

Résumé.....	iii
Remerciements.....	v
Table des matières.....	vi
Liste des figures.....	xi
Liste des tableaux.....	xv
Introduction.....	1
Chapitre I.	
1. Généralités sur l'actine.....	1
- L'actine dans les cellules musculaires.....	1
- L'actine dans les cellules non-musculaires.....	1
2. Caractéristiques biochimiques de l'actine.....	2
- L'actine monomérique.....	2
- L'actine polymérique.....	3
3. Polymérisation de l'actine.....	4
- Mécanisme de la formation du filament.....	4
- Croissance et polarisation du filament.....	5
4. Cinétique de la polymérisation de l'actine.....	6

5. Conditions de polymérisation de l'actine <u>in vitro</u>	12
-------------------------------------------------------------------	----

Chapitre II.

1. Généralités sur les polyamines.....	16
2. Biosynthèse des polyamines.....	17
3. Biodégradation des polyamines.....	19
4. Effets biologiques des polyamines.....	21

Chapitre III.

1. Actine, polyamines et cytodièrese.....	25
2. Problématique.....	30

Matériel et Méthodes

1. Liste des produits.....	32
2. Solutions.....	32
3. Préparation de la poudre acétonique.....	33
4. Préparation de l'actine.....	35
5. Contrôle de la pureté de l'actine.....	37
A- Filtration sur tamis moléculaire.....	37
B- Technique d'électrophorèse.....	38
6. Traitement de l'actine avant utilisation.....	38
7. Détermination des rendements de polymérisation de l'actine par la spermidine, la spermine et le $MgCl_2$	39
8. Détermination de la concentration critique de polymérisation de l'actine en présence de	

spermidine, spermine ou de $MgCl_2$	41
9. Détermination du nombre de sites de fixation de la spermidine sur l'actine.....	42
Résultats	
1- Contrôle de la pureté de l'actine.....	44
A- Filtration sur tamis moléculaire.....	44
B- Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS.....	46
2- Détermination de la concentration critique de polymérisation de l'actine en présence de spermidine, de spermine ou de $MgCl_2$	49
3- Rendement de polymérisation de l'actine en fonction de la concentration de spermidine, de spermine ou de $MgCl_2$	50
4- Courbes de l'inverse des rendements de poly- mérisation de l'actine en fonction de l'inverse de la concentration de l'agent de polymérisation.....	58
5- Analyse des résultats de rendement de polymé- risation par la méthode de Hill.....	63

6- Détermination du nombre de sites de fixation sur l'actine pour la spermidine. Etude par équilibre de dialyse. Traitement des résultats selon Scatchard.....	75
7- Rendements de polymérisation de l'actine en fonction de la concentration de spermidine liée à l'actine.....	80
8- Variations des concentrations critiques de polymérisation de l'actine en fonction de la concentration de spermidine, de spermine ou de $MgCl_2$	81
Discussion	
1- Critique de la pureté de l'actine et importance de certains détails techniques.....	87
2- Comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature	
A- Le nombre de sites de fixation sur l'actine.....	88
B- Les classes de sites.....	93
3- Relation entre les différences structurales des polyamines comparativement au Mg^{2+} et leur mode d'interaction avec l'actine.....	94

4- Parallèle entre nos conditions expérimentales et celles qui prévalent <u>in vivo</u> Implications biologiques.....	97
Bibliographie.....	100

LISTE DES FIGURES

Figures

1. Réaction de polymérisation de l'actine
selon le modèle de Wegner.....7
2. Principales diamines et polyamines rencon-
trées dans le matériel biologique.....16
3. Biosynthèse des polyamines dans les
cellules animales.....18
4. Profil d'élution d'une préparation d'actine
après filtration sur Ultrogel AcA 44.....45
5. A-Electrophorèse de fractions obtenues
par filtration sur Ultrogel AcA 44.....48
B-Analyse électrophorétique sur gel de poly-
acrylamide d'échantillons prélevés au
cours de la préparation de l'actine.....48
6. Rendement de polymérisation de l'actine en
fonction de la concentration d'actine.....51

7. Rendement de polymérisation de l'actine en
fonction de la concentration de spermidine.....55
8. Rendement de polymérisation de l'actine en
fonction de la concentration de spermine.....56
9. Rendement de polymérisation de l'actine en
fonction de la concentration de $MgCl_2$57
10. Courbes de l'inverse des rendements de polymé-
risation de l'actine en fonction de l'inverse
de la concentration de spermidine pour
différentes concentrations d'actine.....60
11. Courbes de l'inverse des rendements de polymé-
risation de l'actine en fonction de l'inverse
de la concentration de spermine pour
différentes concentrations d'actine.....61
12. Courbes de l'inverse des rendements de polymé-
risation de l'actine en fonction de l'inverse
de la concentration de $MgCl_2$ pour
différentes concentrations d'actine.....62
13. Courbe de Hill pour l'actine (1,0 mg/ml)
et la spermidine.....67

14.	Courbe de Hill pour l'actine (1,5 mg/ml) et la spermidine.....	68
15.	Courbe de Hill pour l'actine (2,0 mg/ml) et la spermidine.....	69
16.	Courbe de Hill pour l'actine (0,5 mg/ml) et la spermine.....	70
17.	Courbe de Hill pour l'actine (1,0 mg/ml) et la spermine.....	71
18.	Courbe de Hill pour l'actine (0,5 mg/ml) et le $MgCl_2$	72
19.	Courbe de Hill pour l'actine (1,0 mg/ml) et le $MgCl_2$	73
20.	Courbe de Hill pour l'actine (2,0 mg/ml) et le $MgCl_2$	74
21.	Courbe de Scatchard.....	75
22.	Courbe des rendements de polymérisation de l'actine en fonction de la concentra- tion de spermidine liée à l'actine.....	83

23. Rendement de polymérisation en fonction
de la concentration d'actine pour
différentes concentrations de spermidine.....84
24. Rendement de polymérisation en fonction
de la concentration d'actine pour
différentes concentrations de spermine.....85
25. Rendement de polymérisation en fonction
de la concentration d'actine pour
différentes concentrations de MgCl_286

LISTE DES TABLEAUX

Tableaux

1. Concentrations critiques de polymérisation de l'actine par la spermidine, la spermine ou le $MgCl_2$50
2. Valeurs des CF_{50} pour différentes concentrations d'actine polymérisée par la spermidine, la spermine ou le $MgCl_2$54
3. Coefficients de Hill et constantes de forte (K_1) et faible (K_2) affinité de la spermidine, la spermine ou le $MgCl_2$ pour l'actine, déterminés par la méthode de Hill.....66
4. Sites de fixation (n et n') et constantes de liaison (K et K') déterminés par traitement des résultats selon Scatchard.....79
5. Concentrations critiques de polymérisation de l'actine pour différentes concentrations de spermidine, de spermine ou de $MgCl_2$82

INTRODUCTION

Chapitre I

1. Généralités sur l'actine

L'actine est présente dans toutes les cellules eucaryotes(45). En 1942, Straub(82) l'identifie comme l'une des deux protéines majeures du muscle squelettique.

L'actine est une protéine particulièrement intéressante par sa propriété d'exister sous deux formes différentes: la forme monomérique ou actine G et la forme polymérique ou actine F.

Dans les cellules musculaires, l'actine n'existe qu'à l'état de filaments (actine F) incorporés dans le sarcomère, unité contractile du muscle strié. Lors de la contraction, ces filaments interagissent avec une autre protéine, la myosine, provoquant ainsi le raccourcissement du sarcomère.

Dans les cellules non-musculaires, où elle peut représenter jusqu'à 20% du contenu protéique cellulaire total, on retrouve l'actine sous les deux formes, G et F.

- L'actine G est, le plus souvent, liée à une autre protéine; la profiline qui empêche l'actine de polymériser. Le complexe de profilactine ainsi formé serait une forme de stockage de monomères d'actine. Il existe aussi une certaine quantité d'actine sous forme de monomères libres.
- L'actine F, polymère de l'actine G, se présente dans la cellule sous forme de filaments de 7 nm de diamètre. Ces filaments peuvent être libres ou organisés en superstructures. Dans la région où la cellule est étirée, ils forment en général des faisceaux ou "bundles" constitués de filaments parallèles reliés entre eux par des interactions latérales. Dans la zone proche de la membrane plasmique, ils forment quelquefois un feuillage dans lequel des réseaux tridimensionnels peuvent être mis en évidence. Ces réseaux sont formés de filaments d'actine liés entre eux par des "actin-binding proteins" ou protéines de pontage.

2. Caractéristiques biochimiques de l'actine

L'actine monomérique (G) est une protéine globulaire plus ou moins sphérique de 55 Å de diamètre constituée d'une seule chaîne d'acides aminés. Son poids moléculaire est de 42000 daltons. Chaque unité d'actine G contient une molécule

de nucléotide, habituellement l'ATP (88) et un ion Ca^{2+} fixé à un site spécifique (50).

L'actine polymérique possède une structure en double hélice. Le filament est formé par l'association de monomères, qui peuvent encore posséder leur nucléotide sous forme d'ATP (52), mais le plus souvent celui-ci a été hydrolysé en ADP au cours de la polymérisation (18).

Les deux extrémités du filament d'actine ne sont pas identiques. Le filament d'actine (actine F) possède donc une polarité. Celle-ci peut être visualisée en microscopie électronique par le marquage du filament avec le fragment lourd de la myosine (heavy meromyosin ou HMM). En effet, les molécules de méromyosine lourde se lient selon un certain angle par rapport à l'axe de la double hélice. Le filament d'actine décoré à l'HMM forme alors une structure dite en arête de poisson qui permet de définir les deux extrémités du filament: l'une dite "pointed end" et l'autre "barbed end" (39). Cette polarité résulte de l'orientation différente des monomères à chaque extrémité du filament d'actine. Nous allons rapidement décrire les étapes de la polymérisation de l'actine ainsi que les variations physico-chimiques qui les conditionnent.

3. Polymérisation de l'actine

- Mécanisme de la formation du filament

L'actine G et l'actine F sont en équilibre dynamique. Le filament d'actine F résulte de l'addition séquentielle et progressive de monomères d'actine qui se produit dans des conditions particulières de force ionique.

Le phénomène de polymérisation a été étudié en détail par Oosawa et ses collaborateurs (55) qui ont démontré que l'association de monomères d'actine est une réaction de condensation-polymérisation.

La première phase de cette réaction est la nucléation, étape lente au cours de laquelle il y a condensation de deux, trois ou quatre monomères pour former des nuclei. La deuxième phase est l'élongation; étape rapide au cours de laquelle d'autres monomères s'additionnent aux nuclei pour former des filaments d'actine.

La vitesse de formation des nuclei est l'étape limitante de la réaction de polymérisation. Lorsque la nucléation est terminée, la vitesse de polymérisation, c'est-à-dire la vitesse à laquelle la concentration de l'actine monomérique diminue, sera la vitesse d'élongation du filament (92, 97). Tous les polymères d'actine ayant la taille du nucleus vont s'allonger pour former des filaments. La concentration de

l'actine monomérique diminue alors jusqu'à une concentration au-dessous de laquelle il n'y a plus de polymérisation. Cette concentration seuil est appelée la concentration critique de polymérisation de l'actine.

- Croissance et polarisation du filament

Au début du processus de polymérisation, lorsque les nuclei sont formés et que la concentration d'actine monomérique est très élevée, il y a addition de monomères à chacune des deux extrémités du filament mais à des vitesses différentes (100). Les monomères s'ajoutent donc plus rapidement à une extrémité qu'à l'autre. L'extrémité de polymérisation rapide correspond au "barbed end" et l'extrémité de polymérisation lente correspond au "pointed end".

L'addition de monomères va entraîner l'élongation du filament et par conséquent la diminution de la concentration d'actine monomérique du milieu. Le filament formé étant polarisé, chaque extrémité de ce dernier est caractérisée par une concentration critique qui lui est propre.

L'élongation du filament va entraîner la diminution de la concentration d'actine monomérique du milieu jusqu'à une valeur intermédiaire située entre les concentrations critiques de chaque extrémité du filament. Ainsi, lorsque la concentration d'actine monomérique du milieu atteint cette

valeur intermédiaire, il y a, selon Wegner (95) association de monomères à l'extrémité "barbed end" et dissociation simultanée à l'extrémité "pointed end". L'extrémité "barbed end" est alors appelée extrémité de "nette polymérisation" et l'extrémité "pointed end" est appelée extrémité de "nette dépolymérisation".

Il y a donc une direction préférentielle de croissance du filament, dans ces conditions. Selon Wegner, ce processus de polymérisation orientée dite "head to tail" est rendue possible par l'hydrolyse irréversible de l'ATP de chaque monomère qui s'additionne à l'extrémité polymérisante (95).

Lorsque la vitesse de polymérisation de l'extrémité de nette polymérisation atteint la vitesse de dépolymérisation de l'extrémité de nette dépolymérisation, la longueur du filament demeure constante; c'est le "treadmilling".

Nous allons maintenant exposer les équations cinétiques, tirées du modèle de Wegner (95), qui correspondent au processus de polymérisation que nous venons de décrire.

4. Cinétique de la polymérisation de l'actine

La représentation schématique du modèle proposé par Wegner est illustrée par la figure suivante:

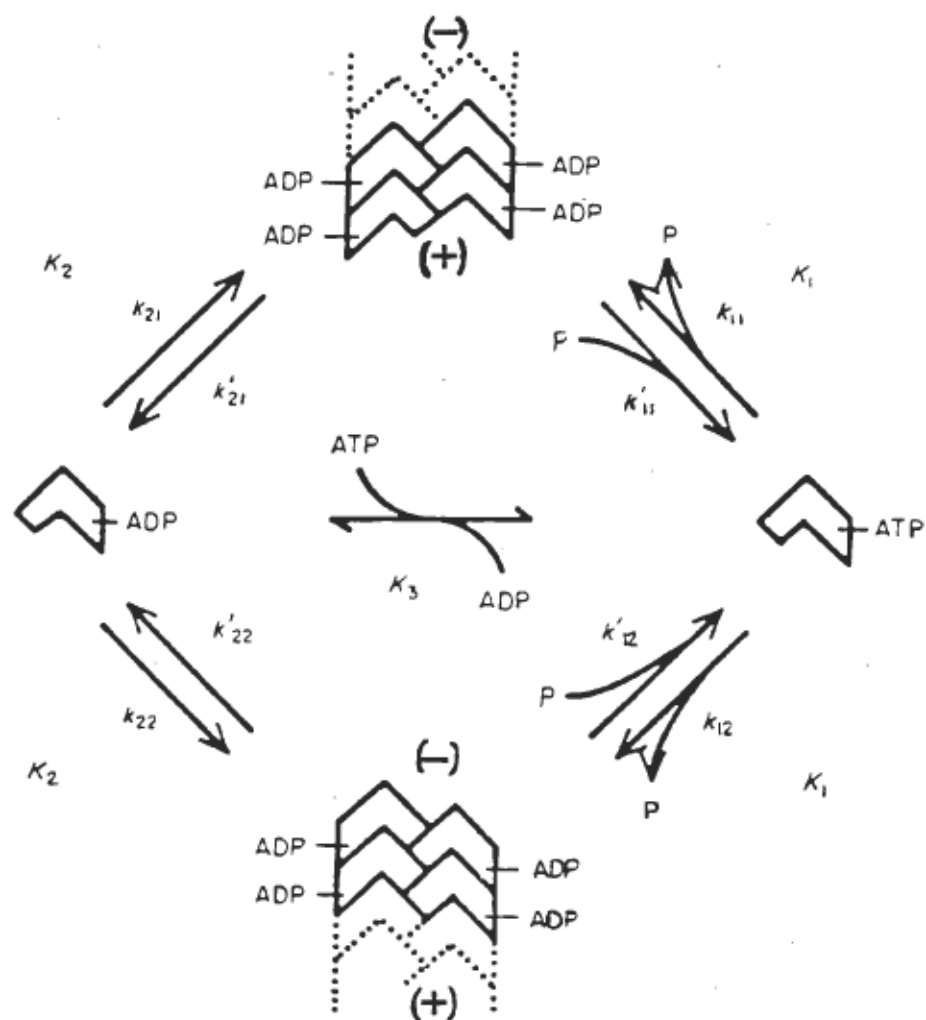


Figure 1. Réaction de polymérisation de l'actine selon le modèle de Wegner (95)

Chaque chevron représente un monomère d'actine avec ADP ou ATP fixé. Le signe $(-)$ correspond à l'extrémité dite de nette dépolymérisation ("pointed end") et le signe $(+)$ correspond à l'extrémité dite de nette polymérisation ("barbed end") du filament. P représente le phosphate inorganique.

Les constantes d'équilibre décrivent l'association au filament d'un monomère avec ATP (K_1) ou ADP (K_2) fixé et sont reliées de cette façon :

$$K_1 = \frac{k_{11}}{k'_{11}} = \frac{k_{12}}{k'_{12}} \quad (I)$$

$$K_2 = \frac{k_{21}}{k'_{21}} = \frac{k_{22}}{k'_{22}} \quad (II)$$

La vitesse d'élongation du filament est égale au nombre de monomères (g-ATP, g-ADP) qui s'associent à l'extrémité "barbed end" et à l'extrémité "pointed end" du filament par unité de temps, ce qui est donné par les équations suivantes :

$$\frac{dn_1}{dt} = k_{11} \cdot [g-ATP] - k'_{11} \cdot [P] + k_{21} \cdot [g-ADP] - k'_{21} \quad (III)$$

$$\frac{dn_2}{dt} = k_{12} \cdot [g-ATP] - k'_{12} \cdot [P] + k_{22} \cdot [g-ADP] - k'_{22} \quad (IV)$$

où n correspond au nombre de monomères qui se fixent à l'extrémité "barbed end" (n_1) et à l'extrémité "pointed end" (n_2), $[g-ATP]$ et $[g-ADP]$ représentent les concentrations d'actine monomérique avec ATP et ADP fixé et $[P]$ représente la concentration de phosphate inorganique.

L'échange des nucléotides est une réaction très rapide (49, 94). Par conséquent, les concentrations de monomères-ATP et monomères-ADP sont en équilibre, d'où:

$$\frac{[g-ATP] [ADP]}{[g-ADP] [ATP]} = K_3 \quad (V)$$

La combinaison des équations (III, IV, V) permet d'exprimer la vitesse d'élongation à chaque extrémité du filament de cette façon:

$$\frac{dn_1}{dt} = k_{11} \cdot ([g-ATP] - \frac{[P]}{K_1}) + k_{21} \cdot ([g-ATP] \cdot \frac{[ADP]}{[ATP] K_3} - 1/K_2) \quad (VI)$$

$$\frac{dn_2}{dt} = k_{12} \cdot ([g-ATP] - \frac{[P]}{K_1}) + k_{22} \cdot ([g-ATP] \cdot \frac{[ADP]}{[ATP] K_3} - 1/K_2) \quad (VII)$$

Etant donné que le monomère libéré par dissociation du filament contient un nucléoside diphosphorylé (ADP) et qu'à l'état libre ce monomère possède une affinité cent fois plus grande pour l'ATP, il se produit très rapidement un échange de nucléotides au sein du monomère.

Par conséquent, l'association de monomères-ADP est négligeable. Le terme $[g-ADP]$ tend donc à être nul et la

constante d'équilibre K_3 tend vers l'infini. De plus, l'équilibre régi par la constante K_1 étant complètement déplacé vers l'addition de monomères-ATP, k'_{11} est négligeable et la constante K_1 tend vers l'infini.

Il est alors possible de simplifier les équations (VI) et (VII) sous cette forme:

$$\frac{dn_1}{dt} = k_{11} \cdot [g-ATP] - \frac{k_{21}}{K_2} = k_{11} \cdot c_1 - k'_{21} \quad (\text{VIII})$$

$$\frac{dn_2}{dt} = k_{12} \cdot [g-ATP] - \frac{k_{22}}{K_2} = k_{12} \cdot c_1 - k'_{22} \quad (\text{IX})$$

On définit $c_1 = [g-ATP]$.

A l'équilibre, la longueur du filament reste constante et il s'en suit que le nombre de monomères additionnés à l'extrémité de nette polymérisation est équivalent au nombre de monomères qui sont libérés à l'extrémité de nette dépolymérisation.

On obtient donc

$$\frac{dn_1}{dt} = \frac{dn_2}{dt} = k_{11} c_1 - k'_{21} = k_{12} c_1 - k'_{22} \quad (X)$$

On tire de cette équation:

$$k_{11} c_1 - k'_{21} - k'_{12} c_1 + k'_{22} = 0$$

$$c_1 (k_{11} - k'_{12}) = k'_{21} - k'_{22}$$

$$c_1 = \frac{k'_{21} - k'_{22}}{k_{11} - k'_{12}} = \bar{c}_1$$

\bar{c}_1 est défini comme la concentration critique c'est-à-dire la concentration d'actine G en-dessous de laquelle il ne se produit plus de polymérisation nette de l'actine. Etant donné la polarisation du filament, chaque extrémité a une concentration critique différente soient,

$$c_1^+ = \frac{k'_{22}}{k_{12}} \qquad c_1^- = \frac{k'_{21}}{k'_{11}}$$

où c_1^+ correspond à la concentration critique de l'actine monomérique à l'extrémité polymérisante ou "barbed end" et c_1^- correspond à la concentration critique de l'actine monomérique à l'extrémité dépolymérisante ou "pointed end".

Au début du processus de polymérisation de l'actine, la concentration d'actine monomérique étant supérieure à c_1^+ et c_1^- , il y a polymérisation aux deux extrémités du filament (100). Avec la diminution de la concentration d'actine monomérique du milieu (\bar{c}_1), l'état suivant est atteint:

$$c_1^+ < \bar{c}_1 < c_1^-$$

Il en résulte que la vitesse d'élongation peut être positive à une extrémité du filament d'où élongation et négative à l'autre extrémité, d'où raccourcissement. C'est la polymérisation dite "head to tail polymerization".

A la fin de l'élongation, un état d'équilibre dynamique ("steady state") est atteint. A ce stade, l'addition de sous-unités d'actine G à l'extrémité polymérisante est égale à la dissociation de monomères à l'extrémité dépolymérisante. Ce phénomène est connu sous le terme "treadmilling" (96).

5. Conditions de polymérisation de l'actine in vitro

Dans une solution à faible force ionique, l'actine est sous forme monomérique. L'augmentation de la force ionique, par addition de sels, induit la polymérisation de l'actine, soit le passage de la forme globulaire (actine G) à la forme filamenteuse (actine F).

Plusieurs études suggèrent que la polymérisation résulte de la réduction de la charge négative nette du monomère d'actine suite à son interaction avec des cations (3, 6, 82, 85). De plus, il est établi que les cations divalents (par exemple, le Mg^{2+}) sont plus efficaces que les cations monovalents (par exemple, le K^+ ou le Na^+) pour polymériser l'actine (3, 43, 48, 50). En effet, in vitro, la polymérisation de l'actine requiert une concentration de l'ordre du millimolaire de Mg^{2+} , alors qu'elle nécessite des concentrations décimolaires de K^+ ou Na^+ . Ces caractéristiques cationiques sont la conséquence d'affinités différentes du monomère d'actine pour ces ions.

Il a été établi que l'actine G possède une classe de sites à haute affinité ($K_A = 10^5 M^{-1}$) pour les cations divalents et environ cinq sites de moindre affinité pour les cations divalents et monovalents caractérisés par une constante d'association de l'ordre de $10^3 M^{-1}$ (43, 50). Selon Barany et coll. (7), l'actine monomérique polymérise lorsque quatre de ces sites sont occupés et l'équipe de Martonosi (50) a montré l'existence d'une corrélation entre le degré de polymérisation de l'actine et le nombre de moles de Mg^{2+} liées aux sites de moindre affinité.

A des concentrations de cations divalents de l'ordre du millimolaire ou monovalents de l'ordre du décimolaire, il se

forme des filaments d'actine séparés les uns des autres. Ces filaments peuvent s'associer et former des structures plus complexes dans certaines conditions ioniques. Ainsi, en présence de hautes concentrations d'ions divalents ($[Mg^{2+}]$ ou $[Ca^{2+}] > 5mM$), il apparaît des structures paracristallines d'actine. Une classe de sites de fixation de faible affinité (K_A de l'ordre de $10^2 M^{-1}$) serait impliquée dans la formation de ces paracristaux (85).

Cependant, les cations mono et divalents classiquement utilisés (Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Na^+) ne sont pas les seuls agents susceptibles de faire polymériser l'actine in vitro.

En travaillant avec des cations de la série des lanthanides, Dos Remedios et coll. ont montré que ces cations, qui n'existent pas dans les cellules, polymérisent aussi l'actine in vitro (8, 9, 15).

