UNIVERSITE DU QUEBEC

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ À

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE

PAR

PIERRE TRUDEL

MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE PERMETTANT D'ÉTUDIER L'EFFET DE LA PHALLOÏDINE SUR L'ULTRA-STRUCTURE DE *ENTAMOEBA HISTOLYTICA*

MAI 1983

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.

RESUME

Ce travail s'intègre à une série de recherches visant à expliquer les phénomènes de motilité cellulaire. Il a déjà été démontré par des études biochimiques qu'une protéine filamenteuse: l'actine, est impliquée dans les phénomènes de motilité cellulaire mais l'étude de l'organisation des filaments d'actine dans les cellules est très peu avancée. Pour observer des filaments d'actine dans les cellules, il faut utiliser un microscope électronique. Or les méthodes présentement disponibles pour fixer le matériel biologique pour la microscopie électronique détruisent les filaments d'actine.

Récemment il a été démontré dans notre laboratoire que la phalloïdine se lie aux filaments d'actine et les protège contre les coupures causées par l'acide osmique. La phalloïdine permet donc, en principe, d'observer des filaments d'actine par microscopie électronique. En se liant à l'actine, la phalloïdine déplace aussi l'équilibre G-actine $\rightleftarrows$ F-actine vers la forme F-actine et affecte les phénomènes sous la dépendance de la polymérisation réversible de l'actine c'est à dire les phénomènes de motilité cellulaire. De nombreuses recherches ont été entreprises pour étudier l'effet de la phalloïdine sur les cellules mais ce petit peptide ne pénètre pas dans la plupart des cellules par simple diffusion en raison de l'imperméabilité de la membrane. Le but de notre recherche a été de développer une technique permettant d'introduire de la phalloïdine dans une amibe: *Entamoeba histolytica*, en utilisant des liposomes.

Dans la première partie de ce travail nous avons tout d'abord étudié les interactions entre des liposomes de composition chimique variée et les amibes. Un marqueur fluorescent, la 6-carboxyfluoresceine (CF), encapsulée dans les liposomes nous permettait de déterminer les interactions entre les liposomes et les amibes. Nous avons trouvé une composition en lipides qui permet d'introduire beaucoup de CF dans le cytoplasme de l'amibe: le mélange de phosphatidylcholine et d'acide oléique dans un rapport molaire de 9:1.

Nous avons ensuite déterminé quel est le mécanisme de transfert de la CF encapsulée dans les liposomes vers le cytoplasme de l'amibe. De notre travail nous pouvons conclure que les liposomes sont tout d'abord phagocytés, puis que la CF diffuse des vacuoles digestives vers le cytoplasme de l'amibe.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons utilisé les conditions expérimentales déterminées lors de l'étude des interactions liposomes-amibes, pour introduire de la phalloïdine dans *E. histolytica*. La phalloïdine nous permet alors d'observer des filaments d'actine qui apparaissent soit sous forme de faisceaux de filaments, soit sous forme de réseaux tridimentionnels. Nous avons aussi observé un résultat inattendu: la phalloïdine produit une modification de l'organisation des polysomes. Ces polysomes forment de gros cristaux qui entourent parfois le noyau. Ce phénomène n'avait jamais été observé antérieurement.

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer toute ma gratitude aux personnes qui m'ont aidé au cours de ce travail.

A M. Claude Gicquaud, directeur de ce projet, qui m'a apporté le support financier ainsi que l'encouragement nécessaire tout au long des travaux.

Aux membres du groupe de recherche en motilité, M. Julian Gruda, Mme Hélène-Marie Thérien, Mme Micheline Paulin-Levasseur pour l'intérêt marqué et les discussions intéressantes qu'ils ont su provoquer, et Mme Diane Bégin pour son excellente aide technique.

TABLE DES MATIÈRES

Page

RÉSUMÉ ii

REMERCIEMENTS iv

TABLE DES MATIÈRES v

LISTE DES TABLEAUX ix

LISTE DES FIGURES x

CHAPITRE I - Introduction 1

CHAPITRE II - Matériel et méthodes 11

1. Matériel 11

1.1 Culture des amibes 11

1.2 La phalloïdine 11

1.3 Les lipides 12

1.4 Autres produits chimiques 13

2. Méthodes 13

2.1 Préparation des liposomes 13

2.2 Chromatographie des liposomes contenant de la CF 16

2.3 Mesure du taux d'encapsulation et de l'efficacité de la chromatographie 18

Page

2.4 Préparation de l'albumine fluorescente 19

2.5 Chromatographie des liposomes contenant de la ferritine et de l'albumine fluorescente 19

2.6 Etude des interactions entre les liposomes et les amibes 20

2.6.1 Incubation des amibes avec les liposomes 20

2.6.2 Evaluation des interactions entre les amibes et les liposomes 20

2.7 Microscopie électronique 23

2.7.1 Coloration négative 23

2.7.2 Coupes fines 23

CHAPITRE III - Etude des interactions entre les liposomes et *Entamoeba histolytica* 24