La phalloïdine, qui est un peptide extrait du champignon Amanita phalloides, a aussi la propriété de faire polymériser l'actine in vitro. Cependant, la phalloïdine n'intervient pas dans le contrôle et la régulation de la polymérisation de l'actine in vivo (98).

Récemment, Oriol-Audit a montré que les polyamines peuvent aussi induire la polymérisation de l'actine in vitro

(56). Cette découverte présente un intérêt particulier car les polyamines sont des substances biologiques fabriquées par les cellules et il se pourrait qu'elles interviennent au niveau de la régulation de la polymérisation de l'actine in vivo. C'est donc vers cet aspect de recherche que nous avons orienté notre travail. Avant d'aborder les résultats, nous allons tout d'abord parler des polyamines.

Chapitre II

1. Généralités sur les polyamines

Les polyamines sont des substances polycationiques très répandues chez tous les organismes vivants. Les principales polyamines que l'on trouve chez les êtres vivants sont représentées à la figure 2.

1,3-diaminopropane	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$
1,4-diaminobutane(putrescine)	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
1,5-diaminopentane(cadavérine)	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$
spermidine	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
spermine	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$

Figure 2. Principales diamines et polyamines rencontrées dans le matériel biologique.

Les polyamines les plus communes, chez les eucaryotes, sont la spermidine, la spermine et la putrescine. Chez les procaryotes, ces polyamines sont présentes, à l'exception de la spermine.

2. Biosynthèse des polyamines

La synthèse des polyamines chez les animaux (40, 64) et chez les bactéries (88) implique comme première réaction la décarboxylation de l'ornithine, ce qui produit la putrescine. Cette réaction est catalysée par l'ornithine décarboxylase, enzyme clef de cette voie métabolique (40, 41, 89). Parallèlement, il se produit une décarboxylation de la S-adénosylméthionine (S.A.M.). La molécule ainsi obtenue par l'action de la S.A.M. décarboxylase sert de "donneur" du groupement aminopropyl qui, par addition à la putrescine produit la spermidine. La spermine est un composé qui a subi l'addition de deux groupes aminopropyl.

La figure 3 montre une représentation schématique de la biosynthèse des polyamines dans la cellule animale. Il faut noter que la S.A.M. décarboxylase est fortement stimulée par la putrescine, d'une façon moins importante par la spermidine (63, 64) et est inhibée par la S.A.M. décarboxylée. De plus, lors de la synthèse de la spermidine, aucune synthèse simultanée de spermine n'est détectable (42).

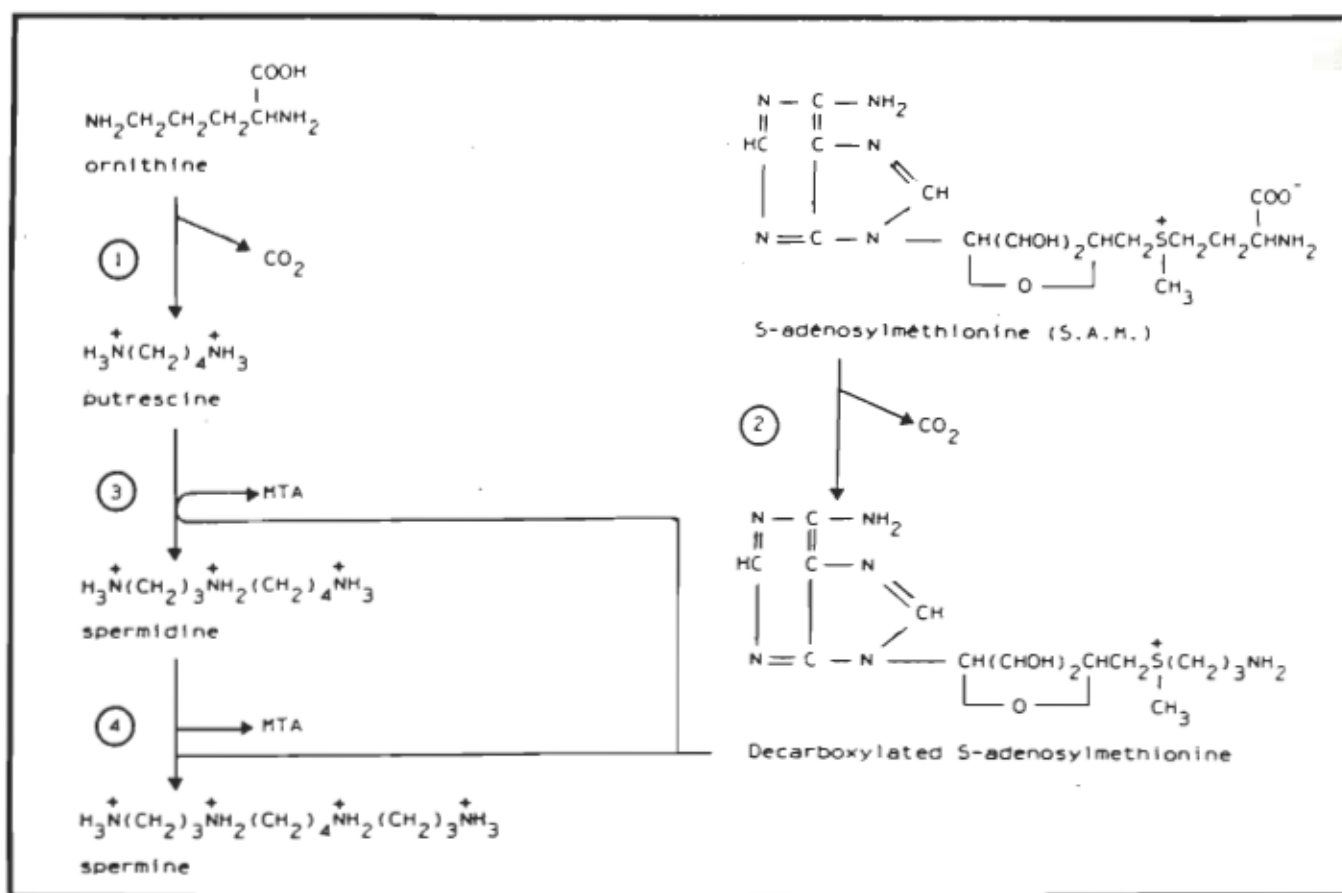
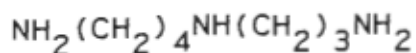


Figure 3. Biosynthèse des polyamines dans les cellules animales selon Tabor et Tabor (89).

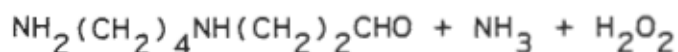
- (1). ornithine décarboxylase
- (2). S-adénosylméthionine décarboxylase
- (3). spermidine synthétase
- (4). spermine synthétase

MTA: méthylthioadénosine

La dégradation de la spermine et de la spermidine est réalisée selon le même mécanisme de désamination oxydative par une polyamine oxydase selon les réactions suivantes:

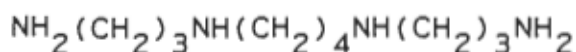


spermidine

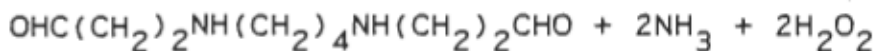


N-(4-aminobutyl)-3-

aminopropionaldéhyde



spermine



N,N'-bis(3-propionaldéhyde)-

1,4-diaminobutane

Cette enzyme a été mise en évidence dans le sérum de plusieurs espèces de vertébrés (101). Enfin, les aldéhydes formés lors de la biodégradation des polyamines étant instables, ils pourraient se condenser ou être transformés en acroléine par β -élimination (91).

4. Effets biologiques des polyamines

Jusqu'au milieu des années soixante, les polyamines identifiées chez les organismes étaient considérées comme des catabolites provenant de la dégradation d'autres molécules plus complexes mais inconnues. Puis, un certain nombre d'effets biologiques ont été mis en évidence sur des cellules en culture ou dans des systèmes biochimiques in vitro. Une grande partie de ces effets est basée sur les propriétés cationiques des polyamines vis-à-vis de constituants cellulaires anioniques comme les phospholipides ou les acides nucléiques.

L'étude de l'interaction polyamines-phospholipides a montré que les polyamines pouvaient stabiliser les membranes cellulaires (87) ou en modifier la fluidité (79). Les polyamines peuvent également modifier les propriétés électrocinétiques des globules rouges (12).

L'interaction polyamines-acides nucléiques a été mise en évidence par Tabor et Tabor (91) puis Cohen et coll. (13) qui ont montré l'existence d'une relation entre la biosynthèse des polyamines et celle de l'ARN chez les mammifères. Plus précisément, Dykstra et Herbst (16) ont obtenu une corrélation positive entre la synthèse de la spermidine et celle de l'ARN dans des hépatocytes de rat. Ces auteurs ont également montré un rôle des polyamines dans la régulation de

la synthèse de l'ARN par des études portant sur un bactériophage T (13, 16).

L'interaction entre les polyamines et l'ADN a, elle aussi, été très étudiée. Ainsi, un certain nombre d'effets ont été identifiés comme la stimulation de la synthèse de l'ADN (5, 13, 54, 66, 71, 88), l'inhibition de la méthylation de l'ADN (14), la stabilisation de la conformation compacte de l'ADN (20) et la condensation des chromosomes (67).

D'autre part, certains effets des polyamines sur la synthèse des protéines ont été mis en évidence par des études réalisées sur des systèmes in vitro. La stimulation exercée par ces polycations (38, 89) sur la synthèse protéique a révélé l'importance des polyamines dans le maintien de l'intégrité des ribosomes par stabilisation des sous-unités 30S et 50S (1), du ribosome 70S (2) et des polysomes (21, 93). Un effet inhibiteur de l'activation des protéines kinases AMP cyclique dépendantes a été observé (72) ainsi que la stimulation de réactions enzymatiques (13) et l'activation de certains gènes au début du développement embryonnaire (17).

D'autres résultats, particulièrement intéressants, ont souligné une augmentation de la synthèse des polyamines à la suite de l'application de stimuli induisant la prolifération

cellulaire in vitro et in vivo. Cet accroissement de la synthèse des polyamines, en particulier putrescine, spermidine et spermine, est la conséquence de l'augmentation de l'activité de la L-ornithine décarboxylase, enzyme qui catalyse la synthèse de la putrescine. Ainsi, on a constaté l'augmentation de l'activité de la L-ornithine décarboxylase de systèmes cellulaires à croissance rapide tels que les cellules d'hépatome en culture (33, 51), les cellules rénales de jeunes hamsters (34), les cellules hépatiques en régénération après hépatectomie partielle (36) ou encore chez divers organes cibles après traitements hormonaux (60, 80).

Pour illustrer l'ensemble du phénomène, résumons les événements observés chez un système cellulaire à croissance rapide, par exemple, chez les cellules hépatiques en régénération. Vingt-quatre heures après l'hépatectomie partielle, l'activité de L-ornithine décarboxylase des cellules hépatiques est augmentée de 25 fois (71). L'augmentation de l'activité de cette enzyme survient parallèlement à l'augmentation de la synthèse de l'ARN et précède de plusieurs heures la synthèse maximale de l'ADN (11).

Vu la distribution générale des polyamines dans le matériel biologique, compte tenu que les cellules à croissance rapide des tissus animaux présentent toujours un taux très élevé de polyamines associé à l'augmentation de

l'activité de la L-ornithine décarboxylase (25) et étant donné que l'utilisation d'inhibiteurs d'enzymes nécessaires à la biosynthèse de ces amines résulte en un blocage de la synthèse de l'ADN et de la division cellulaire (12, 28), on considère de plus en plus les polyamines putrescine, spermidine et spermine comme étant essentielles à la croissance et à la prolifération cellulaire (27).

Cependant, tous les effets exercés par les polyamines au niveau cellulaire n'ont pu, dans l'état actuel des connaissances dans ce domaine, être reliés à un rôle particulier ou spécifique et les mécanismes d'action de ces molécules sont encore méconnus.

Chapitre III

1. Actine, polyamines et cytodiérèse

Au cours de la mitose, plus précisément à la fin de l'anaphase, il y a formation à l'intérieur de la cellule d'une structure transitoire appelée anneau contractile. Cette structure est l'agent responsable du clivage mécanique du cytoplasme de la cellule-mère en deux cellules filles, ou cytodiérèse, chez les cellules animales (76).

D'après les travaux de Schroeder (77) et Rappaport (68) portant sur des cellules en culture et des oeufs fertilisés, l'anneau contractile serait en quelque sorte une manifestation spécialisée du cortex cellulaire c'est-à-dire un arrangement de microfilaments associés à la membrane plasmique. Le marquage à l'HMM (heavy meromyosin) a permis d'identifier de nombreux filaments d'actine présents dans cette structure contractile (31, 75) et par microscopie en immunofluorescence, on a identifié, en plus de l'actine, dans la région de la cellule en cytodiérèse, la myosine, la tropomyosine et l'alpha-actinine (14, 22, 23).

L'anneau contractile exerce une constriction annulaire sur la cellule en division mais son mécanisme d'action précis demeure inconnu. Il s'agit d'une structure qui s'assemble et se désassemble rapidement. Selon Schroeder (77), cette structure conserve une largeur et une épaisseur constante

tout au long du clivage contrairement à son volume qui présente des variations. En effet, Schroeder (77) a démontré que le volume de l'anneau contractile diminue considérablement durant la dernière moitié de l'activité de clivage ce qui suggère un mécanisme de contraction relié à une destruction des filaments plutôt qu'aux glissements de ces filaments les uns sur les autres comme cela se produit lors de la contraction du muscle strié.

Etant donné qu'à la télophase les filaments d'actine sont principalement localisés au sillon de clivage déterminé par l'anneau contractile (73), que la biosynthèse des polyamines atteint une activité maximale à deux moments du cycle cellulaire, soit au début de la phase S et avant la division cellulaire (29, 30), Oriol-Audit (58) a proposé les polyamines comme inducteurs possibles de la cytodierèse, par l'intermédiaire de leurs interactions avec l'actine.

Oriol-Audit a étudié l'action des polyamines sur l'actine du muscle squelettique de lapin, in vitro (56). Ses résultats montrent qu'aux concentrations physiologiques, les polyamines induisent la polymérisation de l'actine en filaments et qu'il existe une relation linéaire entre le degré de polymérisation de l'actine et la longueur de la chaîne de la polyamine. La spermidine et la spermine se sont avérées plus efficaces pour polymériser l'actine que les

autres polyamines.

Les polymères d'actine induits par les polyamines ont les mêmes propriétés que ceux induits par les sels: ils activent la Mg^{2+} -ATPase de la myosine de muscle, leur formation s'accompagne d'une augmentation de la viscosité spécifique de la solution d'actine et la transformation par la spermidine de l'actine monomérique en actine filamenteuse, suivie par dichroïsme circulaire, révèle un spectre dichroïque au profil similaire à celui des polymères induits par le KCl et le $MgCl_2$ (56).

Au microscope électronique, les filaments induits par les polyamines possèdent la structure en double hélice typique de l'actine F. Les filaments-spermidine sont dispersés tandis que les filaments-spermine ont tendance à se disposer parallèlement et s'associer latéralement en faisceaux.

La polymérisation de l'actine par les polyamines est, comme dans le cas des ions, réversible. En effet, la F actine-polyamines peut être dépolymérisée par dialyse en présence d'ATP. Le degré de dépolymérisation atteint 75% dans le cas de la F actine-spermidine. Ce résultat est comparable à celui obtenu pour la F actine polymérisée par 0,1 M KCl. Cependant, la dépolymérisation de la

F-actine-spermine n'atteint que 60%. Selon Oriol-Audit (56), la spermine aurait la propriété de former des ponts entre les filaments ce qui expliquerait le degré moindre de dépolymérisation des polymères-spermine ainsi que l'arrangement parallèle des filaments-spermine visualisé par microscopie électronique.

L'induction de la polymérisation de l'actine par les polyamines résulterait, selon Oriol-Audit (56), d'un effet spécifique des polyamines sur l'actine et non d'un simple effet dû à l'augmentation de la force ionique puisque de très faibles concentrations (0,2-0,5 mM) suffisent à déclencher le processus de polymérisation.

Par la suite, Oriol-Audit (57) a établi que les polyamines ont les mêmes effets sur l'actine cytoplasmique que ceux observés sur l'actine musculaire.

La cytodierèse étant inhibée par la cytochalasine B, Oriol-Audit (58) a aussi vérifié l'effet de la cytochalasine B sur les filaments d'actine induits par les polyamines in vitro. Les résultats indiquent que les filaments d'actine induits par la spermidine à partir de l'actine-G, ou encore de l'actine-F sont désorganisés par la cytochalasine B.

In vivo, l'étude menée par Sunkara et coll. (86) sur

divers types de cellules de mammifères en culture indique que l'inhibition de la synthèse des polyamines inhibe la cytodierèse et conduit à la formation de cellules binucléées. La diminution de la concentration intracellulaire de polyamines amène la désorganisation des microfilaments d'actine dans les cellules binucléées et ces effets sont renversés par un apport exogène de polyamines.

D'autre part, Gawlitta et Stockem (24) ont montré que la micro-injection de spermine induit la cytodierèse chez Amoeba proteus. Le sillon de clivage apparaît 30 à 60 secondes après l'injection et la cytodierèse est terminée dans les 4 à 10 minutes qui suivent.

Par turbidimétrie, Oriol-Audit (59) démontre que la spermine et la spermidine peuvent s'associer à la F actine et que cette association se réalise en moins de 30 secondes ce qui est compatible avec le temps nécessaire à la formation de l'anneau contractile chez Amoeba proteus (24).

Suite à la micro-injection de spermine ou de spermidine dans des oeufs non fertilisés de Xenopus laevis, Grant et coll. (26) ont observé qu'une fragmentation analogue à la cytodierèse survient 45 minutes plus tard alors que la première division se produit après 120 minutes lorsque l'activation est provoquée par piqure des oeufs.

Les résultats des diverses expériences in vitro et in vivo supportent l'hypothèse d'Oriol-Audit selon laquelle l'induction de la polymérisation de l'actine de l'anneau de clivage serait provoquée par les polyamines (58).

2. Problématique

Oriol-Audit a d'abord montré que des concentrations physiologiques de polyamines induisent la polymérisation de l'actine in vitro (56). Plusieurs aspects de la polymérisation de l'actine par les polyamines in vitro sont maintenant connus grâce à ses travaux (57, 58, 59).

Le but de notre travail est de déterminer certaines caractéristiques de l'interaction entre l'actine et les polyamines spermidine et spermine et de les comparer avec celles d'un ion de référence: le cation Mg^{2+} .

Au terme de cette étude, nous espérons être en mesure de répondre à certaines interrogations, telles que: Quelles sont les concentrations critiques de polymérisation de l'actine par la spermidine et la spermine? Ces valeurs sont-elles comparables avec celle du Mg^{2+} ? L'interaction entre l'actine et chacun de ces agents polymérisants se fait-elle selon le même type de cinétique? Quelle est l'efficacité de chacun de ces agents à polymériser l'actine? Le nombre de sites de fixation de la spermidine et de la spermine sur l'actine est-il comparable au nombre de sites déterminé pour le Mg^{2+} ?

La connaissance des paramètres d'interaction entre les polyamines et l'actine nous permettra d'évaluer s'il est possible qu'une telle interaction se produise dans les conditions qui prévalent in vivo.

MATERIEL ET METHODES

1- Liste des produits chimiques

- spermidine trihydrochlorhydrique

- spermine tétrahydrochlorhydrique

Ces polyamines proviennent de Sigma Chemical Co.

(St-Louis, Mo.)

- $MgCl_2$

Le chlorure de magnésium provient de la compagnie

Merk

- spermidine ^{14}C trihydrochlorhydrique

activité spécifique 90 mCi/mM

Ce produit est une gracieuseté du Commissariat à

l'Energie Atomique, Saclay, France

2- Solutions

- solutions de polyamines

La spermidine et la spermine sont dissoutes dans de

l'eau bidistillée et le pH est ajusté à 7.5 à l'aide

d'une solution molaire de Tris (hydroxyméthyl)-

aminométhane

- Tampon-G: Tris 2mM

CaCl_2 0,1 mM

ATP 0,3 mM

NaN_3 0,2 mM

pH=8,0 à 25°C

3- Préparation de la poudre acétonique

La poudre acétonique est préparée, à partir de muscles squelettiques de lapin, selon la méthode décrite par Seraydarian et coll. (78). Dans le but d'augmenter le rendement de ce procédé, quelques modifications mineures ont été apportées.

Méthode

Préalablement à l'exsanguination, le lapin est endormi par injection intra-péritonéale de 100 mg de pentobarbital sodique. Les muscles squelettiques du dos sont excisés, refroidis sur glace et passés dans un hachoir refroidi à 4°C.

La myosine est extraite par 3 volumes (1 volume=1 quantité de muscles excisés en ml) de solution Guba-Straub (KCl 0,3M, K_2HPO_4 - KH_2PO_4 0,15M, pH 6,5) à 4°C. L'extraction est faite avec agitation occasionnelle pendant 10 minutes à froid. Le mélange est centrifugé à 1500g x 15 minutes. Le surnageant, riche en myosine, peut être conservé si on désire extraire

cette protéine.

Le résidu est réparti en deux portions traitées chacune par 3 volumes de NaHCO_3 0,4% à 4°C pendant 10 minutes avec agitation occasionnelle. Le mélange résultant est homogénéisé au mixeur électrique et la suspension est centrifugée à 1500g x 15 minutes.

Le résidu, qui contient l'actine, est repris avec 1 volume de solution (NaHCO_3 - Na_2CO_3 0,05M, pH approximatif de 10) pendant 10 minutes avec agitation occasionnelle à froid. A ce mélange, 10 volumes de CaCl_2 $5 \times 10^{-4}\text{M}$ sont ajoutés et l'ensemble est maintenu sous agitation occasionnelle pendant 30 minutes.

Au cours de la prochaine étape, le mélange est filtré sur gaze et le résidu est lavé à 4 reprises par 8 litres d'acétone refroidis à -20°C. Chaque lavage est suivi d'une filtration.

La poudre acétonique ainsi obtenue est effritée et placée au dessicateur pour être séchée. Finalement, la poudre acétonique est congelée jusqu'à utilisation.

Conservée à -20°C, la poudre acétonique est stable pour plusieurs mois. Le rendement (g de poudre acétonique / g de

muscles squelettiques) obtenu par cette méthode dans notre laboratoire varie entre 9 et 14%.

4- Préparation de l'actine

L'actine musculaire est extraite de la poudre acétonique. La méthode utilisée dans notre laboratoire est celle de Pardee et Spudich (61); cependant, le protocole a été légèrement modifié afin d'augmenter le rendement de cette technique.

Méthode

La première étape consiste à extraire les protéines de la poudre acétonique.

Six grammes de poudre acétonique sont mélangés pendant 30 minutes à froid dans 180 ml de tampon d'extraction (Tris 2 mM, CaCl_2 0,1 mM, ATP 1 mM, NaN_3 0,2 mM, β -mercaptoéthanol 0,5 mM, pH 8,0 à 25°C). La faible force ionique, l'ATP de ce tampon et le froid permettent l'extraction de l'actine sous sa forme monomérique. La suspension est ensuite centrifugée à 16 000 g \times 30 minutes et le surnageant est filtré sur Millipore 0,45 μm .

La concentration des protéines du filtrat est évaluée grossièrement par lecture au spectrophotomètre à 290 nm - 320 nm.

Nous utilisons le coefficient d'extinction de l'actine monomérique pure $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 6,3$ à 290 nm (37) pour évaluer la quantité de protéines, incluant l'actine, du surnageant.

La seconde étape consiste à purifier l'actine par des cycles de polymérisation-dépolymérisation.

La solution d'actine G est amenée à $[\text{KCl}]$ 0,1 M, $[\text{MgCl}_2]$ 2,5 mM et nous laissons reposer la solution durant 60 minutes à température ambiante pour permettre la polymérisation de l'actine. L'actine F est recueillie par ultracentrifugation à 4°C à 90 000 g x 150 minutes. Le culot, mis en suspension dans du tampon-G froid, est placé en dialyse pendant 48 heures à la chambre froide contre 10 volumes du même tampon pour dépolymériser l'actine. L'actine dépolymérisée est centrifugée à 90 000 g x 150 minutes à 4°C. L'actine se trouve alors dans le surnageant.

Le deuxième cycle de polymérisation-dépolymérisation débute de manière identique au premier. Cependant, lorsque les 60 minutes allouées à la polymérisation par le KCl et le MgCl_2 sont écoulées, on amène la solution à $[\text{KCl}]$ 0,6 M. Le mélange résultant est maintenu sous agitation douce durant 30 minutes. L'ajout de KCl, à concentration finale de 0,6 M, permet d'éliminer les protéines contaminantes, en particulier la tropomyosine. L'actine F est ensuite traitée de la façon

exposée précédemment. A la fin de la période de dialyse, l'actine est à l'état monomérique.

Maintenue en dialyse à la chambre froide, l'actine monomérique se conserve environ 4 jours. Le rendement obtenu par cette technique varie entre 20 et 25 mg d'actine par gramme de poudre acétonique.

5- Contrôle de la pureté de l'actine.

La pureté des préparations d'actine utilisées au cours de ce travail est vérifiée par les techniques suivantes:

A- Filtration sur tamis moléculaire

L'actine est filtrée sur une colonne Ultrogel AcA 44 (1,44m x 4cm) selon la technique de Rees et Young (69). L'Ultrogel 44 permet de séparer les protéines dont le poids moléculaire se situe entre 10 000 et 130 000 daltons. L'élution se fait à 20 ml/hr et les fractions recueillies sont de 3 ml.

Nous avons déposé 20 mg d'actine diluée dans le tampon-G sur la colonne préalablement équilibrée à 4°C avec 1300 ml de tampon-G sans ATP; pH 8,0. L'ATP est ajouté avant la filtration. Le profil d'élution déterminé par lecture de l'absorbance à 290 nm est présenté à la section "Résultats".

B- Technique d'électrophorèse

Nous avons analysé plusieurs échantillons protéiniques par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en plaques en présence de SDS (sodium dodecyl sulfate). Le matériel analysé comprend différentes fractions obtenues de la filtration sur tamis moléculaire et des échantillons prélevés à divers stades de la préparation de l'actine.

L'analyse électrophorétique est effectuée selon la méthode décrite par Laemmli (47). La concentration en acrylamide du gel de résolution est de 11% et permet la résolution des chaînes polypeptidiques jusqu'à un poids moléculaire minimum de 14 000 daltons. Après électrophorèse, les gels sont fixés et colorés selon la méthode de Fairbanks (19). L'électrophorèse des échantillons analysés est présentée à la section "Résultats".

6- Traitement de l'actine avant utilisation

Ainsi qu'il est mentionné à la section "Préparation de l'actine", l'actine est toujours maintenue en dialyse à la chambre froide contre 10 volumes de tampon-G. Toutefois, nous tenons à préciser qu'avant chaque utilisation, l'actine dialysée est à nouveau centrifugée à 90 000 g x 150 minutes à 4°C afin d'éliminer l'actine dénaturée et les courts filaments possiblement présents dans la préparation.

La concentration de l'actine est déterminée spectrophotométriquement. L'absorbance de la solution d'actine lue à 320 nm (turbidité) est soustraite de l'absorbance à 290 nm ($A_{290-320}$) puis nous calculons la concentration de l'actine en utilisant le coefficient d'extinction de l'actine monomérique pure $A_{1\%}^{1\text{cm}} = 6,3$ à 290 nm (37). L'actine est amenée à la concentration désirée par dilution dans le tampon-G.

7-Détermination des rendements de polymérisation de l'actine par la spermidine, la spermine et le MgCl_2

Les rendements de polymérisation (R.P.) sont déterminés par ultracentrifugation. Cette méthode consiste à mesurer la quantité d'actine polymérisée après séparation de l'actine G et F par ultracentrifugation à 90 000 g x 150 minutes.

Des échantillons de 1 ml d'actine G, à concentration fixe lors d'une même expérience soit 0,5 , 1,0 , 1,5 ou 2,0 mg/ml, sont déposés dans des tubes de polycarbonate à température ambiante.

Les agents de polymérisation sont ajoutés à l'aide d'une micro-seringue de précision Hamilton. Leurs concentrations

varient de la façon suivante:

[spermidine]	0 à 1,0 mM
[spermine]	0 à 0,4 mM
[MgCl ₂]	0 à 2,0 mM

Les solutions, mélangées par inversion, reposent 60 minutes à température ambiante pour permettre à l'actine de polymériser.

Des solutions-contrôles sont traitées de façon analogue sauf qu'elles ne contiennent pas d'agent de polymérisation.

L'étape suivante consiste à séparer l'actine F par centrifugation à 90 000 g x 150 minutes à 4°C. L'actine G, qui demeure dans le surnageant, est dosée au spectrophotomètre à 290 nm - 320 nm. Connaissant la quantité d'actine initiale (ref. solution-contrôle) et la quantité d'actine non polymérisée du surnageant, il est possible de calculer la proportion d'actine qui a polymérisé (c'est-à-dire R.P.) en se servant de la formule suivant:

$$\frac{A_{290-320} \text{ du surnageant de l'échantillon}}{A_{290-320} \text{ de la solution-contrôle}} = x$$

et $(1-x) \times 100 = \text{Rendement de polymérisation (R.P.) (\%)}$

Ainsi, plus la valeur de l'absorbance du surnageant est faible, plus le pourcentage de polymérisation est élevé.

Chaque expérience, pour une concentration d'actine donnée, est effectuée au moins à 3 reprises avant de traiter les résultats.

8-Détermination de la concentration critique de polymérisation de l'actine en présence de spermidine, spermine ou de $MgCl_2$

La technique utilisée est l'ultracentrifugation dont le principe a déjà été exposé.

Des échantillons de 2 ml d'actine, de concentration comprise entre 0,06 et 0,12 mg/ml sont polymérisés par des concentrations fixes d'agents de polymérisation soit 0,8 mM spermidine, 0,4 mM spermine ou 2,5 mM $MgCl_2$.

La quantité d'actine polymérisée au bout d'une heure est mesurée, après ultracentrifugation, suivant le même protocole que précédemment sauf que la centrifugation est effectuée à 20°C.

Les résultats, utilisés plus loin, proviennent pour chaque agent de polymérisation de 3 expériences.

9- Détermination du nombre de sites de fixation de la spermidine sur l'actine

Le nombre de sites de fixation de la spermidine sur l'actine est déterminé par équilibre de dialyse.

Des séries d'échantillons d'actine monomérique, en solution dans le tampon Tris 2 mM, ATP 0,3 mM pH:8,0 à 20°C, sont placés dans des sacs à dialyse préalablement stérilisés. Chaque sac à dialyse renferme 0,8 ml d'actine à concentration de 1 mg/ml.

La solution de dialyse comprend le tampon de dialyse (Tris 2 mM, ATP 0,3 mM, pH:8,0 à 20°C) et la spermidine ^{14}C . Pour chaque essai, 8 ml de solution de dialyse, soit 10 fois le volume contenu à l'intérieur du sac, sont placés dans chacun des tubes. La concentration de la spermidine ^{14}C de la solution à dialyse varie de 0,02 à 0,3 mM.

Les tubes sont déposés sur une plaque agitatrice durant 24 heures à froid ce qui permet aux échanges de se produire tout en évitant la dénaturation de l'actine. Le temps alloué (24 heures) pour assurer l'équilibre de dialyse a été déterminé par des expériences préliminaires. Ce délai écoulé, nous considérons donc que l'équilibre est atteint c'est-à-dire que la concentration de spermidine non-liée à l'actine à l'intérieur du sac égale celle de la spermidine située à

l'extérieur du sac.

Lorsque l'équilibre est atteint, des échantillons de 200 μ l à l'intérieur et à l'extérieur du sac à dialyse sont prélevés. A ces échantillons, 5 ml de liquide à scintillation (Insta-gel) sont ajoutés puis les échantillons sont entreposés une nuit à la chambre froide.

Le comptage de la radioactivité est effectué par un compteur Packard Tri-Carb. A l'équilibre, la concentration de spermidine libre à l'intérieur et à l'extérieur du sac est la même. Par conséquent, la différence de radioactivité, en coups par minute, entre la lecture d'un échantillon de l'intérieur du sac à dialyse et celle d'un échantillon de même volume prélevé à l'extérieur du sac correspond à la quantité (en coups par minute) de spermidine liée à l'actine.

Un étalon constitué de 25 μ l de spermidine ^{14}C à concentration connue sert de référence pour déterminer le nombre de moles de spermidine ^{14}C libres et liées à l'actine.

Connaissant la concentration d'actine, le nombre de moles de spermidine liées et libres, nous traitons les résultats, obtenus par équilibre de dialyse, selon le modèle de Scatchard (74) afin de déterminer le nombre de sites de fixation de la spermidine sur l'actine.

RESULTATS

1- Contrôle de la pureté de l'actine

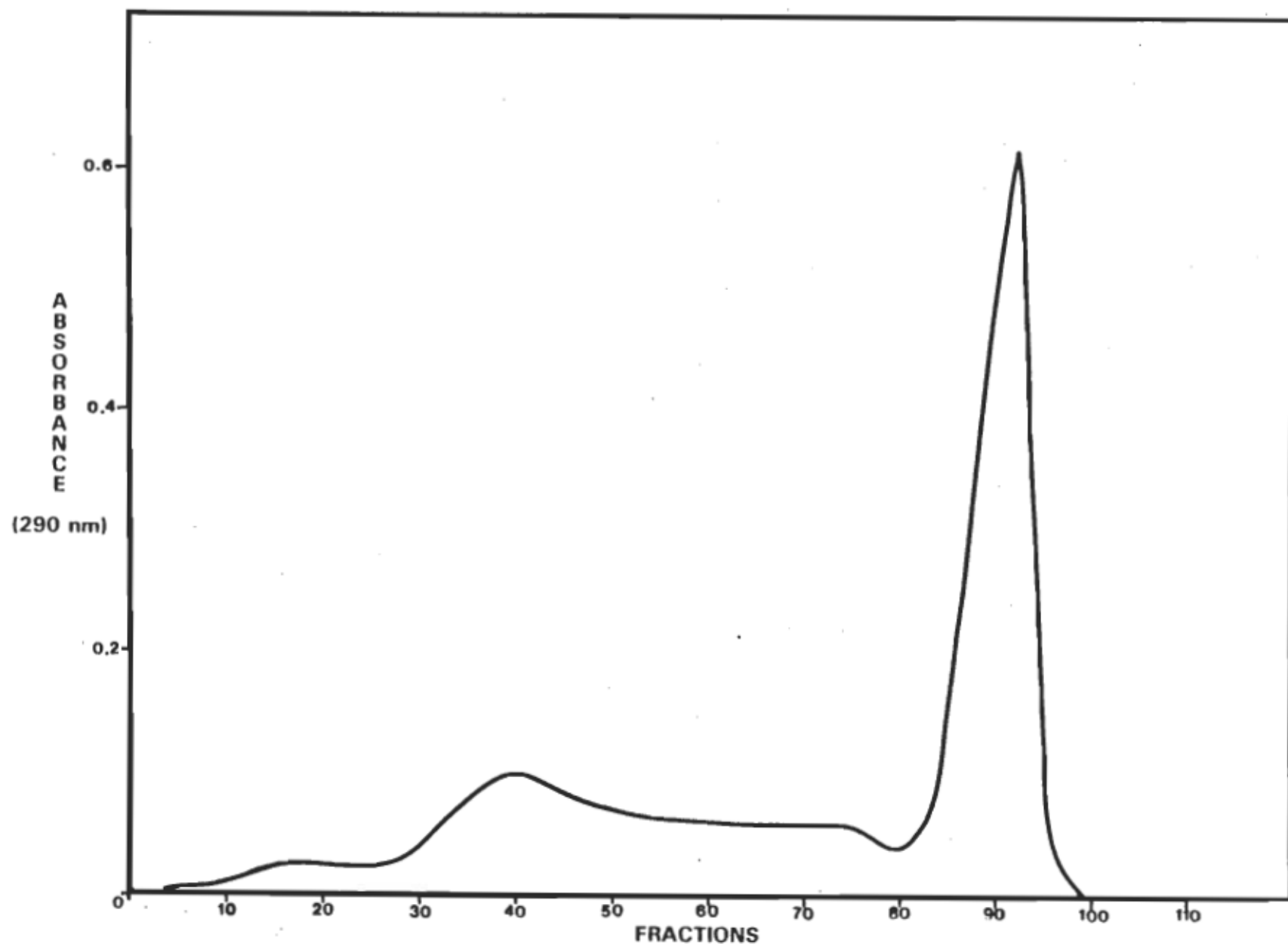
A- Filtration sur tamis moléculaire

Le profil d'élution, déterminé par lecture de l'absorbance à 290 nm, des différentes fractions recueillies après passage sur Ultrogel AcA 44 se trouve à la figure 4.

Un léger pic d'absorption révèle la présence de contaminants dans les fractions 31 à 55 tandis que la forte augmentation d'absorption contenue dans les fractions 85 à 95 indique la présence de l'actine. L'analyse électrophorétique de certaines de ces fractions le confirmera.

La filtration sur tamis moléculaire nous apprend donc que la proportion de contaminants de nos préparations d'actine est faible, soit inférieure à 2%.

Figure 4. Profil d'elution d'une préparation d'actine
après filtration sur Ultrogel AcA 44.



B- Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS des fractions 74, 77, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95 et 96 obtenues par chromatographie sur Ultrogel AcA 44 montre qu'une seule bande domine (figure 5A).

Par comparaison avec la migration des protéines de référence, cette bande correspond à 42 000 daltons et représente l'actine.

A la figure 5B, les fractions analysées sont des échantillons prélevés au cours de la préparation de l'actine(ref. Matériel et méthodes).

L'électrophorèse de la fraction 1 (fraction prélevée après l'extraction des protéines de la poudre acétonique et filtration sur Millipore) montre la présence des protéines extraites avec l'actine. En comparant avec le poids moléculaire des protéines de référence, la bande la plus haute correspond à l'alpha-actinine et la deuxième correspond à l'actine. Les autres bandes représentent possiblement des traces des composants de tropomyosine et troponines.

La fraction 2 est constituée du surnageant prélevé après la centrifugation qui fait suite au premier cycle de

polymérisation de l'actine. L'électrophorèse de cette fraction nous indique les protéines éliminées par cette étape de la préparation de l'actine. Ainsi, l'alpha-actinine, une partie de l'actine de même que d'autres protéines de poids moléculaire plus faible que l'actine sont éliminées par cette première polymérisation.

La fraction 3 représente ce qui est retiré de la préparation d'actine par le deuxième cycle de polymérisation. A ce stade de la purification de l'actine, l'augmentation de la concentration de KCl jusqu'à 0,6 M enlève la tropomyosine, principale protéine contaminante de l'actine. Sur l'électrophorèse, les constituants de la tropomyosine correspondent à la bande la plus foncée après celle de l'actine. Nous constatons également qu'à cette étape de la préparation, nous éliminons une partie de l'actine en même temps que les protéines contaminantes.

L'électrophorèse du culot de F-actine (fraction 4), prélevé à la fin de la technique de préparation de cette protéine, montre une seule bande à 42 000 daltons témoignant de la pureté de l'actine.

Nous concluons donc que l'actine utilisée dans nos expériences présente un degré élevé de pureté très comparable à ce qui est généralement cité dans la littérature.

Figure 5.

A-Electrophorèse des fractions (74, 77, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96) obtenues par filtration sur Ultrogel AcA 44.

T=protéines de référence (Kit LMW Pharmacia)

B-Analyse électrophorétique, sur gel de polyacrylamide à 11% en milieu SDS, d'échantillons prélevés au cours de la préparation de l'actine

T=protéines de référence (Kit LMW Pharmacia)

Fractions

- 1: Extrait du surnageant après filtration sur Millipore.
- 2: Extrait du surnageant de la première polymérisation, après centrifugation.
- 3: Echantillon de surnageant prélevé après la centrifugation suivant la deuxième étape de polymérisation par KCl 0,1 M et $MgCl_2$ 2,5 mM puis KCl 0,6 M.
- 4: Echantillon du culot d'actine prélevé après la centrifugation suivant la deuxième étape de polymérisation.

2-Détermination de la concentration critique de polymérisation de l'actine en présence de spermidine, de spermine ou de $MgCl_2$

La concentration critique est, rappelons-le, la concentration d'actine en dessous de laquelle il n'y a pas de polymérisation. Cette concentration critique varie selon la température et selon la nature de l'agent de polymérisation.

Nous avons déterminé les concentrations critiques de polymérisation de l'actine en présence de spermidine (0,8 mM), de spermine (0,4 mM) et de $MgCl_2$ (2,5 mM). La figure 6 représente les courbes de rendement de polymérisation en fonction de la concentration d'actine pour chacun des agents polymérisants. La concentration critique est déterminée par extrapolation de la droite. A l'intersection de chacune des droites et de l'axe des abscisses, nous pouvons lire directement la valeur de la concentration critique de polymérisation de l'actine (C_i). Les valeurs de ces concentrations critiques sont regroupées au tableau 1.

Ces résultats montrent que les valeurs des concentrations critiques de polymérisation de l'actine sont du même ordre de grandeur soit environ 20 $\mu g/ml$ pour les agents polymérisants utilisés: la spermidine 0,8 mM, la spermine 0,4 mM et le $MgCl_2$ 2,5 mM.

	Actine ($\mu\text{g/ml}$)
spermidine (0,8 mM)	25
spermine (0,4 mM)	20
MgCl ₂ (2,5 mM)	20

Tableau 1. Concentrations critiques de polymérisation de l'actine en présence de spermidine, de spermine ou de MgCl₂.

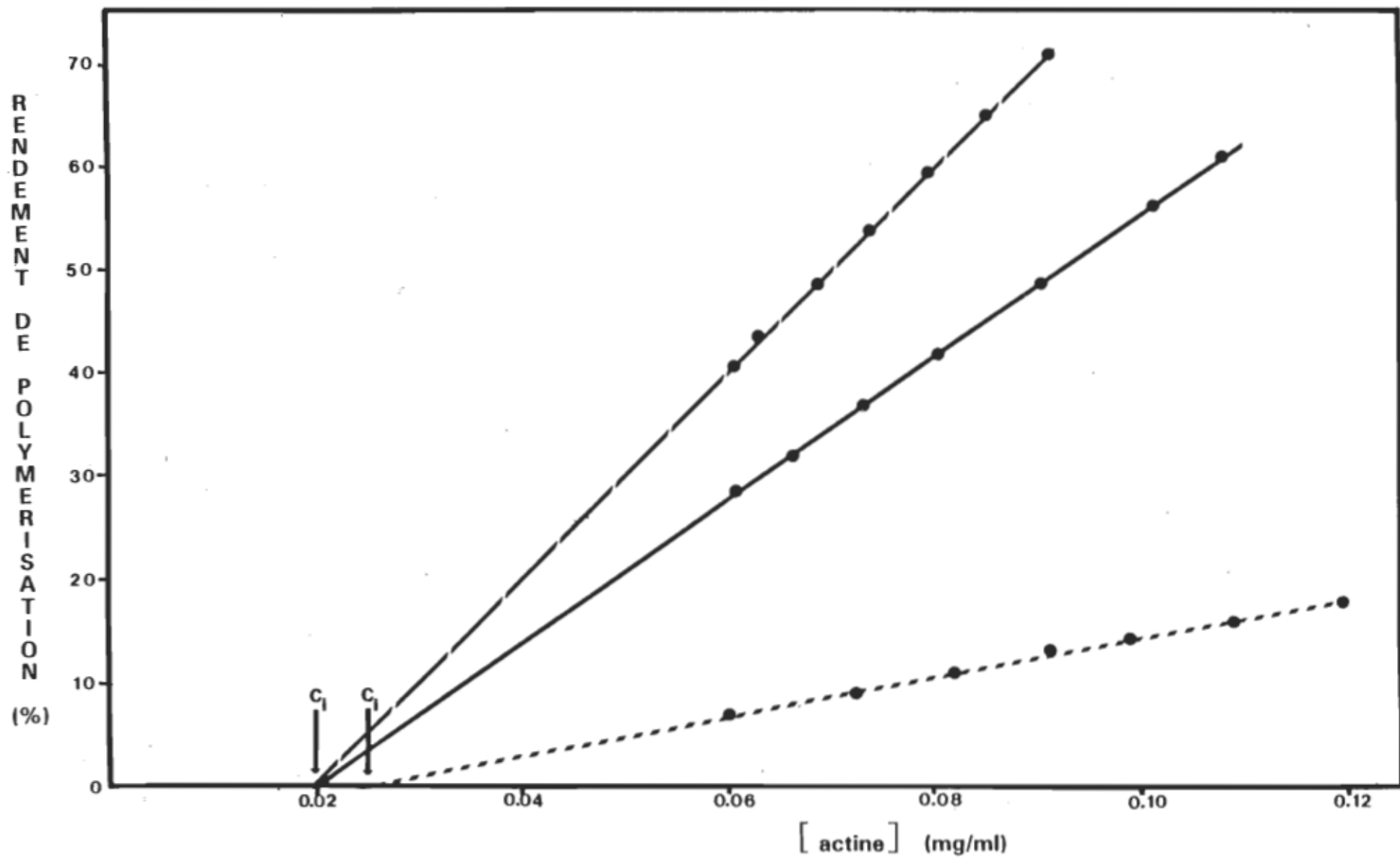
3-Rendement de polymérisation de l'actine en fonction de la concentration de spermidine, de spermine ou de MgCl₂

Nous avons établi les courbes de rendement de polymérisation de l'actine en fonction de la concentration de chaque agent polymérisant.

Pour ces expériences, l'actine G, à différentes concentrations, est polymérisée par des concentrations variables soit de spermidine (0 à 1 mM), soit de spermine (0 à 0,4 mM) ou de MgCl₂ (0 à 2 mM). Ces courbes sont présentées aux figures 7, 8, 9.

Figure 6. Rendement de polymérisation (%) de l'actine en fonction de la concentration d'actine (mg/ml). Le rendement de polymérisation est déterminé par ultracentrifugation. L'intersection avec l'abscisse correspond à la concentration critique de polymérisation (c_i) de l'actine pour

la spermidine	-----
la spermine	—————
le $MgCl_2$	—————



L'observation des courbes nous révèle que:

- Le rendement de polymérisation maximal n'atteint jamais 100% ce qui peut s'expliquer par l'existence de la concentration critique de polymérisation de l'actine.
- Toutes les courbes ont une allure sigmoïdale. Ce type de courbe indique la présence de plusieurs sites de fixation sur l'actine. L'allure sigmoïdale montre aussi que les interactions entre l'actine et l'agent polymérisant se font selon un mode de coopérativité positive c'est-à-dire que la fixation d'une molécule sur l'actine favorise la fixation d'autres molécules.

Afin de comparer la cinétique de polymérisation de l'actine par la spermidine, la spermine ou le $MgCl_2$, nous avons défini le CF_{50} . La CF_{50} est la concentration d'agent polymérisant pour laquelle 50% de la polymérisation maximale est obtenue. Les valeurs des CF_{50} sont déterminées graphiquement sur les figures 7, 8, 9 et sont présentées au tableau 2.

L'analyse des courbes de rendement de polymérisation de l'actine et la comparaison des CF_{50} montrent:

- Qu'il existe une relation entre la concentration de l'actine et la CF_{50} : plus l'actine est concentrée, plus la valeur de la CF_{50} est petite c'est-à-dire que plus l'actine est concentrée, moins il faut d'agent de polymérisation.

- Que la CF_{50} , pour une même concentration d'actine, varie selon la nature de l'agent polymérisant. La CF_{50} devient donc un indice qui permet de comparer l'efficacité à polymériser l'actine: plus la CF_{50} est petite, plus la substance est efficace. Ainsi, pour une concentration d'actine de 1 mg/ml, l'efficacité de chaque substance à polymériser l'actine, telle que montrée au tableau 2, varie de la façon suivante:



De façon générale, les courbes de rendement de polymérisation des figures 7, 8, 9 montrent que la spermidine, la spermine ou le MgCl_2 déterminent la même cinétique de polymérisation.

	Actine (mg/ml)	CF ₅₀ (mM)
spermidine	1,0	0,29
	1,5	0,22
	2,0	0,18
spermine	0,5	0,16
	1,0	0,11
MgCl ₂	0,5	0,55
	1,0	0,50
	2,0	0,48

Tableau 2. Valeurs des CF₅₀ pour différentes concentrations d'actine polymérisée en présence de spermidine, de spermine ou de MgCl₂.

Figure 7. Rendement de polymérisation (%) de l'actine en fonction de la concentration de spermidine (mM). Le rendement de polymérisation est déterminé par ultracentrifugation, pour différentes concentrations d'actine.