1. Résultats 24

1.1 Caractéristiques des liposomes 24

1.2 Etudes des interactions liposomes-*E. histolytica* 28

1.2.1 Influence de la composition en lipides des liposomes sur les interactions liposomes-amibes 28

1.2.2 Effet de la concentration en liposomes sur le transfert de la CF dans le cytoplasme des amibes 32

1.2.3 Influence du temps d'incubation 34

1.2.4 Contrôle 36

1.3 Etude du mécanisme de transfert de la CF des liposomes composés de PC: AO (9:1) vers le cytoplasme de *E. histolytica* 36

1.3.1 Etude de la cinétique du transfert de la CF 38

Page

1.3.2 Effet d'une inhibition de la phagocytose 39

1.3.3 Etude des interactions liposomes-amibes à l'aide de deux autres marqueurs 40

1.3.4 Mécanisme de transfert proposé 40

2. Discussion 42

2.1 Critiques des méthodes utilisées 42

2.1.1 Préparation des liposomes 42

2.1.1.1 Choix de la méthode de préparation des liposomes 42

2.1.1.2 Mise au point de la méthode de préparation des liposomes 43

2.1.1.3 Caractéristiques des liposomes 44

2.1.2 Critique de la méthode de mesure des interactions liposomes-amibes 44

2.2 Analyse des résultats 48

2.2.1 Effet de la composition en lipides des liposomes 48

2.2.2 Analyse des conditions d'incubation ... 50

2.2.3 Analyse du rendement du transfert du produit encapsulé 50

2.3 Mécanisme de transfert de la CF 51

CHAPITRE IV - Etude de l'effet de la phalloïdine sur l'ultrastructure de *E. histolytica* 54

1. Résultats 54

1.1 Ultrastructure de *E. histolytica* 55

1.2 Effet de la phalloïdine sur l'ultrastructure de *E. histolytica* 59

2. Discussion 82

Page

CHAPITRE V - Conclusion générale 90

BIBLIOGRAPHIE 93

LISTE DES TABLEAUX

Page

Tableau I: Composition de la solution M 12

Tableau II: Conditions expérimentales pour la chromatographie des liposomes 18

Tableau III: Mesure du taux d'encapsulation et de l'efficacité de la chromatographie des liposomes 26

Tableau IV: Effet de la composition en lipides sur les interactions liposomes-amibes 29

Tableau V: Conditions optimales d'incubation en fonction de la composition en lipides 31

Tableau VI: Effet de la concentration en liposomes sur l'intensité de la fluorescence diffuse 34

Tableau VII: Influence du temps d'incubation sur l'intensité de la fluorescence diffuse 36

Tableau VIII: Cinétique du transfert de la CF 39

LISTE DES FIGURES

Page

Figure 1: Interactions liposomes-cellules 9

Figure 2: Schéma de la méthode de préparation des liposomes 14

Figure 3: Schéma de la méthode de chromatographie des liposomes 17

Figure 4: Distribution de la fluorescence dans les amibes ... 21
a) après 30 min d'incubation
b) après 3 heures d'incubation

Figure 5: Préparation de liposomes en coloration négative ... 25

Figure 6: a) Observation au microscope électronique d'une préparation de liposomes PC: AO(7:3) 27
b) Observation au microscope à fluorescence d'une préparation de liposomes PC: AO(9:1) 27

Figure 7: Différentes sensibilités des cellules au traitement par les liposomes 33

Figure 8: Effet de la concentration en liposomes sur l'intensité de la fluorescence diffuse dans le cytoplasme des amibes 35

Page

Figure 9: Effet de la présence de CF libre dans le milieu d'incubation 37

Figure 10: Etude des interactions liposomes-amibes à l'aide de liposomes contenant de la ferritine 41

Figure 11: Ultrastructure de *E. histolytica* à faible grossissement. Amibe témoin. 63

Figure 12: a) Détails de la membrane cellulaire d'une amibe témoin 64

b) L'uropode d'une amibe témoin 64

Figure 13: a) Cellules témoins, détails du cytoplasme 65

b) Cellules témoins, détails du cytoplasme 65

Figure 14: a) Noyau d'une amibe témoin en métaphase 66

b) Noyau d'une amibe témoin en interphase 66

Figure 15: Effet de la phalloïdine sur l'ultrastructure de *E. histolytica* à faible grossissement 67

Figure 16: a) Aspect typique d'une zone dense d'une cellule traitée 68

b) Agrandissement montrant les détails d'une zone dense 68

Figure 17: Ultrastructure d'une amibe traitée montrant peu d'effet de la phalloïdine 69

Page

Figure 18: Filaments dans le cytoplasme de *E. histolytica* traitée à la phalloïdine 70

Figure 19: Comparaison de l'aspect du cytoplasme des amibes traitées avec les liposomes contenant de la phalloïdine et les amibes témoins..... 71

Figure 20: Formation de faisceaux de filaments dans le cytoplasme de *E. histolytica* traitée à la phalloïdine 72

Figure 21: Faisceaux de filaments interconnectés dans une amibe traitée à la phalloïdine 73

Figure 22: Formation d'un pseudopode chez une cellule traitée à la phalloïdine 74

Figure 23: Phagocytose d'une bactérie chez une cellule traitée à la phalloïdine 75

a) Formation de la capsule phagocytaire

b) Formation de la vacuole digestive

Figure 24: Faisceaux de filaments dans le cytoplasme de *E. histolytica* traitée à la phalloïdine 76

Figure 25: Formation des cristaux de RNP chez une amibe traitée à la phalloïdine 77

Figure 26: Formation de nombreux cristaux de RNP dans le cytoplasme d'amibes traitées à la phalloïdine 78

Page

Figure 27: Artéfact de fixation observé chez les amibes traitées avec des liposomes contenant de la phalloïdine 79

Figure 28: Noyaux de *E. histolytica* traitées à la phalloïdine entourés de polysomes 80

Figure 29: Noyau de *E. histolytica* traitée à la phalloïdine entouré par des cristaux de RNP 81

CHAPITRE I

INTRODUCTION

La cellule est l'unité fondamentale de la matière vivante. Elle a longtemps été décrite simplement comme un protoplasme limité par une membrane. Puis on a identifié à l'intérieur de la cellule plusieurs organites cellulaires comme le noyau, les mitochondries, les lysosomes, etc., cependant le liquide intracellulaire (ou cytoplasme) était toujours décrit comme une simple solution colloïdale.

Ces dernières années plusieurs résultats expérimentaux ont modifié cette conception du cytoplasme. Le cytoplasme n'est pas une solution colloïdale, mais est constitué par quelque chose de beaucoup plus structuré. Il existe dans le cytoplasme un ensemble de structures filamenteuses composé des microfilaments, des filaments intermédiaires et des microtubules (40). Dans les cellules peu mobiles les filaments cytoplasmiques sont organisés d'une manière permanente et forment ainsi un cytosquelette stable (49). Par contre, dans les cellules très mobiles (ex. les amibes) il n'y a pas de cytosquelette stable mais des structures filamenteuses très dynamiques qui forment des structures dites contractiles (72) responsables du mouvement de la cellule.

L'actine est la principale protéine des microfilaments cytoplasmiques (49). C'est une protéine globulaire (G-actine) de 42,000 daltons qui a la propriété de se polymériser pour former des filaments

(F-actine). La F-actine possède la propriété d'activer l'hydrolyse de l'ATP par la myosine, en présence de Mg^{++}. C'est cette réaction qui convertit l'énergie chimique en mouvement.

L'actine existe dans la plupart des cellules non musculaires où elle permet le maintien et les changements de forme des cellules (49), la régulation de la distribution topographique des protéines membranaires (23), et la liaison des ARN messagers actifs au cours de la synthèse protéique (107). L'actine est aussi impliquée dans les mouvements cellulaires comme le mouvement amiboïde (99), les processus de sécrétion (6), la phagocytose (90) et la division cellulaire (88).

Dans les cellules non musculaires l'actine existe sous plusieurs formes (11). Une quantité importante d'actine est maintenue sous forme monomérique (G-actine) par interaction avec des protéines comme la profiline (10). Le reste de l'actine forme des filaments (F-actine). Dans le cytoplasme des cellules, plusieurs protéines peuvent créer des liens entre les filaments d'actine: la filamine (109), la spectrine (9), la villine (65) (pour une liste détaillée voir 11). Certaines de ces protéines sont sensibles au calcium (la villine), d'autres ne le sont pas (la spectrine). Lorsque les filaments sont interconnectés par ces "actin binding protein" ils forment un gel constitué alors par un réseau tridimensionnel de filaments. Les filaments d'actine peuvent aussi s'agréger parallèlement les uns aux autres et former des faisceaux de filaments. Dans une cellule, ces différents états de l'actine sont en équilibre: il se produit une transformation continuelle d'une forme d'actine en une autre.