Actine à 1,0 mg/ml - - - - -

Actine à 1,5 mg/ml

Actine à 2,0 mg/ml

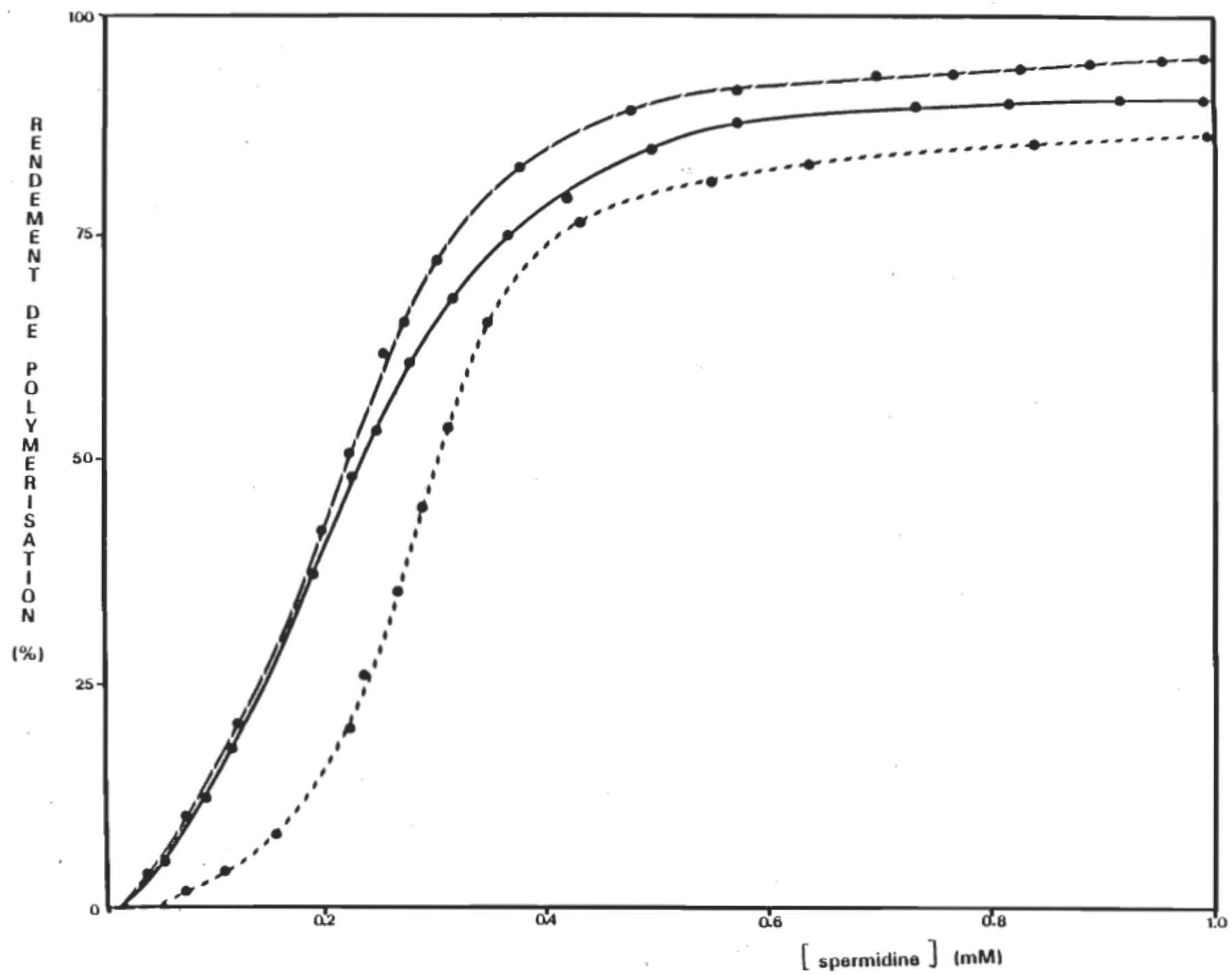




Figure 8. Rendement de polymérisation (%) de l'actine en fonction de la concentration de spermine (mM). Le rendement de polymérisation est déterminé par ultracentrifugation, pour différentes concentrations d'actine.

Actine à 0,5 mg/ml 

Actine à 1,0 mg/ml 

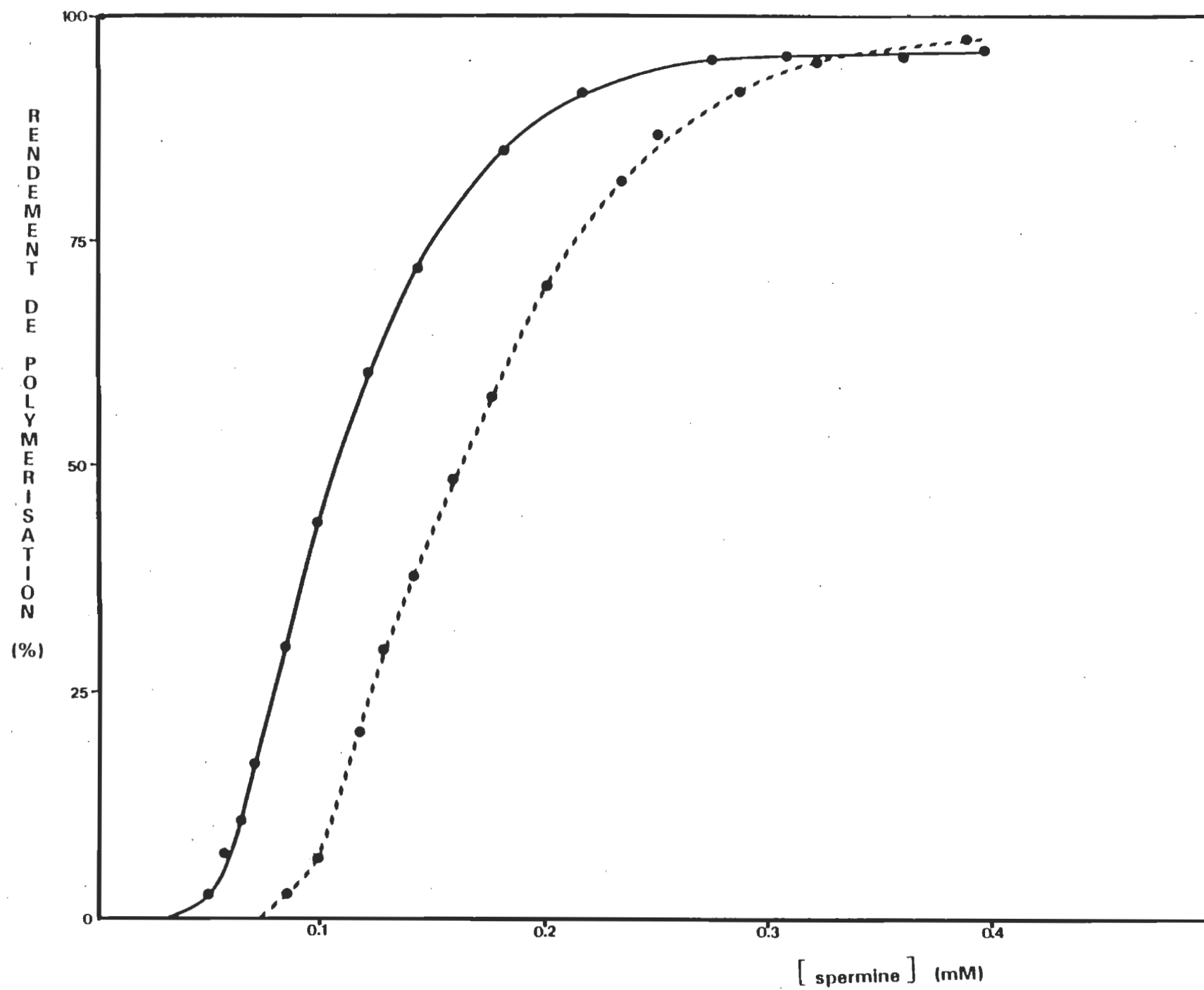
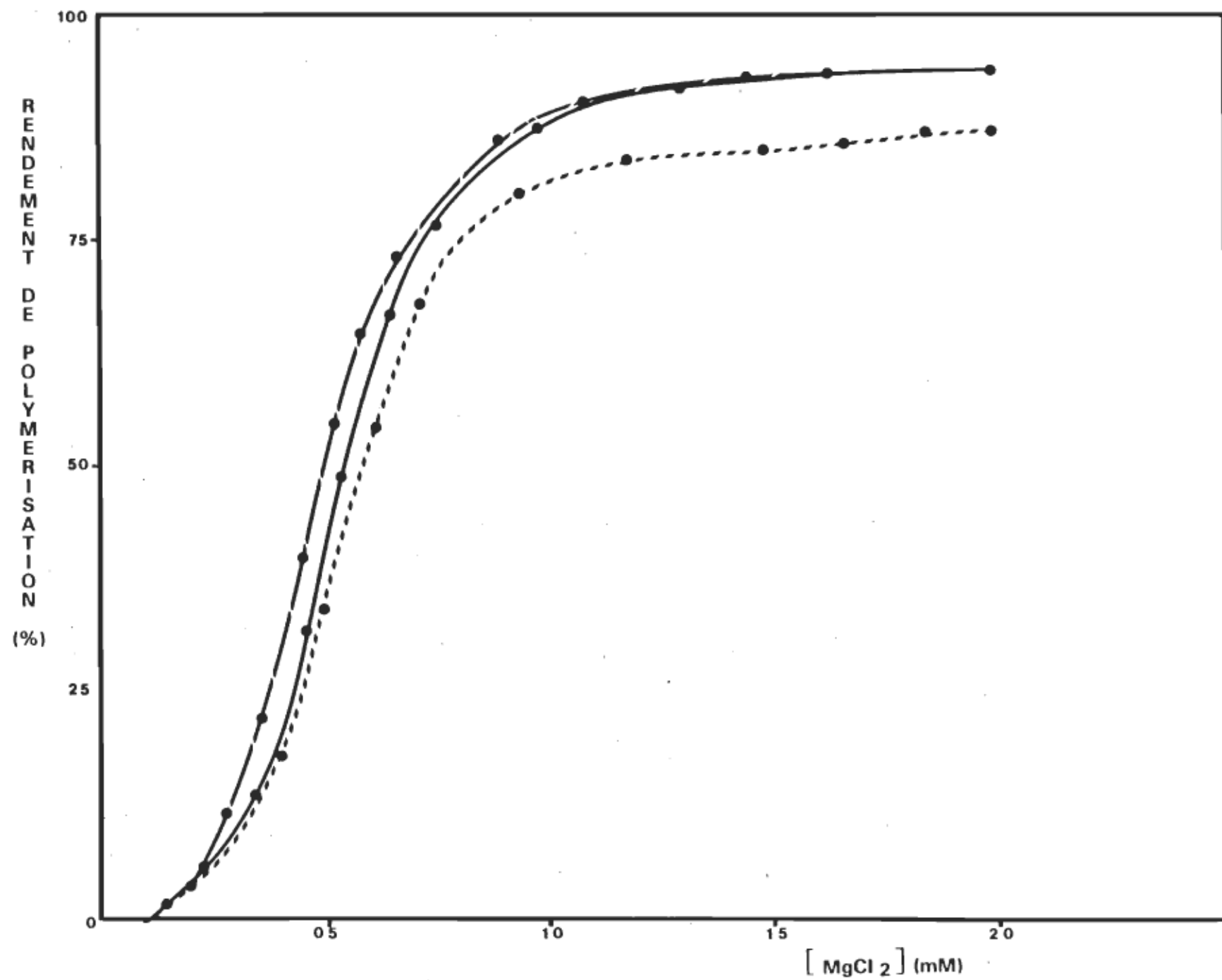


Figure 9. Rendement de polymérisation (%) de l'actine en fonction de la concentration de MgCl_2 (mM). Le rendement de polymérisation est déterminé par ultracentrifugation, pour différentes concentrations d'actine.

Actine à 0,5 mg/ml	-----
Actine à 1,0 mg/ml	—————
Actine à 2,0 mg/ml	—————



4-Courbes de l'inverse des rendements de polymérisation en
fonction de l'inverse de la concentration de l'agent
polymérisant

Les courbes de rendement de polymérisation en fonction de la concentration de l'agent polymérisant (figures 7, 8, 9) ont une allure sigmoïdale. Les courbes sigmoïdales indiquent que l'interaction entre deux substances se fait selon un mode de coopérativité positive.

Dans le but de prouver qu'il s'agit bien de courbes sigmoïdales et non d'hyperboles rectangulaires, nous avons tracé les courbes de Lineweaver-Burk. En effet, il est difficile de montrer graphiquement que la dernière partie de la sigmoïde ne tend pas vers une asymptote comme le fait l'hyperbole rectangulaire. L'hyperbole rectangulaire exprime un mode d'interaction non-coopératif et dans ce cas, les courbes de Lineweaver-Burk sont linéaires. Par contre, pour la courbe sigmoïdale indiquant un mode d'interaction de type "coopérativité positive", la transformée de Lineweaver-Burk conduira à des courbes non linéaires.

Les courbes de l'inverse du rendement de polymérisation en fonction de l'inverse de la concentration d'agent polymérisant ou courbes de Lineweaver-Burk sont présentées aux figures 10, 11, 12. Les courbes sont tracées pour chacun des trois agents polymérisants et pour différentes concentra-

tions d'actine.

L'observation de ces graphiques nous montre la non-linéarité de chaque courbe. Nous pouvons donc en déduire que:

- La dernière partie de la courbe du rendement de polymérisation en fonction de la concentration d'agent polymérisant correspond à un plateau et donc qu'elle ne tend pas vers une asymptote, ce qui signifie que la réaction entre l'actine et chaque agent polymérisant est terminée, c'est-à-dire que l'ajout d'agent polymérisant supplémentaire n'entraînera pas une augmentation du rendement de polymérisation.
- les courbes de rendement de polymérisation en fonction de la concentration d'agent polymérisant sont bien des sigmoïdes, confirmant ainsi l'interaction coopérative de type positif entre l'actine et la spermidine, la spermine ou l'ion Mg^{2+} .

Le type d'interaction entre l'actine et la spermidine, la spermine ou le $MgCl_2$, soit la coopérativité positive, étant confirmée, nous traiterons maintenant nos résultats selon le modèle de Hill.

Figure 10. Courbes de l'inverse des rendements de polymé-
risation de l'actine en fonction de l'inverse
de la concentration de spermidine (mM) pour
différentes concentrations d'actine.
Ces courbes sont tracées à partir des valeurs
de la figure 7.

Actine à 1.0 mg/ml	■ ■
Actine à 1,5 mg/ml	● ●
Actine à 2,0 mg/ml	▲ ▲

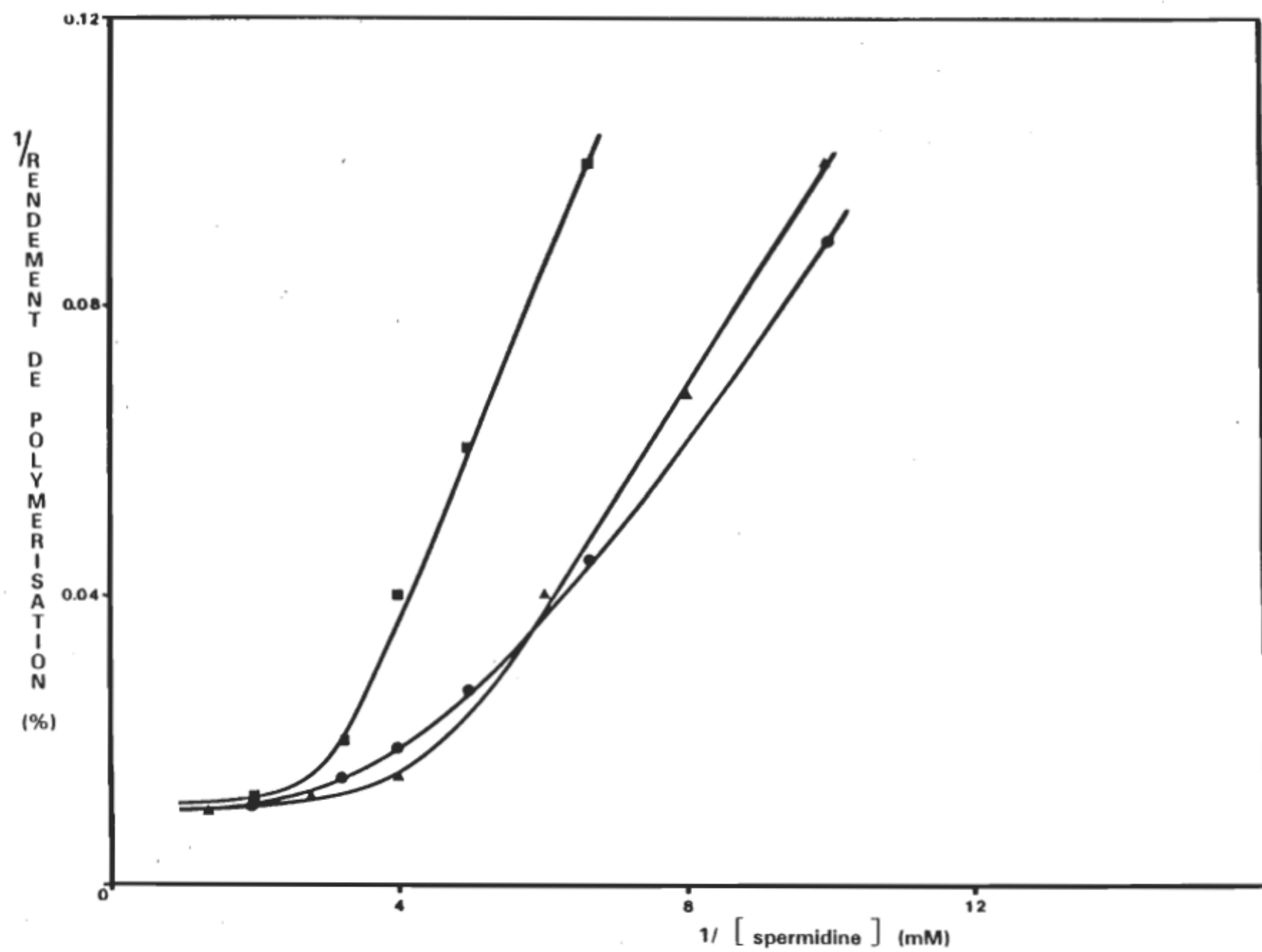


Figure 11. Courbes de l'inverse des rendements de polymé-
risation de l'actine en fonction de l'inverse
de la concentration de spermine (mM) pour
différentes concentrations d'actine.
Ces courbes sont tracées à partir des valeurs
de la figure 8.

Actine à 0,5 mg/ml ● ●

Actine à 1,0 mg/ml ■ ■

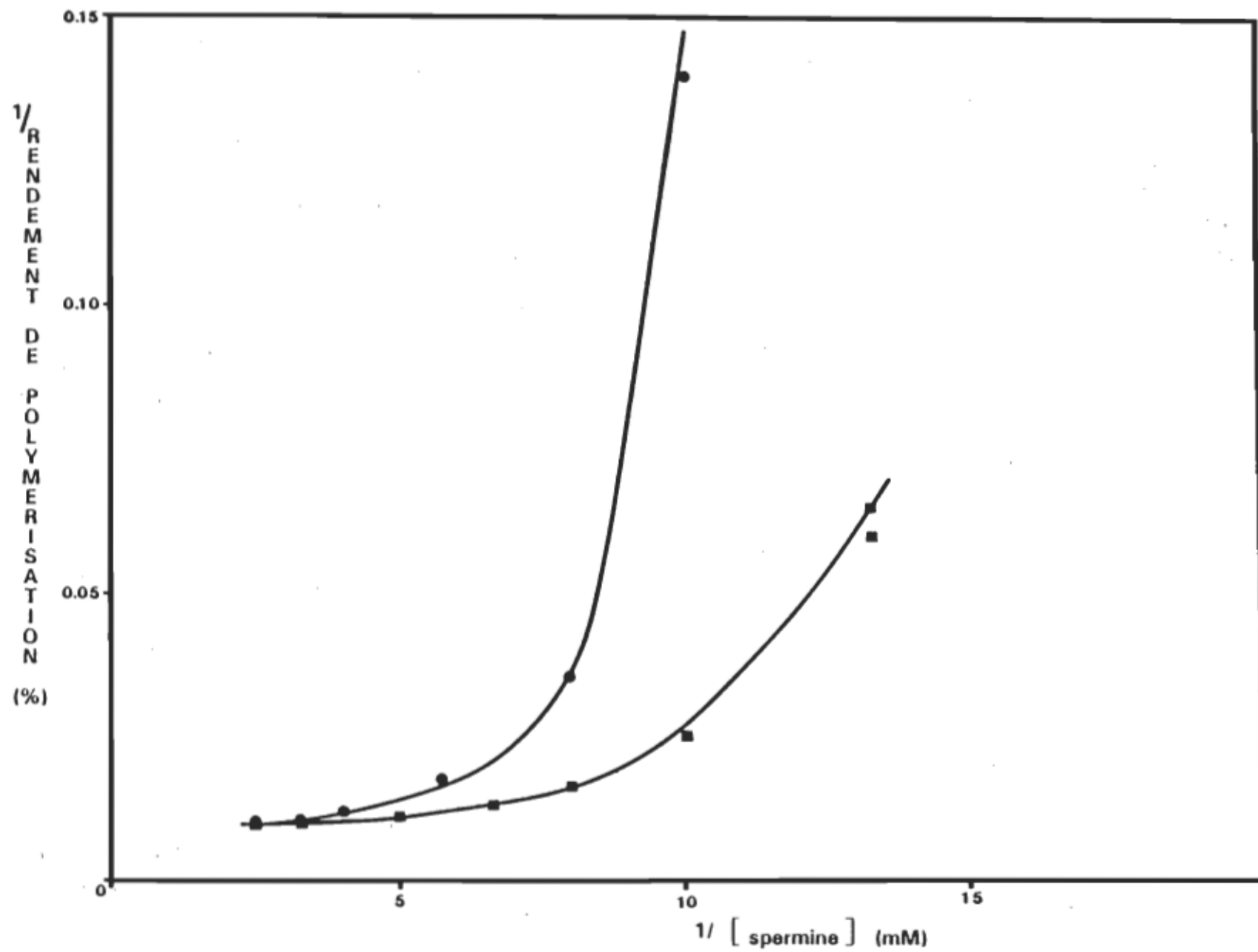
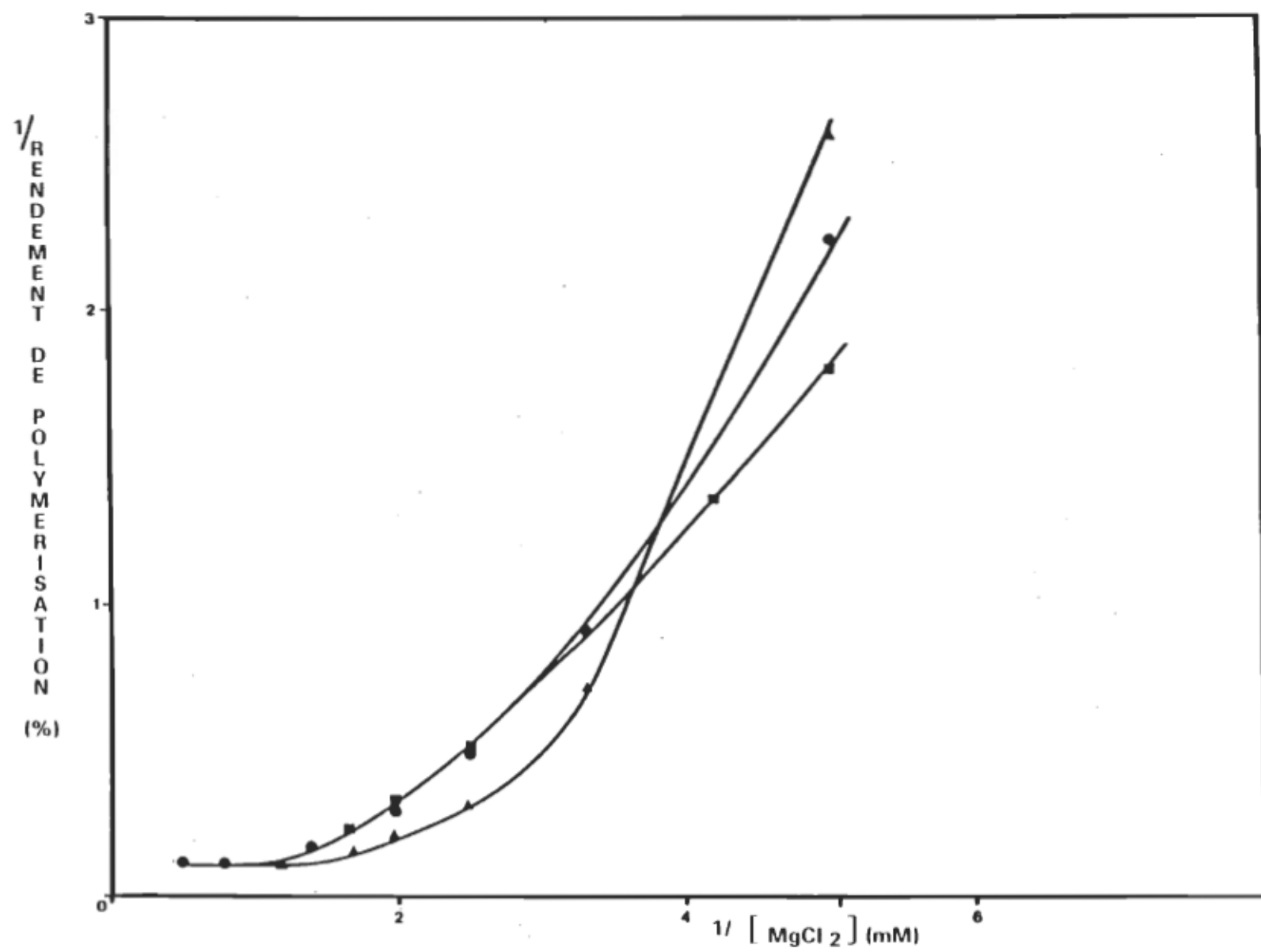


Figure 12. Courbes de l'inverse des rendements de polymérisation de l'actine en fonction de l'inverse de la concentration de MgCl_2 (mM) pour différentes concentrations d'actine. Ces courbes sont tracées à partir des valeurs de la figure 9.