Notre groupe de recherche s'intéresse plus particulièrement au mouvement amiboïde. C'est un mouvement très répandu dans le monde vivant (déplacement des macrophages, des leucocytes, endocytose, etc.). Dans notre laboratoire nous travaillons avec des amibes car c'est un matériel facilement accessible qui peut servir de modèle pour étudier les réactions et l'organisation de l'actine dans les autres cellules non musculaires.

Pour comprendre et expliquer les mouvements non musculaires au niveau moléculaire, il faut faire deux types de recherches. Premièrement il faut connaître les propriétés des protéines qui produisent le mouvement. De nombreuses recherches ont déjà déterminé les propriétés de l'actine (45), de la myosine (45) et de plusieurs "actin binding protein" (11) dans les cellules non musculaires. Deuxièmement, il faut déterminer l'organisation de ces protéines contractiles dans le cytoplasme des cellules *in vivo* et c'est dans ce domaine que se situe notre recherche.

Des résultats intéressants ont déjà été obtenus avec l'utilisation de marqueurs de l'actine. Ainsi en utilisant des anticorps anti-actine fluorescents, LAZARIDES (49) a observé l'organisation de l'actine au microscope optique dans plusieurs types de cellules de mammifères. Il a montré l'existence de "stress fiber" composées d'actine, de myosine (111), de tropomyosine (47), d'α-actinine (48) et de filamine (110) ainsi que d'un cytosquelette stable. Récemment cette approche a été améliorée avec l'utilisation de dérivés fluorescents de la phalloïdine (4, 108, 114, 123). Ces nouveaux marqueurs possèdent une très forte affinité pour les filaments d'actine ($K_d \simeq 2 \times 10^{-8}$M) (4) et se lient à l'actine de manière spécifique. Ils permettent d'observer des détails plus fins que les anticorps

anti-actine et sont aussi plus faciles d'emploi.

Pour étudier la transformation des diverses formes d'actine, TAYLOR (100, 101) et GAWLITTA (27) ont aussi microinjecté de l'actine fluorescente dans des amibes. L'injection d'actine fluorescente donne des résultats analogues au marquage de l'actine par les anticorps fluorescents. L'actine microinjectée s'intègre aux structures de la cellule. Ceci montre que les structures observées avec les anticorps ne sont pas des artéfacts causés par la fixation.

Toutefois, avec les amibes, ces techniques fournissent peu de renseignements utiles car les amibes n'ont pas de cytosquelette stable. Avec les amibes on n'obtient qu'une fluorescence diffuse ou au mieux des régions où se concentre la fluorescence (22, 43, 67, 100). Il existe donc de l'actine dispersé dans le cytoplasme des amibes mais son organisation ne peut être mise en évidence avec un microscope optique; la résolution n'est pas suffisante.

Pour observer l'organisation fine des filaments, il est nécessaire d'utiliser un microscope électronique qui donne une meilleure résolution. Cependant, avec cette technique il faut fixer le matériel. Généralement, les cellules sont fixées avec un aldéhyde suivi d'une postfixation à l'acide osmique. Le matériel est ensuite déshydraté et inclus dans une résine. Ce traitement protège de très nombreuses structures cellulaires. Toutefois, certaines structures, et en particulier les filaments d'actine sont dénaturés lors de la fixation. MAUPIN-SZAMIER et POLLARD (62) ont montré que le deuxième fixateur utilisé: l'acide osmique, coupe très rapidement les filaments d'actine. Dans les cellules où l'on a observé des filaments, par exemple les cellules musculaires, une protéine

associée aux filaments (la tropomyosine) protège l'actine (50,93). Mais dans la plupart des cellules non musculaires, l'actine, qui n'est pas liée à de telles protéines, est sensible à la dénaturation par les fixateurs. Si on fait exception de la congélation ultra rapide à température de l'hélium liquide (40) il n'existe aucune méthode de fixation qui permette de préserver l'actine. Ce sont ces problèmes de fixation qui limitent l'acquisition des connaissances sur l'organisation des filaments dans les cellules non musculaires.

En 1955, WIELAND isolait la phalloïdine de certaines espèces d'Amanites (120) dont il a déterminé la structure (119). La phalloïdine est un petit peptide bicyclique d'un poids moléculaire de 788. Cette toxine a la propriété de se lier spécifiquement à la F-actine et de rendre cette protéine plus résistante à un grand nombre d'agents physiques ou chimiques. Ainsi, la phalloïdine protège la F-actine contre l'action des ultrasons (13), contre la dénaturation thermique (14), contre la dépolymérisation par les ions chaotropiques (13), par la cytochalasine B (57), la DNAse I (85) et contre l'action des protéases (15, 75). Récemment, GICQUAUD, GRUDA et POLLENDER ont montré que la phalloïdine peut être utilisée pour améliorer la fixation des cellules. Stockem a introduit, par microinjection, de la phalloïdine dans *Amoeba proteus* (92) et a ainsi observé de nombreux filaments d'actine dans le cytoplasme de ces amibes, au microscope électronique.

En se liant à la F-actine la phalloïdine ne fait pas que protéger les filaments, elle déplace l'équilibre G-actine $\rightleftharpoons$ F-actine vers la formation de F-actine. L'introduction de la phalloïdine perturbe

donc les processus physiologiques dépendant de la polymérisation réversible de l'actine. WEHLAND prétend que l'introduction de petites quantités de phalloïdine permet d'observer les filaments d'actine sans en modifier leur organisation (113). Par contre l'introduction de fortes concentrations de phalloïdine bloque complètement la motilité des cellules, en maintenant les structures d'actine dans un état fortement polymérisé. L'étude des effets de différentes concentrations de phalloïdine devrait fournir des informations sur l'organisation de l'actine dans les cellules non musculaires et permettre ainsi de déterminer comment ces structures d'actine sont impliquées dans le mouvement amiboïde.

Malheureusement, les membranes cellulaires ne sont pas perméables à la phalloïdine. WEHLAND (112), STOCKEM (92) et GÖTZ VON OLENHUSEN (32) ont microinjecté des solutions de phalloïdine dans *Physarum polycephalum* et *A. proteus*, ainsi que dans des fibroblastes. La microinjection est toutefois une méthode qui nous semble inappropriée. La plus petite microaiguille disponible reste quelque chose d'énorme comparé à la taille d'une cellule. De plus, ces chercheurs microinjectent des volumes pouvant atteindre jusqu'à un dixième du volume cellulaire. Même si les cellules demeurent viables après un tel traitement, on peut se poser de sérieuses questions sur la possibilité d'artéfacts. Afin d'éviter ces problèmes nous avons recherché à développer une nouvelle méthode pour introduire la phalloïdine d'une manière plus douce dans une amibe: *Entamoeba histolytica*. Cette méthode est basée sur l'utilisation des liposomes.

Les liposomes sont des vésicules de phospholipides, mis au point par BANGHAM en 1965 (3). Ils ont été l'objet de nombreuses recherches en biophysique car ils représentent un bon modèle de membranes

biologiques. Depuis le tout début, mais plus particulièrement depuis les années 1975, les liposomes ont aussi été utilisés comme microcapsules (84) capables de transporter des substances à l'intérieur des cellules.