Actine à 0,5 mg/ml	● ●
Actine à 1,0 mg/ml	■ ■
Actine à 2,0 mg/ml	▲ ▲



5-Analyse des résultats de rendement de polymérisation par la méthode de Hill

Nous avons tracé les courbes de Hill à partir des courbes de rendement de polymérisation de l'actine pour la spermidine, la spermine ou le Mg^{2+} . L'application du modèle de Hill (32, 35) nous permet d'estimer le nombre de sites de fixation de ces agents sur l'actine ainsi que les constantes d'affinité.

Le modèle de Hill sert habituellement à analyser des réactions à l'équilibre ou à l'état stationnaire et la notion de coopérativité qui en découle réfère, en général, à la fixation réversible d'un ligand sur une macromolécule. Cependant, dans nos conditions expérimentales, nous pouvons considérer que nous sommes en présence d'un système à l'équilibre (ou plutôt à l'état stationnaire selon l'hypothèse du treadmilling) puisque la polymérisation nette de l'actine est terminée au moment où le mélange est analysé (voir conditions expérimentales p.39 et 40). Dans ce contexte, l'application du modèle de Hill à des valeurs de rendement de polymérisation devient donc acceptable.

Les courbes des figures 13 à 20, sont le tracé du $\log R.P./100-R.P.$ en fonction du $\log [S]$ où R.P. représente le rendement de polymérisation exprimé en pourcentage et $[S]$ la concentration molaire d'agent polymérisant. Ces courbes ont

l'aspect des courbes théoriques de Hill (32, 35).

Les coefficients de Hill (n_{Hill}) sont obtenus en calculant la pente de la partie linéaire de chaque courbe. Les coefficients de Hill sont présentés au tableau 3.

Pour chaque courbe, le coefficient de Hill est supérieur à 1, ce qui confirme la coopérativité positive. Le coefficient de Hill ou n_{Hill} représente le nombre minimal de sites de fixation de l'agent polymérisant sur l'actine. Ainsi, il y a au minimum 4 sites de fixation sur l'actine pour la spermine ou le Mg^{2+} et 3 sites pour la spermidine.

Nos résultats indiquent, de plus, que le coefficient de Hill ou nombre minimal de sites de fixation de l'agent polymérisant sur l'actine dépend de la nature de l'agent polymérisant et est indépendant de la concentration d'actine.

Les constantes de forte affinité (K_1) et de faible affinité (K_2) sont déterminées en traçant des droites de pente 1 asymptotiques aux deux extrémités des courbes de Hill (35). L'intersection des droites de pente 1 avec une droite passant par le zéro de l'ordonnée correspond, sur l'abscisse, au $\log 1/K_1$ et au \log de $1/K_2$, tel que représenté à la figure 13. Les constantes d'affinité de la spermidine, la spermine et du Mg^{2+} pour l'actine, sont données au tableau 3.

Nos résultats montrent que les valeurs des constantes de forte et faible affinité sont du même ordre de grandeur pour les trois agents polymérisants et montrent également l'existence de deux classes de sites sur l'actine soit ceux de forte affinité et ceux de faible affinité.

Agents polymérisants	Actine (mg/ml)	Coefficient de Hill n_{Hill}	Constantes d'affinité (M^{-1})	
			K_1	K_2
spermidine	1,0	3,30	$9,1 \times 10^3$	$3,2 \times 10^2$
	1,5	2,40	$1,4 \times 10^4$	$8,7 \times 10^2$
	2,0	2,80	$1,9 \times 10^4$	$9,3 \times 10^2$
		$x = 2,80$	$x = 1,4 \times 10^4$	$x = 7,0 \times 10^2$
spermine	0,5	4,00	$6,4 \times 10^4$	$2,9 \times 10^2$
	1,0	3,33	$6,5 \times 10^4$	$6,2 \times 10^2$
		$x = 3,70$	$x = 6,5 \times 10^4$	$x = 4,6 \times 10^2$
$MgCl_2$	0,5	3,75	$5,5 \times 10^3$	$2,0 \times 10^2$
	1,0	3,75	$1,0 \times 10^4$	$1,6 \times 10^2$
	2,0	3,64	$1,0 \times 10^4$	$2,1 \times 10^2$
		$x = 3,71$	$x = 8,5 \times 10^3$	$x = 1,9 \times 10^2$

Tableau 3. Coefficients de Hill et constantes de forte (K_1) et faible (K_2) affinité pour la spermidine, la spermine ou le Mg^{2+} sur l'actine, déterminés par la méthode de Hill (32, 35).

Figure 13. Courbe de Hill, pour l'actine et la spermidine tracée à partir des valeurs de la figure 7.

R.P.=rendement de polymérisation (%), déterminé par ultracentrifugation.

[S]=concentration de la spermidine; 0 à 10^{-3} M
concentration d'actine=1,0 mg/ml

K_1 =constante d'affinité des sites à forte
affinité

K_2 =constante d'affinité des sites à faible
affinité

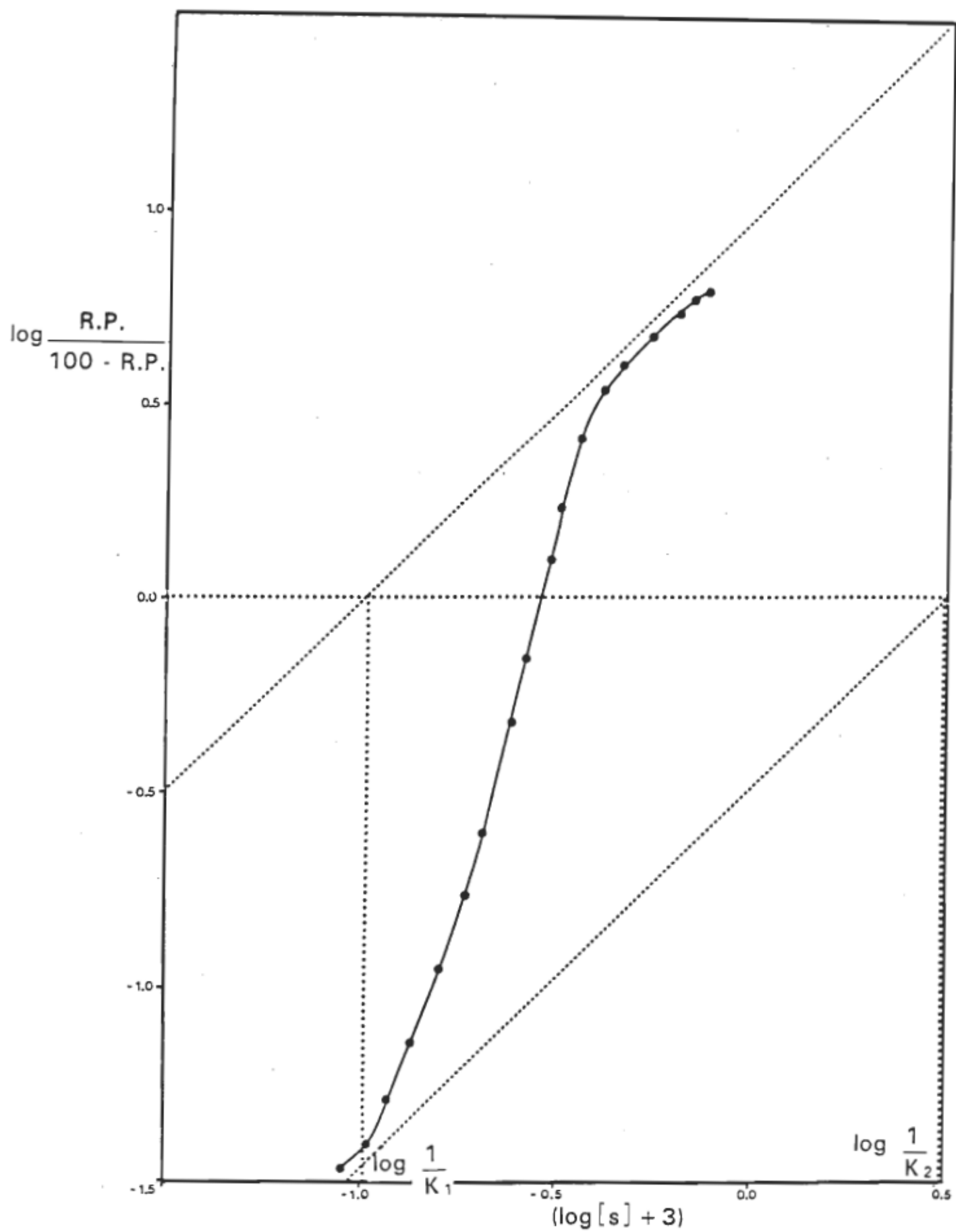


Figure 14. Courbe de Hill, pour l'actine et la spermidine, tracée à partir des valeurs de la figure 7.

R.P.=rendement de polymérisation (%), déterminé par ultracentrifugation.

[S]=concentration de la spermidine; 0 à 10^{-3} M
concentration de l'actine=1,5 mg/ml

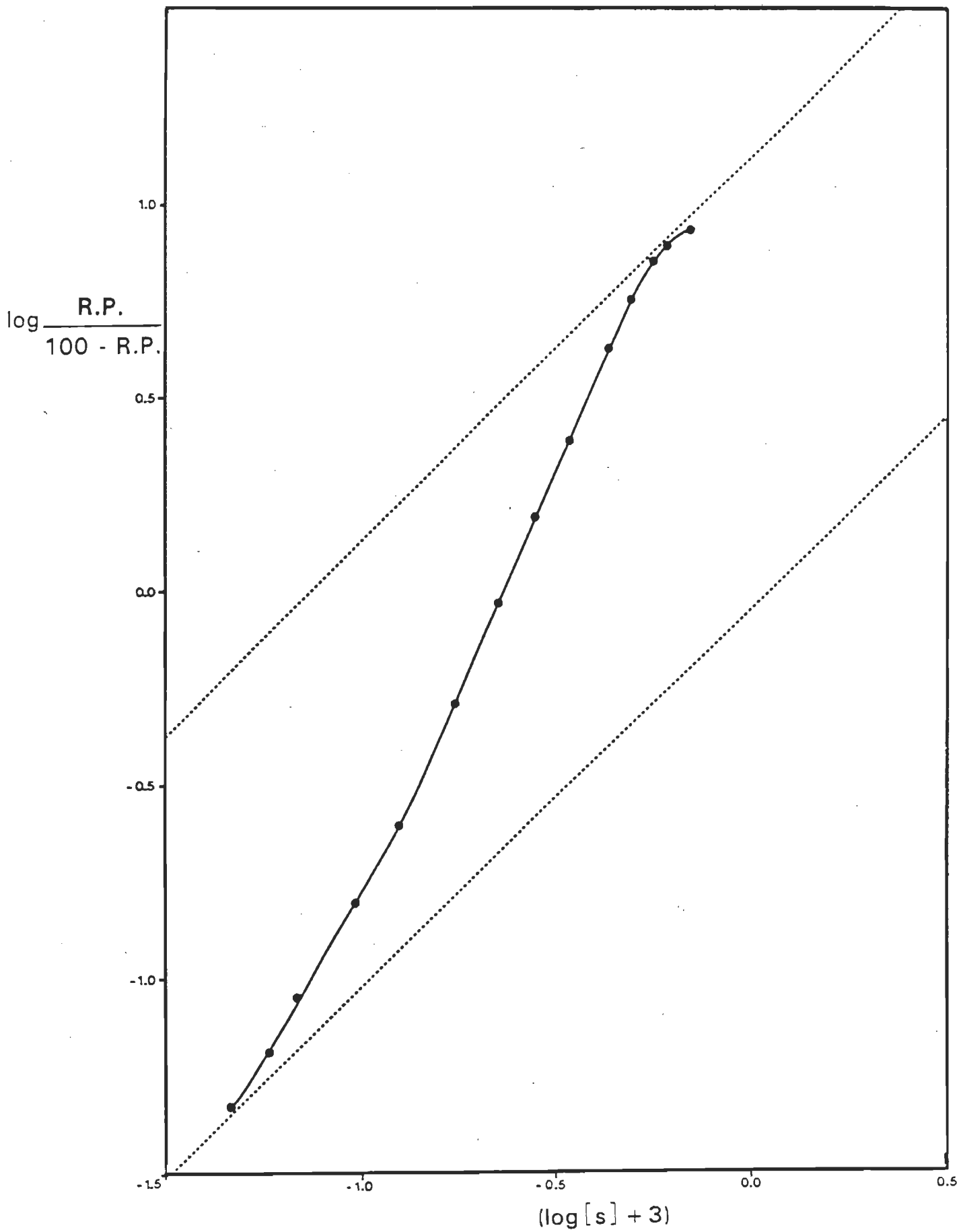


Figure 15. Courbe de Hill, pour l'actine et la spermidine, tracée à partir des valeurs de la figure 7.

R.P.=rendement de polymérisation (%), déterminé par ultracentrifugation.

[S]=concentration de la spermidine; 0 à 10^{-3} M
concentration de l'actine=2,0 mg/ml

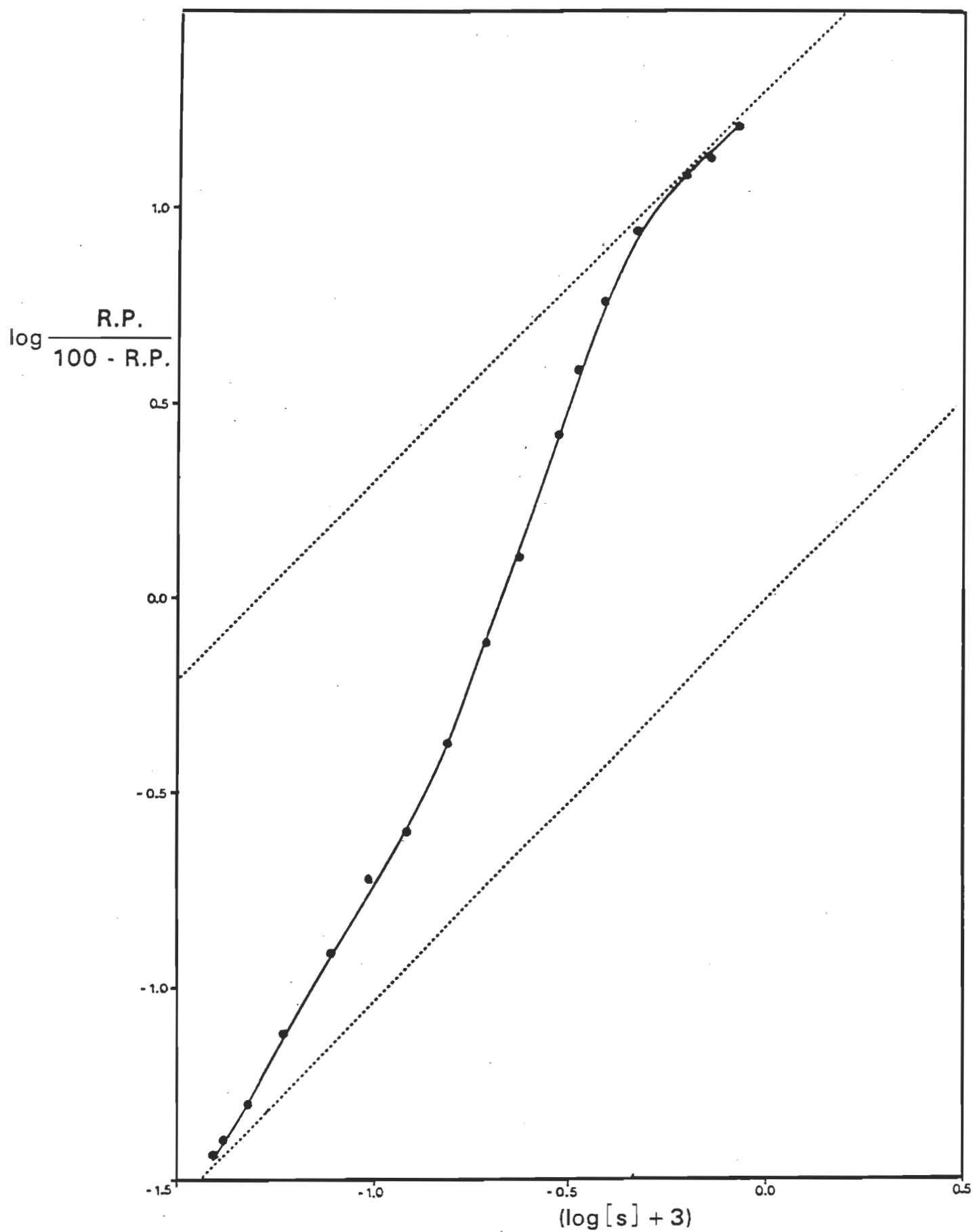


Figure 16. Courbe de Hill, pour l'actine et la spermine,
tracée à partir des valeurs de la figure 8.

R.P.=rendement de polymérisation (%), déterminé
par ultracentrifugation.

[S]=concentration de la spermine; 0 à 4×10^{-4} M
concentration de l'actine=0,5 mg/ml

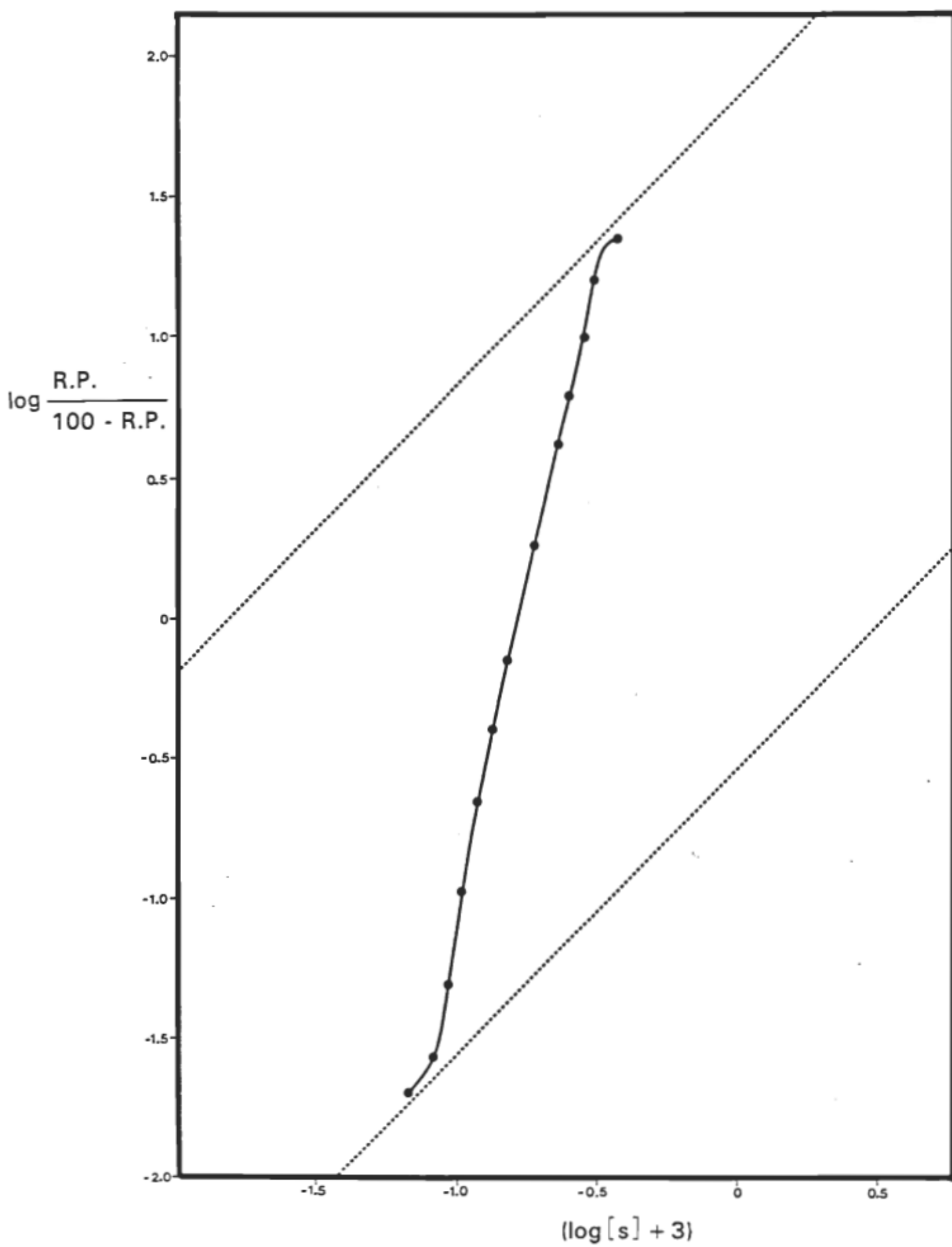


Figure 17. Courbe de Hill, pour l'actine et la spermine,
tracée à partir des valeurs de la figure 8.
R.P.=rendement de polymérisation (%), déterminé par ultracentrifugation.
[S]=concentration de la spermine; 0 à 4×10^{-4} M
concentration de l'actine=1,0 mg/ml

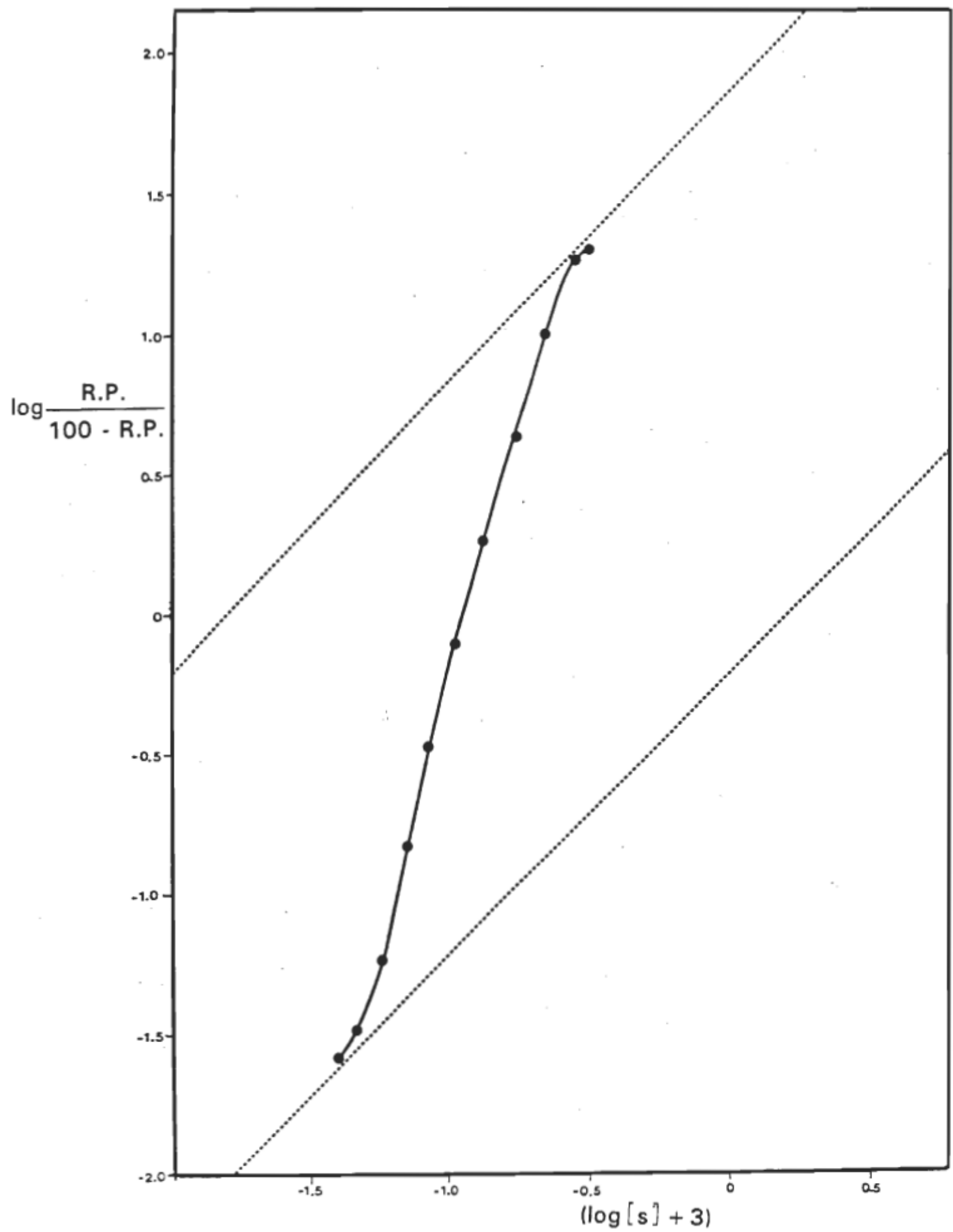


Figure 18. Courbe de Hill, pour l'actine et le MgCl_2 ,
tracée à partir des valeurs de la figure 9.
R.P.=rendement de polymérisation (%), déterminé par ultracentrifugation.
[S]=concentration de MgCl_2 ; 0 à $2 \times 10^{-3} \text{ M}$
concentration de l'actine=0,5 mg/ml

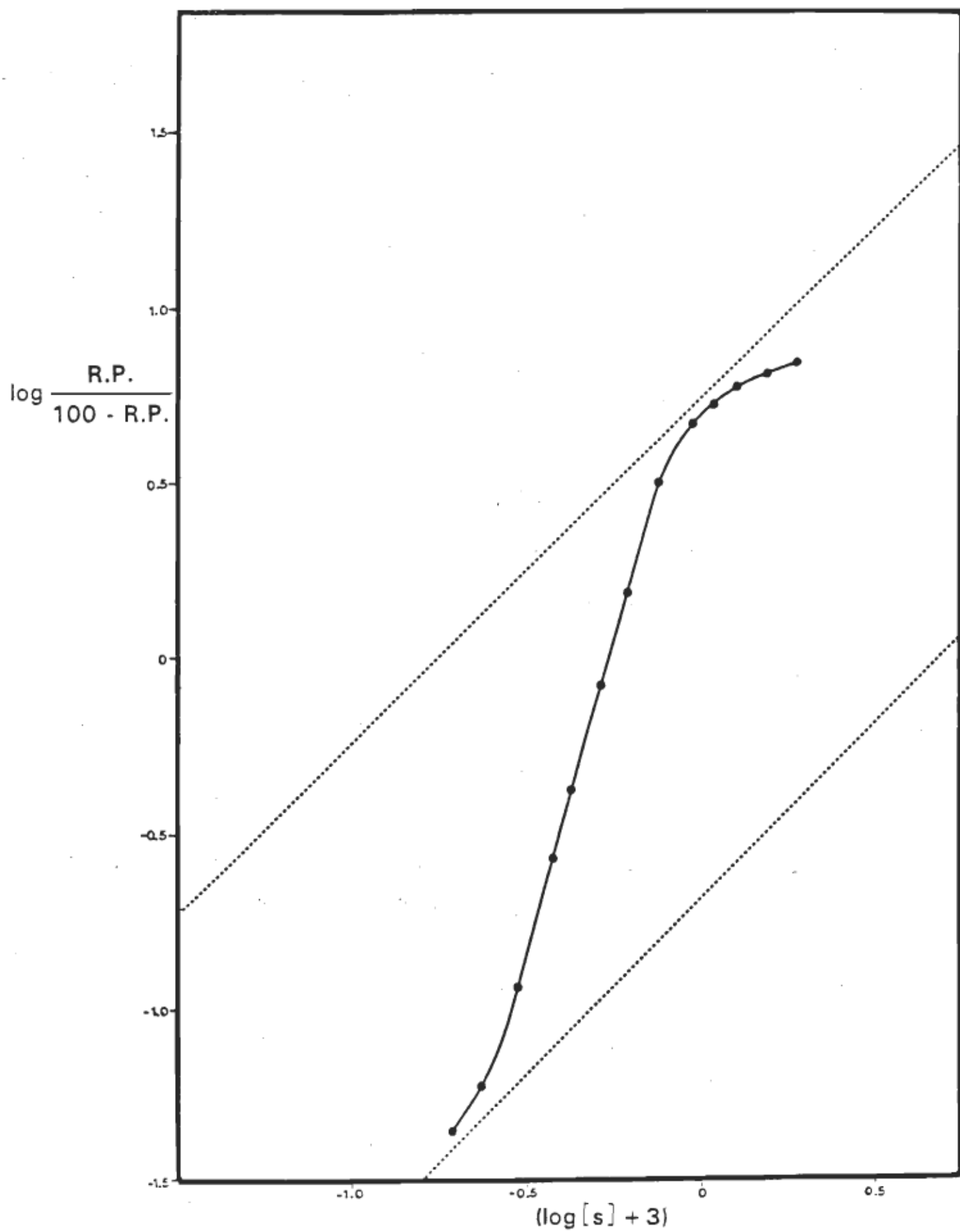


Figure 19. Courbe de Hill, pour l'actine et le MgCl_2 ,
tracée à partir des valeurs de la figure 9.

R.P.=rendement de polymérisation (%), déterminé par ultracentrifugation.

$[\text{S}]$ =concentration de MgCl_2 ; 0 à $2 \times 10^{-3} \text{ M}$

concentration de l'actine=1,0 mg/ml

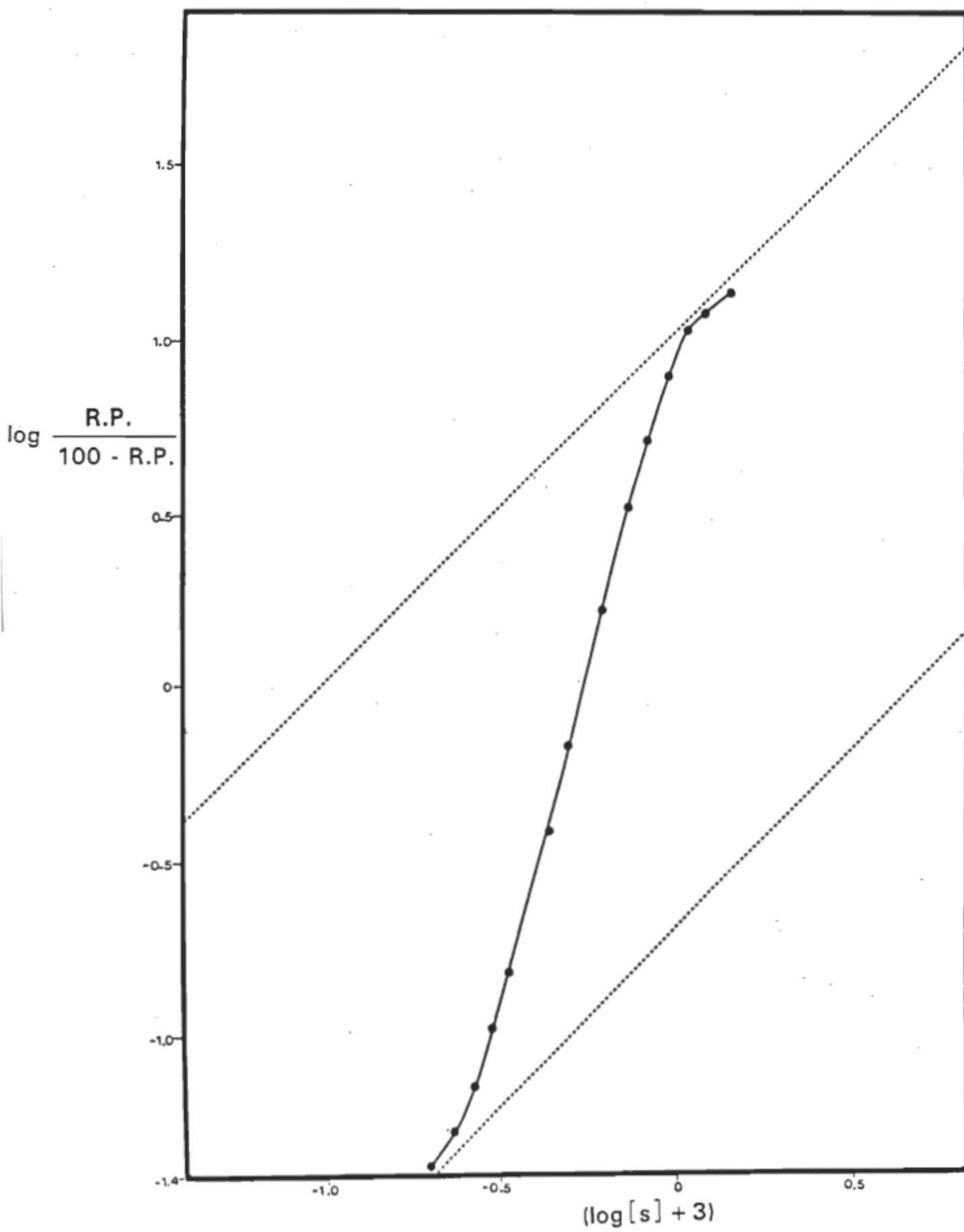
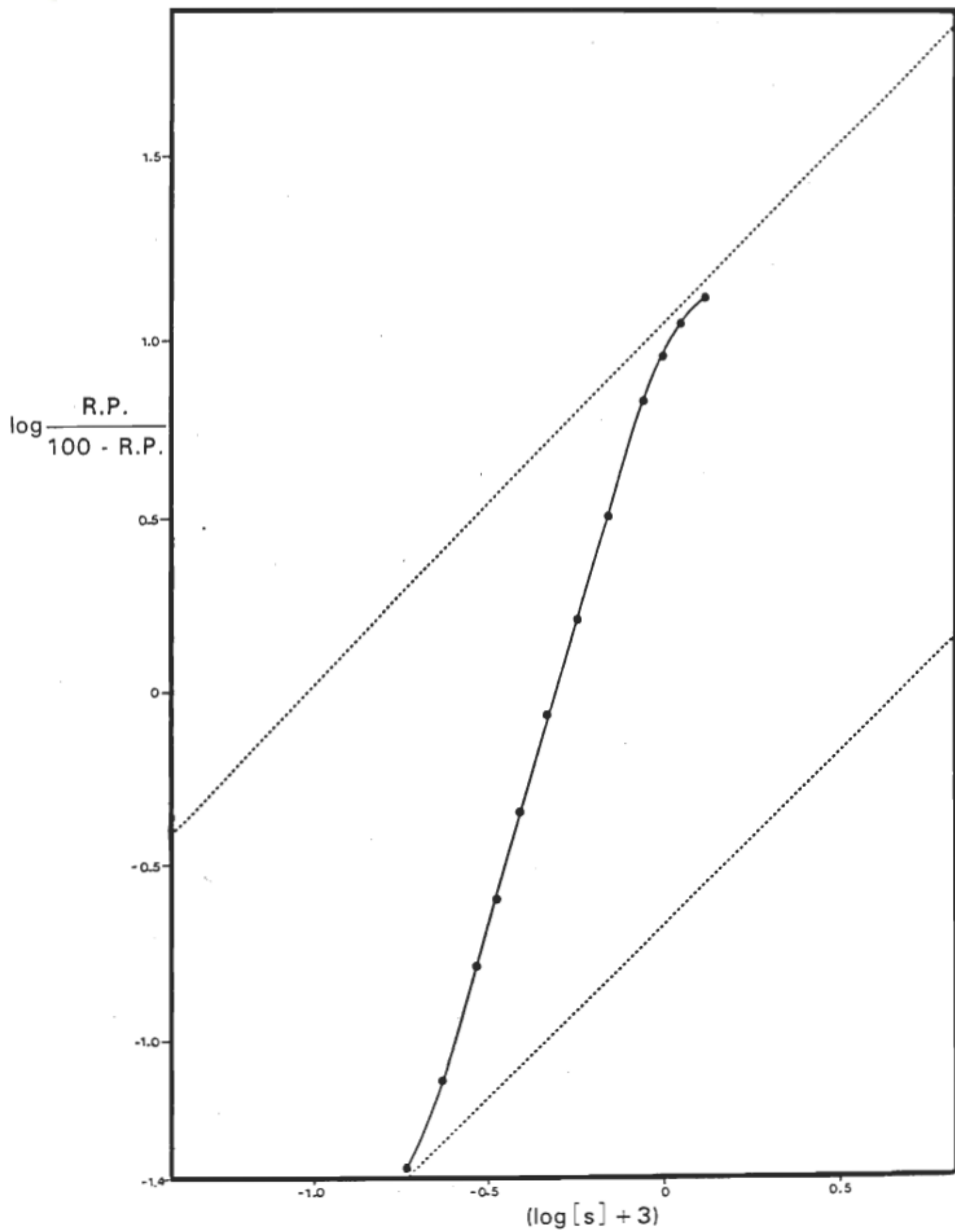


Figure 20. Courbe de Hill, pour l'actine et le MgCl_2 ,
tracée à partir des valeurs de la figure 9.
R.P.=rendement de polymérisation (%), déterminé
par ultracentrifugation.
[S]=concentration de MgCl_2 ; 0 à $2 \times 10^{-3} \text{ M}$
concentration de l'actine=2,0 mg/ml



6-Détermination du nombre de sites de fixation sur l'actine
pour la spermidine. Etude par équilibre de dialyse.

Traitement des résultats selon Scatchard

Nous avons vu que par l'application de la transformée de Hill, nous obtenons une estimation du nombre minimal de sites de fixation de l'agent polymérisant sur l'actine. Par l'expérience basée sur l'équilibre de dialyse, il est possible, en traitant nos résultats selon le modèle de Scatchard, de déterminer le nombre total de sites de fixation de l'agent polymérisant sur l'actine et les constantes d'équilibre. Nous pourrions alors comparer les deux résultats.

La représentation graphique de Scatchard (74) est illustrée à la figure 21; soit le graphe de $\bar{v}/[A]$ en fonction de \bar{v} où \bar{v} correspond au rapport du nombre de moles d'agent polymérisant (spermidine) liées à l'actine sur le nombre total de moles d'actine, et $[A]$ correspond à la concentration d'agent polymérisant libre c'est-à-dire la concentration molaire de spermidine libre.

Nos résultats nous ont permis de tracer deux droites D et D'.

L'intersection de la droite D avec l'abscisse correspond au nombre de sites sur l'actine présentant une haute affinité

pour la spermidine. D'après nos résultats, il y a 3 sites à haute affinité pour la spermidine sur l'actine. Pour cette même classe de sites, nous avons déterminé, en calculant la pente de la droite D, la constante de liaison K régissant la fixation de la spermidine sur ces sites. La valeur de la constante de liaison K, pour cette classe de sites à haute affinité, est $2,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.

Le point d'intersection avec l'abscisse de la seconde droite D' nous indique que le nombre total de sites de fixation de toutes les classes totalise 8. D'après nos résultats, 3 de ces sites étant de haute affinité, il y a donc 5 sites de moindre affinité sur l'actine pour la spermidine. Pour cette seconde droite, nous avons calculé K', la constante apparente de liaison des sites excluant les sites à haute affinité, en utilisant l'équation de Scatchard (35, 74) selon laquelle

$$\bar{v} = \frac{n K [A]}{1 + K [A]} + \frac{n' K' [A]}{1 + K' [A]}$$

où n correspond au nombre de sites à haute affinité pour la spermidine sur l'actine.

K correspond à la constante de liaison de la spermidine aux sites de haute affinité sur l'actine.

n' est égal au nombre de sites de moindre affinité.

K' correspond à la constante de liaison de la spermidine aux sites de moindre affinité sur l'actine.

\bar{V} et $[A]$ ont été définis auparavant.

D'après l'équation de Scatchard, la valeur de K' est de $9 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$.

Le nombre de sites de fixation et les valeurs des constantes de liaison pour les droites D et D' sont présentées au tableau 4.

En résumé, les résultats de cette expérience, traités selon le modèle de Scatchard, nous montrent:

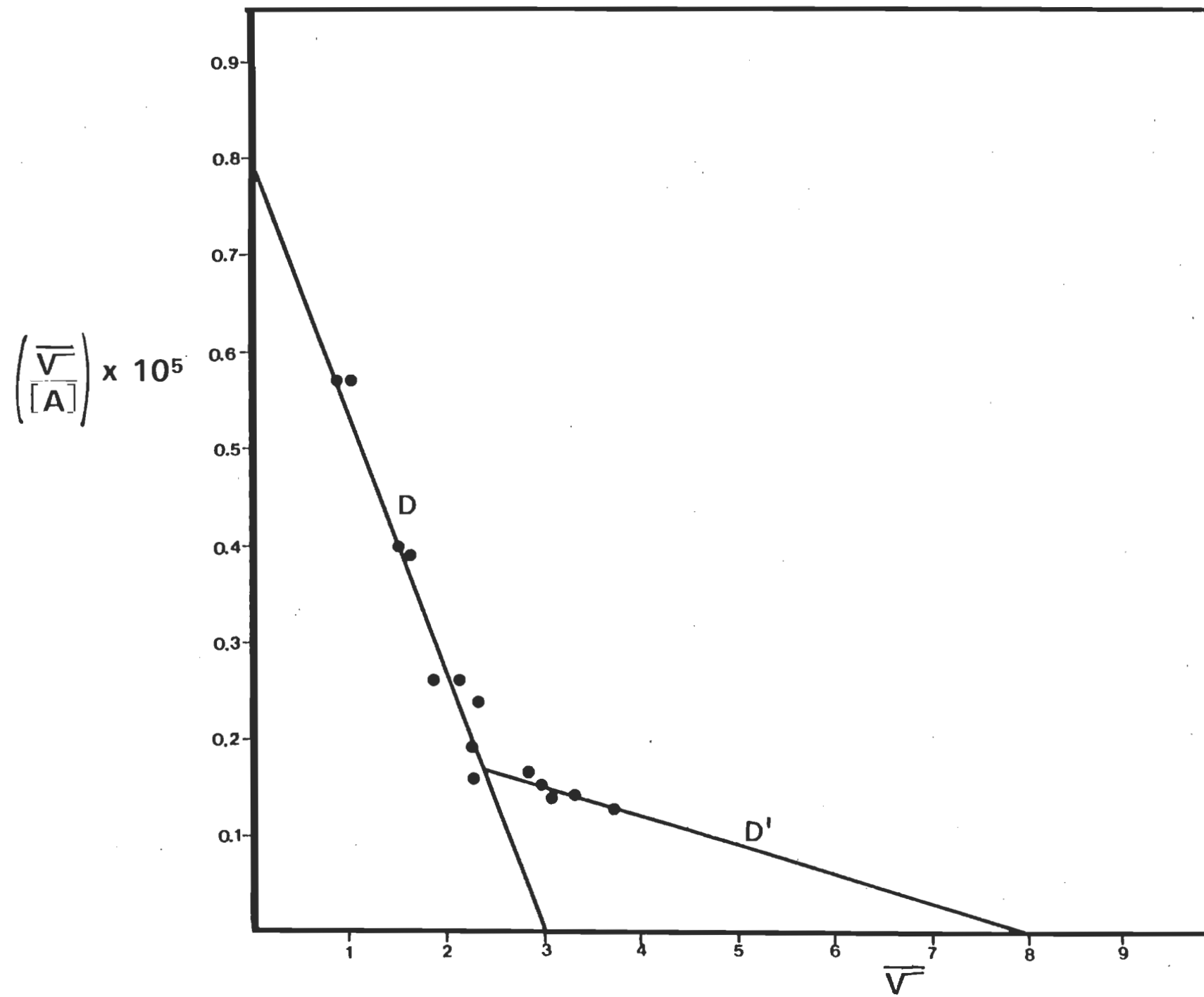
- 1) Qu'il y a sur l'actine trois sites à haute affinité pour la spermidine.
- 2) Que ces sites de fixation à haute affinité pour la spermidine sont régis par une constante de liaison égale à $2,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.
- 3) Qu'il y a, au total, huit sites sur l'actine pour la spermidine.
- 4) Que la constante de liaison des sites, excluant les sites à haute affinité, égale $9,2 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$.

Figure 21. Courbe de Scatchard ou graphe de $\bar{v}/[A]$ en fonction de \bar{v} .

Les résultats proviennent de l'expérience par équilibre de dialyse.

\bar{v} correspond au rapport du nombre de moles de spermidine liées à l'actine sur le nombre de moles d'actine

$[A]$ correspond à la concentration de spermidine libre.



Droite D	Droite D'
$n = 3$ $K = 2,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$	$n' = 5$ $K' = 9,2 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$

Tableau 4. Sites de fixation (n et n') et constantes de liaison (K et K') déterminés par traitement des résultats selon Scatchard (35, 74)

7-Rendement de polymérisation de l'actine en fonction
de la concentration de spermidine liée à l'actine

Dans le but de montrer que c'est la fixation d'un ligand (la spermidine) à l'actine qui entraîne la polymérisation de l'actine, nous avons tracé la courbe des rendements de polymérisation de l'actine en fonction de la concentration de spermidine liée.

Les rendements de polymérisation sont tirés des résultats de la figure 7 et les concentrations de spermidine liée à l'actine proviennent des résultats de la figure 21. Lors de ces deux expériences soit l'étude des rendements de polymérisation de l'actine par la spermidine et l'étude, par équilibre de dialyse, de la fixation de la spermidine à l'actine, la concentration de l'actine du milieu est identique (1mg/ml) et la concentration de spermidine utilisée communément à ces deux expériences varie de 0 à 0,3 mM. Si on néglige la différence de température entre les deux expériences, il est possible de relier la fixation de la spermidine sur l'actine et la polymérisation de cette protéine.

En effet, la figure 22 illustre une courbe d'allure exponentielle qui montre bien la relation existant entre la fixation de la spermidine et le degré de polymérisation de l'actine. Celui-ci augmente à mesure que la concentration de

spermidine liée à l'actine s'élève. Toutefois, l'étroitesse de la gamme des concentrations de spermidine utilisée ne nous permet pas de tirer d'autres conclusions quant au type d'interaction.

8-Variations des concentrations critiques de polymérisation de l'actine en fonction de la concentration de spermidine, de spermine ou de $MgCl_2$

Afin de mettre en évidence la variation de la concentration critique de polymérisation de l'actine en fonction de la concentration d'agent polymérisant, nous avons tracé les courbes de rendement de polymérisation de l'actine en fonction de la concentration d'actine, pour différentes concentrations de spermidine, de spermine ou de $MgCl_2$.

Les courbes résultantes sont présentées aux figures 23, 24, 25.

Sur ces graphiques, le point d'intersection de chaque droite avec l'abscisse correspond à la concentration critique de polymérisation de l'actine. Celles-ci sont regroupées au tableau 5.

Nos résultats montrent que la concentration critique de polymérisation de l'actine dépend de la concentration de l'agent polymérisant: l'augmentation de la concentration de

spermidine, de spermine et de MgCl_2 entraîne une diminution de la concentration critique de polymérisation de l'actine.

[agent polymérisant] (mM)		Concentration critique d'actine (mg/ml)
spermidine	0,80	0,025
	0,40	0,060
	0,30	0,290
	0,20	0,500
spermine	0,40	0,020
	0,30	0,110
	0,25	0,170
	0,20	0,280
MgCl_2	2,50	0,020
	2,00	0,040
	1,00	0,160
	0,50	0,220

Tableau 5. Concentrations critiques de polymérisation de l'actine pour différentes concentrations de spermidine, de spermine ou de MgCl_2

Figure 22. Rendement de polymérisation(%) en fonction de la concentration de spermidine liée (M) à l'actine.