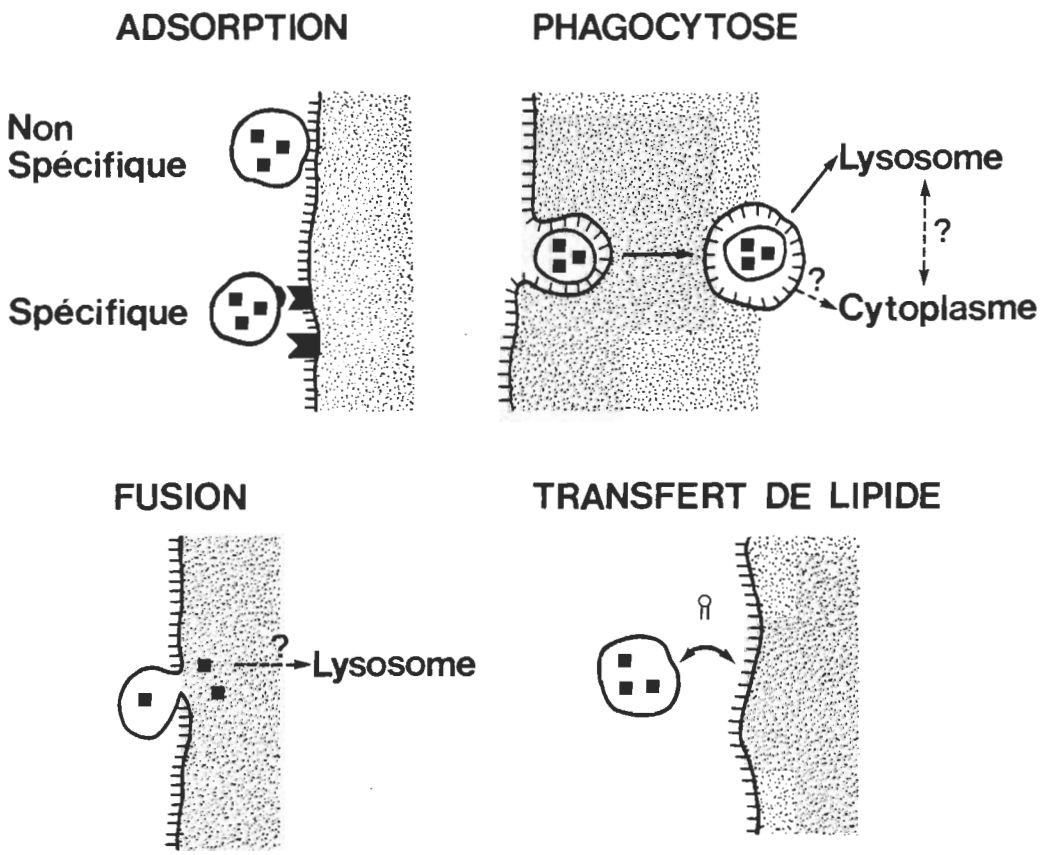
Les vésicules multilamellaires de BANGHAM et les petites vésicules unilamellaires ne constituaient pas la microcapsule idéale. Il s'est donc développé de 1976 à 1980 de nouvelles méthodes de préparation de liposomes afin d'obtenir des transporteurs plus efficaces. Il existe maintenant plus d'une dizaine de méthodes de préparation des liposomes (98).

Plusieurs substances très variées allant de médicaments à des protéines, et même des acides nucléiques ont déjà été encapsulées dans les liposomes (33). Dans plusieurs cas, les liposomes ont permis de faire pénétrer ces substances, dans le cytoplasme des cellules. Ainsi des ARN messagers introduits par des liposomes ont été traduits par les ribosomes des cellules et il fut possible d'isoler les produits de traduction (19, 68). D'autres résultats montrent une action cytoplasmique de l'AMP cyclique (71), de l'actinomycine D (77), de l'arabinose cytosine (77), de la β-fructofuranosidase (34) et de l'amyloglucosidase (83) introduits à l'aide de liposomes, dans diverses cellules. Dans d'autres expériences, les substances encapsulées dans les liposomes n'avaient pas d'action biologique mais permettaient de démontrer le transfert du contenu des liposomes dans le cytoplasme des cellules. On peut citer la 6-carboxyfluoresceine (117), l'obéline (36), la ferritine (39), l'albumine liée à de la fluoresceine (95), l'inuline tritiée (41) et la peroxydase (118).

L'étude des mécanismes de transfert du produit encapsulé dans les liposomes vers les cellules a mis en évidence quatre types d'interactions importantes entre les liposomes et les cellules (figure 1) (70). Premièrement les liposomes peuvent s'adsorber à la surface des cellules. Cette adsorption peut être spécifique à des sites récepteurs membranaires ou non spécifique (ex. une adsorption électrostatique). Deuxièmement, les liposomes peuvent être phagocytés. Dans ce cas, le contenu du liposome va généralement s'associer avec les lysosomes. Il se peut alors que le matériel encapsulé diffuse des vacuoles digestives vers le cytoplasme. Une troisième possibilité est la fusion du liposome avec la membrane de la cellule. Dans cette interaction le contenu du liposome passe directement dans le cytoplasme des cellules. Ce contenu peut alors se concentrer dans certains organites cellulaires ou se répartir uniformément. Une quatrième possibilité est un échange de lipides et de protéines entre les liposomes et les cellules. Avec ce type d'interaction les liposomes ne restent pas liés aux cellules et leur contenu ne pénètre pas dans le cytoplasme. Dans ce dernier cas, il se produit une modification de la membrane cellulaire. Lors d'une expérience, il se produit rarement un seul type d'interaction mais plutôt une combinaison des différentes interactions, à des degrés variables.