Les rendements de polymérisation proviennent de l'étude de la polymérisation de l'actine par la spermidine (figure 7) et les concentrations de spermidine liée à l'actine sont tirées de l'étude par équilibre de dialyse (figure 21).

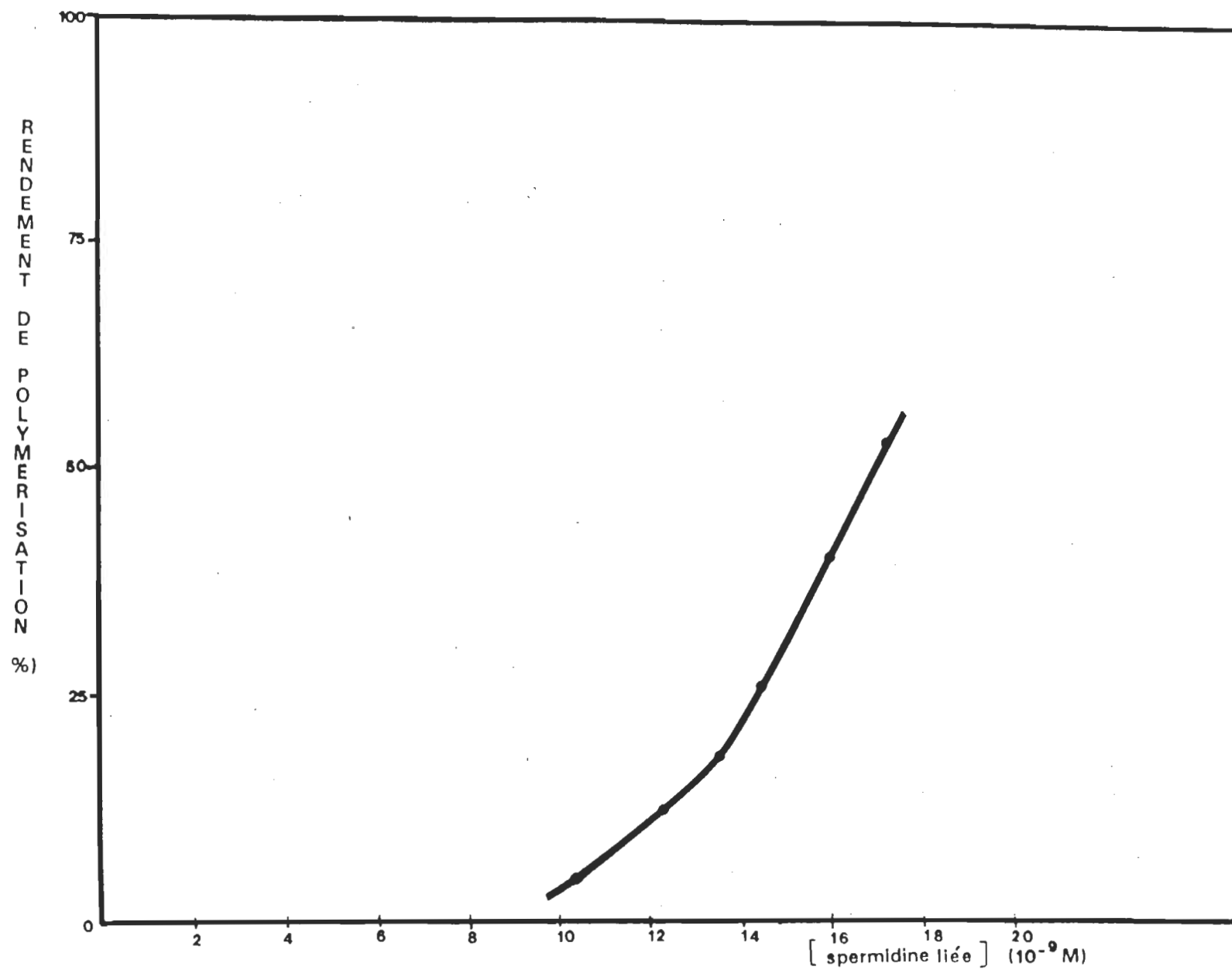


Figure 23. Rendement de polymérisation(%) en fonction de la concentration d'actine (mg/ml) pour différentes concentrations de spermidine (mM).

L'intersection de chaque droite avec l'abs-
cisse correspond à la concentration critique
de polymérisation de l'actine.

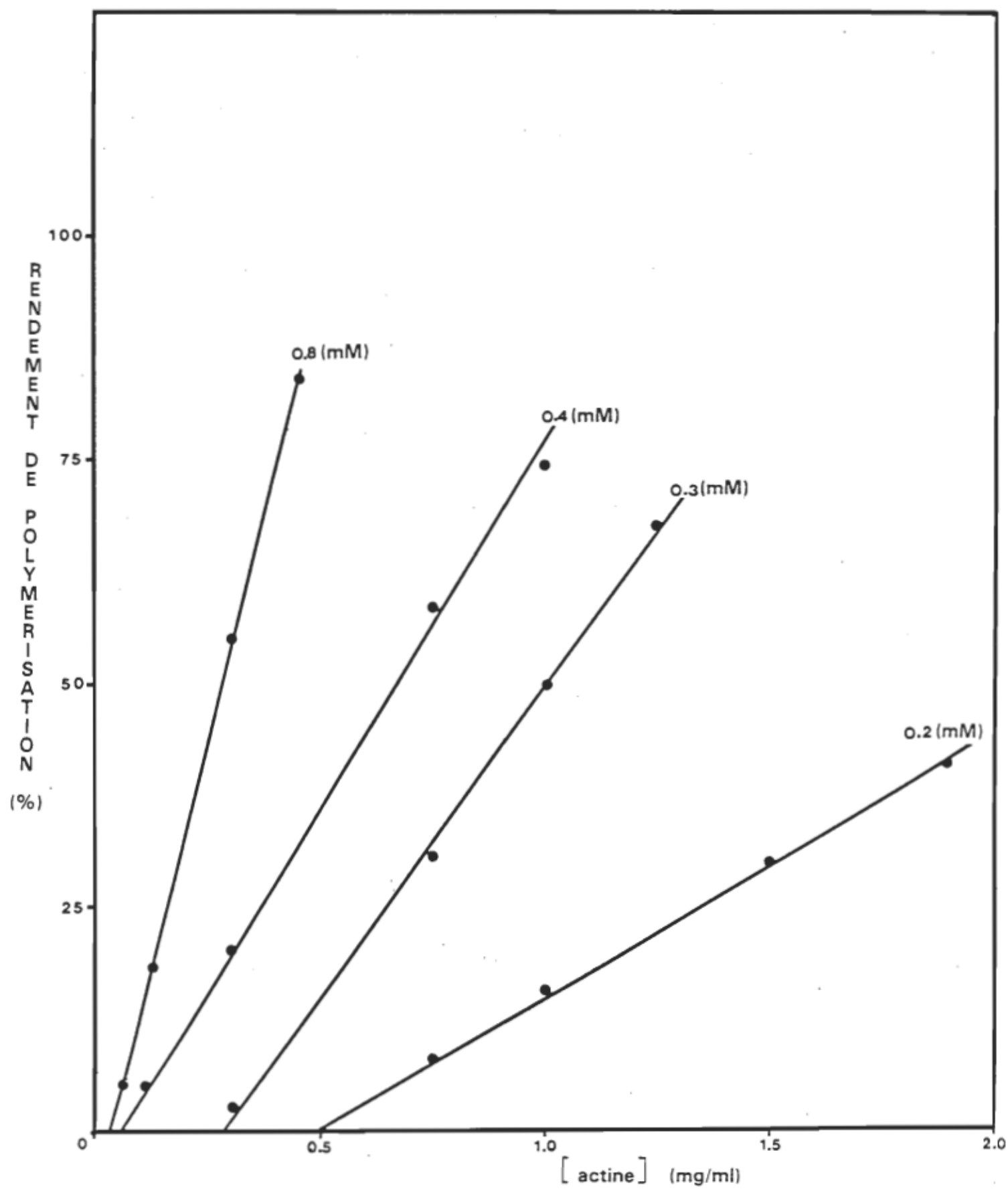


Figure 24. Rendement de polymérisation(%) en fonction de la concentration d'actine (mg/ml) pour différentes concentrations de spermine (mM). L'intersection de chaque droite avec l'abscisse correspond à la concentration critique de polymérisation de l'actine.

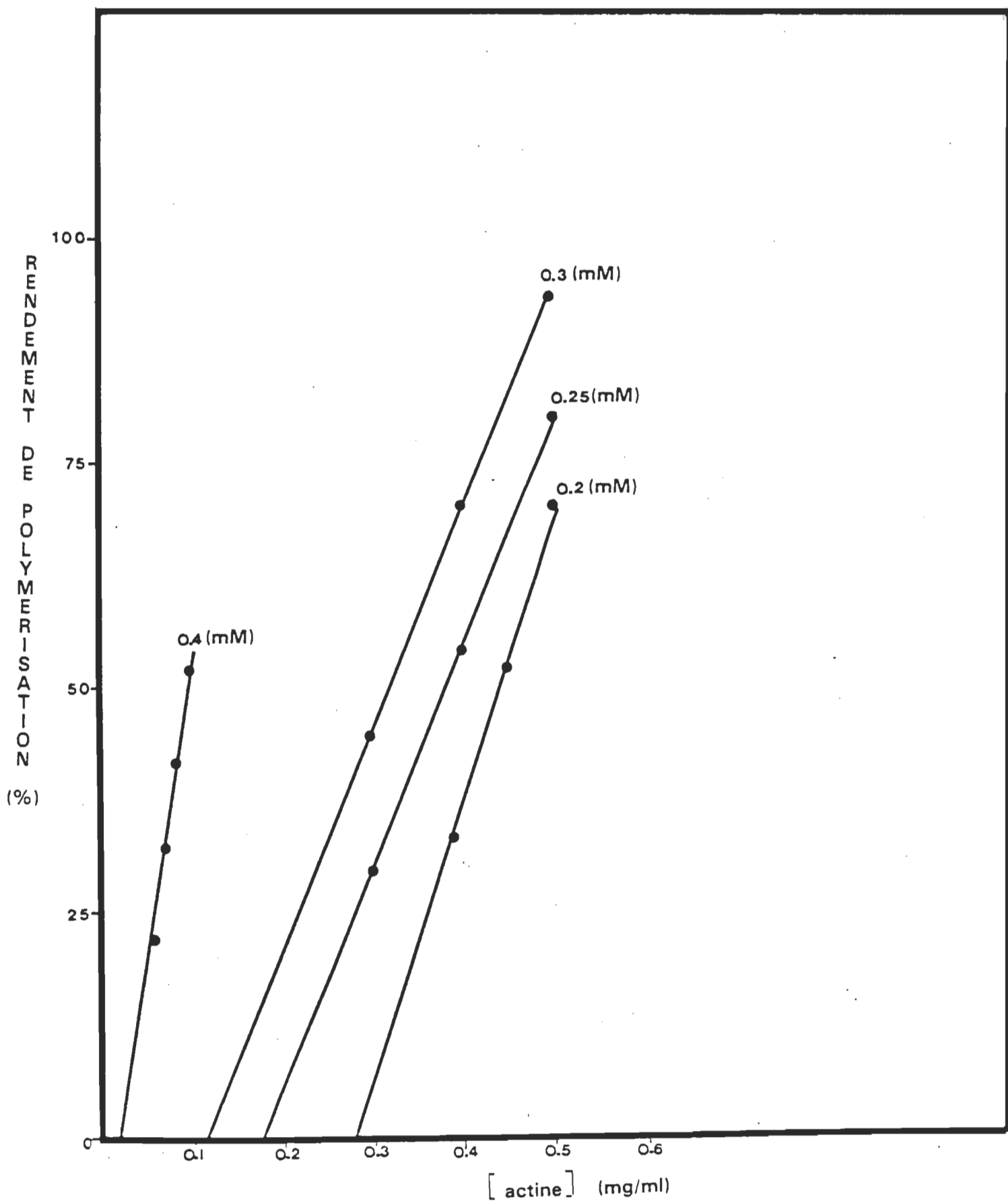
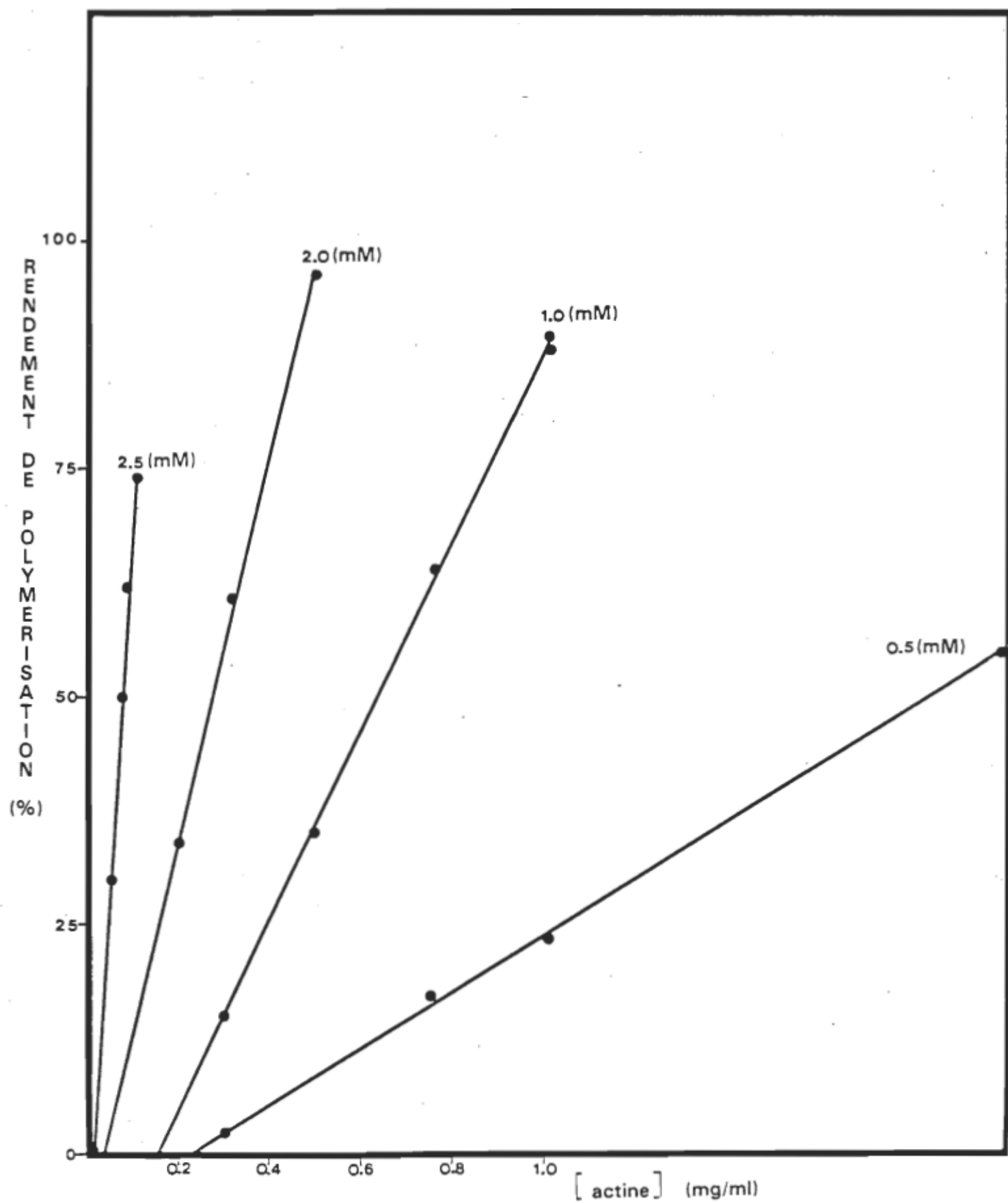


Figure 25. Rendement de polymérisation(%) en fonction de la concentration d'actine (mg/ml) pour différentes concentrations de MgCl_2 .
L'intersection de chaque droite avec l'abscisse correspond à la concentration critique de polymérisation de l'actine.



Discussion

1-Critique de la pureté de l'actine et importance de certains détails techniques

D'après le profil d'élution d'une chromatographie de la préparation d'actine sur Ultrogel AcA 44, la proportion de contaminants présents dans notre préparation est faible, inférieure à 2%; et l'électrophorèse montre qu'une seule bande domine à 42 000 daltons.

La pureté de notre actine se compare donc avantageusement à celle de l'actine utilisée par d'autres auteurs et nous pouvons conclure que l'interférence d'autres protéines contaminantes est probablement négligeable. Par conséquent, les interactions que nous avons observées in vitro sont bien celles de l'actine avec les substances étudiées.

Christine Oriol-Audit, qui a dirigé notre expérimentation, insiste fortement sur deux points techniques qui doivent être respectés lorsqu'on travaille avec l'actine.

Premièrement, l'actine doit être maintenue constamment en dialyse contre un tampon riche en ATP avant d'être utilisée. Cette précaution est extrêmement importante

puisque l'actine se dénature en absence d'ATP. La dialyse contre de l'ATP fournit un apport constant de nucléotides, ce qui ralentit la dénaturation de l'actine.

Deuxièmement, l'actine doit être centrifugée à 90 000 g 150 minutes avant chaque expérience afin d'enlever l'actine dénaturée et les courts filaments vraisemblablement présents dans la solution. Ces courts filaments, rappelons-le, peuvent servir de noyaux et, par conséquent, modifier la cinétique de polymérisation de l'actine.

Selon Oriol-Audit, il est fortement conseillé de prendre ces précautions lors de tout travail avec l'actine et particulièrement lors d'études de cinétique de polymérisation. Dans la plupart des cas, les auteurs (50) qui ont fait ce genre d'études ne semblent pas avoir pris de telles précautions ou du moins ne le mentionnent pas. Il se peut donc que certaines différences entre nos résultats et ceux d'autres auteurs puissent s'expliquer par ces précautions supplémentaires.

2- Comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature

A- Le nombre de sites de fixation sur l'actine

Nous avons étudié l'interaction entre l'actine et les polyamines en déterminant les rendements de polymérisation et par équilibre de dialyse. Les résultats ont été analysés

selon les modèles de Hill et de Scatchard (32, 35, 74). Il s'agit de deux modèles mathématiques théoriques qui décrivent la fixation de ligands sur des macromolécules et permettent de déterminer la valeur des constantes d'affinité, le type de réaction, et le nombre de sites de fixation pour ces ligands.

D'après l'analyse de nos résultats selon Hill, le nombre de Hill qui représente le nombre minimal de sites de fixation de l'agent polymérisant sur l'actine est égal à 3 pour la spermidine, à 4 pour la spermine et à 4 pour l'ion Mg^{2+} .

L'analyse de nos résultats d'après le modèle de Scatchard nous a permis de déterminer un nombre total de 8 sites par mole d'actine pour la spermidine.

Martonosi et coll. (50) ont estimé à 12 le nombre maximal de sites de fixation du Mg^{2+} sur l'actine. Cependant, leurs travaux sont anciens et cette équipe a utilisé 60 000 daltons comme poids moléculaire de l'actine. Le poids moléculaire réel, qui a été déterminé plus tard, est de 42 000 daltons. Strzelecka-Golaszewska et coll. (85) ont corrigé le résultat de l'équipe de Martonosi et ont déterminé qu'il y a 5-7 sites de fixation pour le Mg^{2+} .

Nos résultats concernant le Mg^{2+} , substance qui nous a servi de référence, sont du même ordre de grandeur que ceux

de Martonosi et coll. (n=5-7 sites). Nos résultats sont donc comparables à ceux de la littérature ce qui montre que nos expériences et techniques sont fiables.

Nous avons déterminé 3 et 4 sites pour la spermidine et la spermine mais il est impossible de comparer directement ces résultats avec ceux d'autres auteurs car c'est la première fois que l'on détermine le nombre de sites de fixation de ces agents.

Nous tenons cependant à souligner que le nombre de sites de fixation de ces polyamines est du même ordre de grandeur que ceux des autres cations, incluant le Mg^{2+} , généralement utilisés pour polymériser l'actine (84,85).

Les modèles de Hill et de Scatchard sont, rappelons-le, des modèles théoriques conçus pour étudier la fixation de ligands sur des macromolécules. Dans le cas qui nous intéresse, il y a bien fixation de ligands (les polyamines) sur des macromolécules (les monomères d'actine) mais il se produit en plus un autre phénomène: la polymérisation de l'actine. Cette polymérisation pourrait entraîner une modification de l'affinité des sites pour les ligands. Nos résultats expérimentaux vont donc, par conséquent, différer du modèle théorique de Hill. C'est ce que l'on constate sur nos graphiques des courbes de Hill à faibles et fortes

concentrations d'agents polymérisants. En effet, les extrémités de ces courbes, au lieu d'être asymptotiques par rapport aux droites de pente 1, dévient légèrement des courbes théoriques de Hill. Par conséquent, une certaine imprécision peut être liée à la détermination des constantes d'affinité par la méthode de Hill. L'interaction entre l'actine et les polyamines ne correspond donc pas parfaitement au modèle de Hill.

Dans l'expérience d'équilibre de dialyse, nos conditions expérimentales sont telles qu'en partie l'actine est à l'état de monomères, en partie à l'état de polymères. On peut se demander si le nombre de sites pour la spermidine sur le monomère est le même que sur le polymère, et si ces sites ont la même affinité dans le monomère que dans le polymère?

Le modèle de Scatchard a été développé pour étudier la fixation d'un ligand sur une macromolécule. Or, dans notre système, nous avons deux espèces de macromolécules: le monomère d'actine et un ensemble de polymères-spermidine de longueurs variables. Si au cours de la polymérisation de l'actine, il y a variation du nombre ou de l'affinité des sites de l'actine causée par le phénomène de polymérisation, alors le modèle de Scatchard n'est pas tout à fait approprié pour ce genre d'étude. Martonosi et coll. (50) qui ont fait le même type d'expérience ont dû rencontrer la même

difficulté d'interprétation mais ils ne l'évoquent pas dans leurs travaux.

Pour contourner cette difficulté, on pourrait, en principe, travailler en-dessous de la concentration critique de polymérisation de l'actine où toute l'actine est à l'état de monomères. Cependant, la concentration d'actine est très faible dans ces conditions, et par conséquent la quantité de spermidine liée à l'actine trop basse et ne peut être comptée avec précision.

Comme le montre la figure 22, la fixation de ligands sur l'actine et la polymérisation de l'actine sont des phénomènes interdépendants. En conséquence, les résultats, tirés de l'application des modèles de Hill et de Scatchard qui ne tiennent pas compte de la polymérisation de l'actine, ne reflètent peut-être pas exactement la réalité du phénomène. Toutefois, ces deux modèles sont les seuls actuellement utilisables et il n'en existe pas d'autres, à notre connaissance, qui tiennent compte de la polymérisation de l'actine. Cependant, la déviation de nos courbes expérimentales par rapport aux courbes théoriques est quand même assez faible ce qui signifie probablement que la polymérisation de l'actine interfère peu avec la fixation de ligands sur l'actine. Les modèles de Hill et Scatchard sont donc, quand même, une approximation valable du phénomène.

Nous n'avons pas entrepris d'études par équilibre de dialyse avec la spermine parce que cette polyamine induit la formation d'agrégats d'actine ("loose bundles" de la littérature anglaise) qui d'après Oriol-Audit (56) seraient dûs au pontage des filaments entre eux par les molécules de spermine, longues et flexibles. Il y a donc fixation d'un plus grand nombre de molécules qui ne peuvent être différenciées de celles qui induisent la polymérisation en filaments non agrégés. Par conséquent, le phénomène devient très difficilement interprétable par le modèle de Scatchard.

B-Les classes de sites

Dans la littérature, on considère qu'il existe deux ensembles de sites pour les cations divalents sur le monomère d'actine (3, 16, 44, 50, 53, 82), soit une classe de sites à haute affinité et une classe de sites à faible affinité. Pour le cation Mg^{2+} , la classe de sites à haute affinité est constituée d'un seul site dont la constante d'affinité est de l'ordre de $10^5 M^{-1}$ (48, 50) et la classe de sites à faible affinité renferme, rappelons-le, 5-7 sites caractérisés par une constante d'affinité de l'ordre de $10^3 M^{-1}$ (50).

D'après l'analyse de nos résultats selon le modèle de Hill, nous trouvons également deux classes de sites sur l'actine pour le Mg^{2+} . Les valeurs des constantes d'affinité pour le Mg^{2+} (10^4 et $10^2 M^{-1}$) sont différents d'un ordre de

grandeur de celles trouvées par l'équipe de Martonosi (10^5 et 10^3 M^{-1}). Cet écart tient peut-être à l'imprécision liée au calcul des constantes d'affinité par la méthode de Hill ou aux erreurs expérimentales.

D'après nos résultats, les constantes d'affinité pour les sites à haute et faible affinité pour la spermidine et la spermine sont de l'ordre de 10^4 et 10^2 M^{-1} . Nous ne pouvons comparer ces valeurs avec la littérature puisque c'est la première fois que les constantes d'affinité de ces polyamines pour l'actine ont été mesurées.

Nous tenons toutefois à souligner que les constantes d'affinité que nous avons déterminées sont du même ordre de grandeur pour les 3 substances quoique leurs structures soient très différentes.

3- Relation entre les différences structurales des polyamines comparativement au Mg^{2+} et leur mode d'interaction avec l'actine

Il est admis dans la littérature (3, 6, 53, 82) que la polymérisation de l'actine par le magnésium résulte de la réduction de la charge négative nette du monomère suite à la fixation de cations Mg^{2+} sur des sites anioniques. Cette fixation amène un changement conformationnel du monomère et entraîne la polymérisation de l'actine (70).

Il existe une différence structurale entre le magnésium et les polyamines: l'ion Mg^{2+} possède deux charges positives rapprochées comparativement aux polyamines spermidine et spermine qui ont respectivement 3 et 4 charges positives séparées par une chaîne aliphatique. Compte tenu de la différence de structure, la spermidine et la spermine ont-elles le même mode d'action avec l'actine que le Mg^{2+} ou les autres cations qui polymérisent l'actine?

Il est probable que l'interaction entre l'actine et les polyamines soit de type ionique en raison même de la charge de ces polycations. De plus, les courbes de rendement de polymérisation de l'actine par la spermidine, la spermine et le Mg^{2+} sont semblables ce qui est un argument en faveur, mais non une preuve, d'un mécanisme d'interaction analogue. D'autre part, Oriol-Audit (56) a montré que les filaments polymérisés par les polyamines ont les mêmes propriétés physiques et biochimiques que les filaments polymérisés par le Mg^{2+} : leur structure est identique, ils activent la Mg^{2+} -ATPase de la myosine, les profils de dichroïsme circulaire induits par l'actine F-polyamines et l'actine F- Mg^{2+} sont similaires et dans les deux cas, la polymérisation est réversible.

Quel que soit le type d'interaction entre l'actine et les polyamines, on peut se demander si les sites anioniques

sur l'actine auxquels se lient les ions Mg^{2+} sont les mêmes que ceux qui lient les polyamines? Cela semble peu probable. "Un site Mg^{2+} , comme un site Ca^{2+} , doit impliquer une chélation par plusieurs acides aminés venant de points différents de la structure tertiaire mais dont le regroupement dans l'espace forme un site. Ce site se situe dans la partie N-terminale de l'actine. Les sites à haute affinité pour la spermidine se situent vraisemblablement dans la partie N-terminale et doivent impliquer la séquence de 4 acides aminés carboxyliques" (Christine Oriol-Audit, communication personnelle).

D'autre part, les molécules de spermidine et de spermine ont respectivement 3 et 4 charges positives. Une seule de ces molécules comble-t-elle un site sur l'actine ou 2, 3 ou 4 sites simultanément? On ne peut répondre directement à cette question, mais il est possible que chaque acide aminé carboxylique de la partie N-terminale de l'actine constitue un site du fait de la liaison susceptible de se former avec la spermidine. Cependant, si tel est le cas, le nombre de sites pour la spermidine que nous avons déterminé par Scatchard doit être inférieur au nombre réel de sites, puisque par équilibre de dialyse, nous avons mesuré le nombre de moles de spermidine fixées par mole d'actine, sans toutefois savoir si une molécule sature un site ou plusieurs simultanément. Dans l'éventualité où une molécule de

polyamine occuperait plusieurs sites sur l'actine, il y aurait une différence fondamentale entre le mode d'action des polyamines et celui du Mg^{2+} puisque ce cation, quoiqu'ayant deux charges positives très rapprochées, ne peut se fixer qu'à un site.

4- Parallèle entre nos conditions expérimentales et celles qui prévalent in vivo. Implications biologiques

Une question fondamentale est de savoir si la polymérisation de l'actine que nous avons mise en évidence in vitro peut aussi se produire in vivo?

D'après nos résultats, les concentrations efficaces de polyamines pour polymériser l'actine in vitro sont de l'ordre du millimolaire. C'est dans cette zone de concentrations que se trouvent les polyamines dans certains tissus et fluides biologiques (pancréas, prostate, liquide séminal) (62, 99). D'autre part, dans la cellule, l'actine est à une concentration élevée de l'ordre du mg/ml (46) ce qui est largement supérieur aux concentrations critiques de polymérisation de l'actine que nous avons mesurées in vitro en présence de polyamines. Comme l'interaction actine-polyamines se produit pour des concentrations qui existent in vivo, il se pourrait donc qu'elle se produise aussi dans la cellule.

Cependant, dans la cellule, le système est plus complexe car d'autres facteurs, susceptibles d'interférer avec ce phénomène sont présents (46).

Par exemple, les cations cellulaires (K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) sont à concentrations suffisantes in vivo pour déclencher la polymérisation de l'actine indépendamment de la présence des polyamines.

De plus, dans la cellule, un contrôle est exercé sur l'état de polymérisation de l'actine par un certain nombre de protéines. Par exemple, la profiline forme un complexe 1:1 avec l'actine G et empêche alors sa polymérisation. Certaines protéines limitent l'élongation du filament d'actine et des "actin-binding-proteins" contribuent à la formation de super-structures d'actine.

Dans l'état actuel des connaissances, aucun travail n'a permis de conclure à une interaction directe ou indirecte des polyamines sur l'actine in vivo. Il serait intéressant, à notre avis, d'étudier l'interaction éventuelle des polyamines avec les protéines régulatrices de la polymérisation de l'actine, lors de la cytodivision.

Toutefois, d'après nos résultats, il semble possible que les polyamines interviennent in vivo au cours du processus de

polymérisation de l'actine, lors de la cytodierèse. Cette conclusion est confirmée par Grant et coll. (26) qui ont démontré, par micro-injection dans des oeufs non fertilisés de Xenopus laevis, que la cytodierèse est déclenchée par des concentrations cellulaires de polyamines de l'ordre du millimolaire. Gawlitta et Stockem (24) ont obtenu des résultats similaires par micro-injection de spermine chez Amoeba proteus.

BIBLIOGRAPHIE

1. Abraham, K.A. Studies on DNA-dependent RNA polymerase from Escherichia coli: The mechanisms of polyamine induced stimulation of enzyme activity. Eur. J. Biochem., 1968, 5, 143-146.
2. Abrams, A.J. The release of bound adenosinetriphosphatase from isolated bacterial membranes and the properties of the solubilized enzyme. J. Biol. Chem., 1965, 240, 3675-3681.
3. Asakura, S.; Hotta, K.; Imai, N.; Ooi, T.; Oosawa, F. Transformation of actin by divalent cations. Conference on the chemistry of muscular contraction. vol. 53, 1958, Igaku Shoin, Ltd, Tokyo.
4. Aubin, J.; Weber, K.; Osborn, M. Analysis of actin and microfilament-associated proteins in the mitotic spindle and cleavage furrow of PtK₂ cells by immunofluorescence microscopy. Exp. Cell Res., 1979, 124, 93-109.
5. Bachrach, U. Function of naturally occurring polyamines. Academic Press., N.Y., 1973, 211p.

6. Barany, M.; Biro, N.A.; Molnar, J. The reaction between actin and divalent cations, Acta Physiol. Acad, Sci. Hung., 1954, 5, 63-78.
7. Barany, M.; Finkelman, F.; Theratriil-Antony, T. Studies on the bound calcium of actin. Arch. Biochem. Biophys., 1962, 98, 28-45.
8. Barden, J.A.; Curmi, P.M.G.; Dos Remedios, C.G. Cristalline actin tubes. The interactions of scandium and yttrium with skeletal muscle actin. Biochim. Biophys. Acta, 1981, 671, 25-32.
9. Barden, J.A.; Curmi, P.M.G.; Dos Remedios, C.G. Cristalline actin tubes. The effect of the Th^{4+} on actin and the role of ionic charge in tube formation. J. Biochem., 1982, 92, 1319-1323.
10. Bardsley, W.G.; Hill, C.M.; Lobley, R.W. A reinvestigation of the substrate specificity of pig kidney diamine oxidase. Biochem. J., 1970, 117, 169-176.
11. Bucher, N. Regeneration of mammalian liver. Int. Rev. Cytol., 1963, 15, 245-300.
12. Chun, P.W.; Rennert, O.M.; Saffen, E.E.; Taylor, W.J.

- Effects of polyamines on the electrokinetic properties of red blood cells. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1976, 69, 1095-1101.
13. Cohen, S.S. Introduction to the polyamines., Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J., 1971, 179p.
14. Cox, R. Polyamines inhibit DNA methylation in vitro. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1979, 86, 594-598.
15. Dos Remedios, C.G.; Dickens, M.J. Actin microcrystals and tubes formed in the presence of gadolinium ions. Nature, 1978, 276, 731-733.
16. Dykstra, W.J., Jr.; Herbst, E.J. Spermidine in regenerating liver: relation to rapid synthesis of ribonucleic acid. Science, 1965, 149, 428.
17. Emanuelson, H.; Heby, O. Inhibition of putrescine synthesis blocks development of the polychete Ophryotrocha labronica at gastrulation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1978, 75, 1039-1042.
18. Engel, J.; Fasold, H.; Hulla, F.W.; Waechter, F.; Wegner, A. The polymerization reaction of muscle actin. Mol. Cell Biochem., 1977, 18, 3-13.

19. Fairbanks, G.; Steck, T.L.; Wallack, D.F.H. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocytes membrane. Biochemistry, 1971, 10, 2606-2617.
20. Flink, I.; Petijohn, D.E. Polyamines stabilize DNA folds. Nature (London), 1975, 253, 62-63.
21. Friedman, S.M.; Axel, R.; Weinstein, I.B. Stability of ribosomes and ribosomal ribonucleic acid from Bacillus stearothermophilus. J. Bacteriol., 1967, 93, 1521-1526.
22. Fujiwara, K.; Pollard, T.D. Fluorescent antibody localization of myosin in the cytoplasm, cleavage furrow and mitotic spindle of human cells. J. Cell Biol., 1976, 71, 848-875.
23. Fujiwara, K.; Porter, M.E.; Pollard, T.D. Alpha-actinin localization in the cleavage furrow during cytokinesis. J. Cell Biol., 1978, 79, 268-275.
24. Gawlitta, W.; Stockem, W. Visualization of actin polymerization and depolymerization cycles during polyamine-induced cytokinesis in living Amoeba proteus. Cell Tissue Res., 1981, 215, 249-261.

25. Goyns, M.H. The role of polyamines in animal cell physiology. J. Theor. Biol., 1982, 97, 577-589.
26. Grant, N.J.; Aimar, C.; Oriol-Audit, C. Effects of polyamine on the first division cycle of Xenopus laevis eggs. Exp. Cell Res., 1984, 150, 483-487.
27. Heby, O. Role of polyamines in the control of cell proliferation and differentiation. Differentiation, 1981, 19, 1-20.
28. Heby, O.; Jänne, J. Polyamine antimetabolites: biochemistry, specificity, and biological effects of inhibitors of polyamine synthesis. In: Polyamines in Biology and Medicine. (D.R. Morris and L.J. Marton, eds.), Marcel Dekker, N.Y., 1981, 459p., pp.243-310.
29. Heby, O.; Marton, L.J.; Gray, J.W.; Lindl, P.A.; Wilson, C.B. Proc. 9th Cong. Nordic Soc. Cell Biol., 1976, 155-164.
30. Heby, O.; Sarna, G.P.; Marton, L.J.; Omine, M.; Perry, S.; Russel, D.H. Polyamine content of AKR leukemic cells in relation to the cell cycle. Cancer Res., 1973, 33, 2959-2964.

31. Herman, I.M.; Pollard T.D. Actin localization in fixed dividing cells stained with fluorescent heavy meromyosin Exp. Cell Res., 1978, 114, 15-25.
32. Hill, A.V. J. Physiol. (London), 1910, 40, 4-7.
33. Hogan, B.L.M.; Mc Ilhinney, A.; Murden, S. Effect of growth conditions on the activity of ornithine decarboxylase in cultured hepatoma cells. II. Effect of serum and insulin. J. Cell Physiol., 1974, 83, 353-358.
34. Hogan, B.; Shields, R.; Curtis, D. Effect of cyclic nucleotides on the induction of ornithine decarboxylase in BHK cells by serum and insulin. Cell, 1974, 2, 229-233.
35. Holde van, K.E. Chemical Equilibrium. in: Physical Biochemistry, 2nd Ed. Prentice-Hall Inc. Ed., 1985, (287 p.). p. 51-92.
36. Hölttä, E.; Jänne, J. Ornithine decarboxylase activity and the accumulation of putrescine at early stages of liver regeneration. FEBS letters, 1972, 23, 117-121.
37. Houk, T.W.; Ue, K. The measurement of actin concentration in solution: a comparison of methods.

Anal. Biochem., 1974, 62, 66-74.

38. Hunter, A.R.; Farrell, J.F.; Jackson, J.R.; Hunt, T. The role of polyamines in cell-free protein synthesis in the wheat-germ system. Eur. J. Biochem., 1977, 75, 149-157.
39. Huxley, H.E. Electron microscope studies on the structure of natural and synthetic protein filaments from striated muscle. J. Mol. Biol., 1963, 7, 281-308.
40. Jänne, J. Studies on the biosynthetic pathway of polyamines in rat liver. Acta Physiol. Scand., 1967, 300, 1-71.
41. Jänne, J.; Raina, A. Stimulation of spermidine synthesis in the regenerating rat liver. Relation to increased ornithine decarboxylase activity. Acta Chem. Scand., 1968, 22, 1349-1351.
42. Jänne, J.; Shenone, A.; Williams-Ashman, H.G.
Separation of two proteins required for synthesis of spermidine from S-adenosyl-L-methionine and putrescine in rat prostate. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1971, 42, 758-764.
43. Kasai, M.; Oosawa, F. The exchangeability of actin-bound

- calcium with various divalent cations. Biochim. Biophys. Acta, 1968, 154, 520-528.
44. Kawamura, M.; Maruyama, K. Polymorphism of F-actin. I. three forms of paracrystals. J. Biochem. (Tokyo), 1970, 68, 885-889.
45. Korn, E.D. Biochemistry of actomyosin-dependent cell motility (a review). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1978, 75, 588-599.
46. Korn, E.D. Actin polymerization and its regulation by protein from nonmuscle cells. Physiol Rev., 1982, 62, 672-738.
47. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London), 1970, 227, 680-685.
48. Loscalzo, J.; Reed, G.H. Spectroscopic studies of actin-metal-nucleotide complexes. Biochemistry, 1976, 15, 5407-5413.
49. Martonosi, A.; Gouvea, M.; Gergely, J. Studies on actin. I. The interaction of ^{14}C -labeled adenine nucleotides with actin. J. Biol. Chem., 1960, 235, 1700-1703.

50. Martonosi, A.; Molino, C.M.; Gergely, J. The binding of divalent cations to actin. J. Biol. Chem., 1964, 239, 1057-1064.
51. Mc Cann, P.P; Tardif, C.; Mamont, P.S.; Schuber, F. Biphasic induction of ornithine decarboxylase and putrescine levels in growing HTC cells. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1975, 64, 336-341.
52. Mockrin, S.C.; Korn, E.D. Isolation and characterization of covalently cross-linked actin dimer. J. Biol. Chem., 1981, 256, 8228-8233.
53. Mommaerts, W.F. The molecular transformation of actin. I. Globular actin. J. Biol. Chem., 1952, 198, 459-467.
54. Morris, D.R. RNA and protein synthesis in a polyamine-requiring mutant of Escherichia coli. In Polyamines in normal and neoplastic growth-(Russel D.H. ed.), Raven Press, 1973, N.Y., 441 p., pp. 111-122.
55. Oosawa, F.; Kasai, M. Actin. In: Subunits in Biological Systems. Part. A. (Timasheff S.N. and Fasman G.D. eds.) N.Y. Dekker, 1971, 408p., pp.261-322.
56. Oriol-Audit, C. Polyamine-induced actin polymerization.

- Eur. J. Biochem., 1978, 87, 371-376.
57. Oriol-Audit, C. Possible inducers of actin polymerization in the cell. Acta Protozool., 1979, 18, 187-188.
58. Oriol-Audit, C. Induction of cytokinesis by interaction between actin and polyamines. Biochimie, 1980, 62, 713-714.
59. Oriol-Audit, C. Actin-polyamines interaction: relationship between physicochemical properties and cytokinesis induction. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1982, 105, 1096-1101.
60. Panko, W.B.; Kenney, F.T. Hormonal stimulation of hepatic ornithine decarboxylase. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1971, 43, 346-350.
61. Pardee, J.D.; Spudich, J.A. Purification of muscle actin. Methods in Enzymology, 1982, 85, 164-182.
62. Pegg, A.E.; Lockwood, D.H.; Williams-Ashman, H.G. Concentrations of putrescine and polyamines and their enzymatic synthesis during androgen-induced prostatic growth. Biochem. J., 1970, 117, 17-31.

63. Pegg, A.E.; Williams-Ashman, H.G. Stimulation of the decarboxylation of S-adenosylmethionine by putrescine in mammalian tissues. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1968, 30, 76-82.

64. Pegg, A.E.; Williams-Ashman, H.G. On the role of S-adenosyl-L-methionine in the biosynthesis of spermidine by rat prostate. J. Biol. Chem., 1969, 244, 682-693.

65. Quash, G.; Taylor, D.R. Serum β -aminopropionaldehyde: Identification and origin. Clin. Chim. Acta, 1970, 30, 17-23.

66. Raina, A.; Jänne, J.; Sümes, M. Stimulation of polyamine synthesis in relation to nucleic acids in regenerating rat liver. Biochim. Biophys. Acta, 1966, 123, 197-201.

67. Rao, P.N.; Johnson, R.T. Mammalian cell fusion. IV. Regulation of chromosome formation from interphase nuclei by various chemical compounds. J. Cell. Physiol., 1971, 78, 217-224.

68. Rappaport, R. Establishment and organization of the cleavage mechanism. In: Molecules and Cell Movement. (Inoue S., Stephens R.E. eds)., Raven Press N.Y.,

- 1975, (450p.), pp. 287-304.
69. Rees, M.K.; Young, M. Studies on the isolation and molecular properties of homogeneous globular actin. J. Biol. Chem., 1967, 242, 4449-4458.
70. Rich, S.A., Estes, J.E. Detection of conformational changes in actin by proteolytic digestion: evidence for a new monomeric species. J. Mol. Biol., 1976, 104, 777-792.
71. Russel, D.H. Polyamines in growth-normal and neoplastic. In: Polyamines in Normal and Neoplastic growth-(Russel D.H. ed.), Raven Press N.Y., 1973, 441p., pp.1-14.
72. Russel, D.H.; Durie, B.G.M. Polyamines as Biochemical markers of Normal and Malignant Growth. Raven Press., N.Y., 1978, 192p.
73. Sanger, J.W. Changing patterns of actin localization during cell division. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1975, 72, 1913-1916.
74. Scatchard, G. The attraction of proteins for small molecules and ions. Ann. N.Y. Acad. Sci., 1949, 51, 660-672.

75. Schroeder, T.E. Cytokinesis: filaments in the cleavage furrow. Exp. Cell Res., 1968, 53, 272-276.
76. Schroeder, T.E. The contractile ring. I. Fine structure of dividing mammalian (HeLa) cells and the effects of cytochalasin B. Z.Zellforsch. Mikrosk. Anat., 1970, 109, 431-449.
77. Schroeder, T.E. The contractile ring. II. Determining its brief existence, volumetric changes, and vital role in cleaving Arbacia eggs. J. Cell Biol., 1972, 53, 419-434.
78. Seraydarian, K.; Briskey, E.J.; Mommaerts, W.F.H.M. The modification of actomyosin by α -actinin. I. A survey of experimental conditions. Biochim. Biophys. Acta, 1967, 133, 399-411.
79. Spisni, A.; Sechi, A.M.; Guadagnini, P.; Masotti, L. Effetto delle poliamine su membrane mitocondriali: studi con sonde fluorescenti. Boll.-Soc. Ital. Biol. Sper., 1976, 52, 487-492.
80. Stastny, M.; Cohen, S. Epidermal growth factor: IV. The induction of ornithine decarboxylase. Biochim. Biophys. Acta, 1970, 204, 578-589.

81. Stevens, L.; Stevens, E. Inhibitors of the biosynthesis of putrescine, spermidine and spermine. In: Polyamines in Biomedical Research. (J.M. Gougas, ed.), John Wiley and Sons, N.Y., 1980, 474p., pp.167-183.

82. Straub, F.B. Actin. Stud. Szeged, 1942, 2, 3-15.

83. Straub, F.B.; Feuer, G. Adenosine triphosphate, the functionnal group of actin. Biochim. Biophys. Acta, 1950, 4, 455-470.

84. Strzelecka-Golaszewska, H.E.; Prochniewicz, E.; Drabikowski, W. Interaction of actin with divalent cations. I. The effect of various cations on the physical state of actin. Eur. J. Biochem., 1978, 88, 219-227.

85. Strzelecka-Golaszewska, H.; Prochniewicz, E.; Drabikowski, W. Interaction of actin with divalent cations. Characterization of protein-metal complexes. Eur. J. Biochem., 1978, 88, 229-237.

86. Sunkara, P.S.; Rao, P.N.; Nishioka, K.; Brinkley, B.R. Role of polyamines in cytokinesis of mammalian cells. Exp. Cell Res., 1979, 119, 63-68.

87. Tabor, C.W. Stabilization of protoplasts and spheroplasts by spermine and other polyamines. J. Bacteriol., 1962, 83, 1101-1111.
88. Tabor, H. Tabor, C.W. Spermidine, spermine and related amines. Pharmacol. Rev., 1964, 16, 245-300.
89. Tabor, H.; Tabor, C.W. Biosynthesis and metabolism of 1,4-diaminobutane, spermidine, spermine and related amines. Adv. Enzymol., 1972, 36, 203-268.
90. Tabor, C.W.; Tabor, H. 1,4-Diaminobutane (putrescine), spermidine and spermine. Ann. Rev. Biochem., 1976, 45, 285-306.
91. Tabor, C.W.; Tabor, H.; McEwen, C.M., Jr.; Kellogg, P.D. Further studies of the aminoaldehydes formed by the enzymatic oxidation of spermine and spermidine. Fed. Proc., 1964, 23, 385.
92. Tobacman, L.; Korn, E.D. The kinetics of actin nucleation and polymerization. J. Biol. Chem., 1983, 258, 3207-3214.
93. Van Dijk-Salkinoja, M.S.; Planta, R.J. Effects of tris and oligoamines on the ribosomal size distribution in

- lysates of B. licheniformis. FEBS letters, 1970, 12, 9-13.
94. Waechter, F.; Engel, J. The kinetics of the exchange of G-actin-bound: N6-ethenoadenosine 5'-triphosphate with ATP as followed by fluorescence. Eur. J. Biochem., 1975, 57, 453-459.
95. Wegner, A. Head to tail polymerization. J. Mol. Biol., 1976, 108, 139-150.
96. Wegner, A. Treadmilling of actin at physiological salt concentrations. An analysis of the critical concentrations of actin filaments. J. Mol. Biol., 1982, 161, 607-615.
97. Wegner, A.; Engel J. Kinetics of the cooperative association of actin to actin filaments. Biophys. Chem., 1975, 3, 215-225.
98. Wieland, T.; Faulstich, H. Amatoxins, phallotoxins, phallolysin and antamanide: The biologically active components of poisonous Amanita mushrooms. Crit. Rev. Biochem., 1978, 5, 185-260.
99. Williams-Ashman, H.G.; Lockwood, D.H. Role of polyamines

in reproductive physiology and sex hormone action. Ann. N.Y. Acad. Sci., 1970, 171, 882-894.

100. Woodrum, D.T.; Rich, S.A.; Pollard, T.D. Evidence for biased bidirectional polymerization of actin filaments using heavy meromyosin prepared by an improved method. J. Cell Biol., 1975, 67, 231-235.
101. Yasunobu, K.T.; Smith, R.A. Amine oxidase (Beef plasma) in: Methods in Enzymology. (H. Tabor and C.W. Tabor Ed.). Academic Press. N.Y., 1971, (961 p.), pp. 698-704.