L'étude des interactions entre les liposomes et les cellules est difficile car les facteurs pouvant influencer les résultats sont très nombreux. Parmi les facteurs les plus connus, on peut citer la charge des liposomes et l'état physique des membranes (solide ou fluide) (70). Il semble qu'un liposome doive être négatif ou neutre et fluide pour fusionner avec des cellules de mammifères en culture. Mais dans la seule étude réalisée avec une amibe (*Acanthamoeba castellanii*) (5) ce sont des liposomes

FIGURE 1: INTERACTIONS LIPOSOMES-CELLULES



solides et positifs qui ont fusionné. On rencontre ce genre de contradictions pour tous les facteurs déjà étudiés. Après une revue de la littérature, il nous semble que le principal facteur qui influence les interactions liposomes-cellules est la biologie ou la physiologie de la cellule utilisée. Ainsi, OSTRO (69) a observé que le stade du cycle de croissance des cellules était un facteur plus important que la composition en lipides des liposomes. Il en résulte qu'il est impossible d'extrapoler les résultats obtenus d'une cellule à une autre. Chaque type de cellules nécessite une étude des facteurs pouvant influencer les interactions entre les liposomes et cette cellule.

Le but principal de ce travail a été de mettre au point une technique pour introduire de la phalloïdine dans le cytoplasme de *E. histolytica* afin d'en étudier l'effet sur l'ultrastructure de l'amibe. Pour atteindre cet objectif nous avons, dans un premier temps, étudié les interactions entre des liposomes et *E. histolytica*. Nous avons ainsi déterminé des conditions expérimentales qui permettent le transfert du produit encapsulé dans les liposomes vers le cytoplasme de *E. histolytica*. Par la suite, nous avons observé l'effet de la phalloïdine introduite dans *E. histolytica* à l'aide de liposomes. Cette recherche contient donc deux parties très différentes: l'étude des interactions liposomes-*E. histolytica* et l'effet de la phalloïdine sur l'ultrastructure de l'amibe. Afin de faciliter la compréhension du travail nous allons présenter et discuter ces deux points séparément.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Matériel

1.1 Culture des amibes

Nous avons utilisé la souche Larédo de l'amibe *Entamoeba histolytica* isolée par DREYER (20). Les amibes sont cultivées en milieu monophasique suivant la méthode de DIAMOND (18) en présence de bactéries non identifiées. Toutes les cultures sont faites à température de la pièce. Lors des expériences avec les liposomes, les amibes sont transférées dans un milieu simplifié qui les maintient en vie pendant au moins 24 heures. La solution de maintien utilisée est la solution de GILLIN et DIAMOND (30) légèrement modifiée. Nous en avons éliminé l'albumine pour éviter les interactions possibles de cette protéine avec les liposomes. Les amibes n'en ont pas été affectées. La composition et la méthode de préparation de la solution de maintien (solution M) sont données au tableau I.

1.2 La phalloïdine

La phalloïdine est préparée à partir du champignon d'*Amanita virosa* récolté au Québec. Les méthodes d'extraction et de purification sont décrites en détail dans la thèse de Mme André Turcotte (103).

TABLEAU I: Composition de la solution M

Produit	Concentration (mM)
Tris HCl	50
NaCl	25
KCl	12
$MgCl_2$	8
$CaCl_2$	2
Glucose	5.8
Solution de vitamine # 107 de DIAMOND (18)	1% (v/v)
L-cystéine HCl *	5.7
L-acide ascorbique *	10
Le pH est ajusté à 7.0	

* La cystéine et l'acide ascorbique sont ajoutés juste avant l'utilisation.

1.3 Les lipides

Tous les lipides utilisés: la phosphatidylcholine (P- 5763), la phosphatidylsérine (P- 6641), l'acide phosphatidique (P- 9511), les gangliosides (G- 2250), le cholestérol (CH-S), le rétinol (R- 2750), l'acide oléique (O- 0750), et la stéarylamine (S- 6755) provenaient de chez Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.). Ils ont été conservés au congélateur dans du chloroforme sous un gaz inerte et ont été utilisés sans purification supplémentaire.

1.4 Autres produits chimiques

La ferritine, l'albumine de boeuf et l'isothiocyanate de fluorescéine provenait de chez Sigma Chemical Co. (St.Louis, Mo.). Les solvants organiques: éther (E- 138c) et chloroforme (C- 298) ont été achetés chez Fisher (Montréal, P.Q.). La solution stock de 6-carboxy-fluorescéine (CF) (Eastman Kodak; Rochester, N.Y.) fut préparée à une concentration de 200 mM pH 7.4 dans de l'eau et utilisée sans purification supplémentaire. Elle a été conservée à l'obscurité à 4°C. Tous les autres produits sont de grade analytique.

2. Méthodes

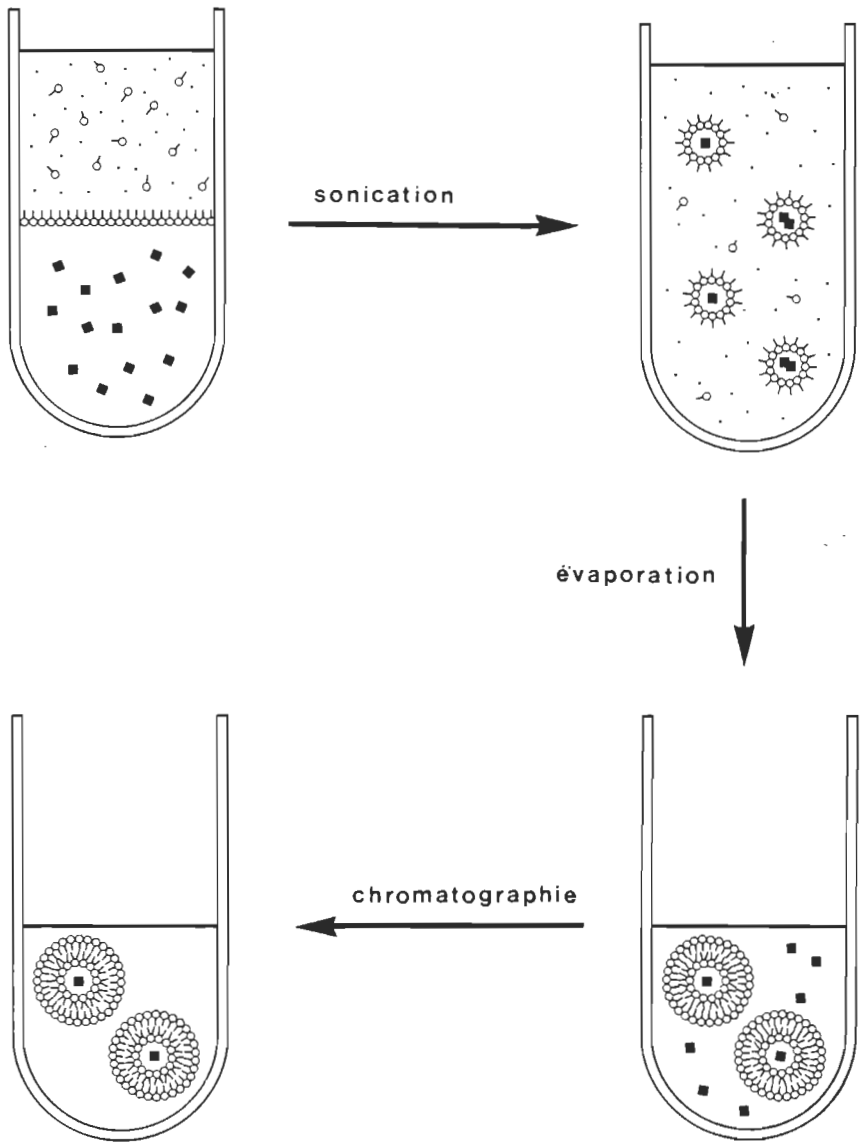
2.1 Préparation des liposomes

Nous avons utilisé la méthode de préparation de liposomes développée par SZOKA et PAPAHADJOPOULOS (97). La figure 2 montre le principe de cette méthode.

Les lipides (66 µmoles), en solution dans du chloroforme sont mis dans un ballon de 50 ml muni d'un joint en verre rodé. Le chloroforme est évaporé avec un évaporateur rotatif (Büchi modèle R110). Les lipides sont ensuite redissouts dans 3 ml de diéthyléther. C'est le solvant utilisé comme phase organique. Puis nous ajoutons 1 ml d'une solution de CF 10^{-2}M. La solution de CF est préparée en diluant la solution stock avec une solution de NaCl 0.15M. Le ballon est alors purgé avec un gaz inerte, du fréon 22, pour minimiser l'oxydation des lipides lors de la sonication.

Le ballon est ensuite placé dans un bain d'ultrasons (Mégason modèle P-300), refroidi à 4°C, pendant 2 à 5 min, jusqu'à la formation d'une phase homogène. Cette phase ne doit pas se séparer dans les 5 min suivant

FIGURE 2: SCHEMA DE LA MÉTHODE DE PRÉPARATION DES LIPOSOMES



la sonication, sinon le ballon est soumis de nouveau aux ultrasons. Nous obtenons alors des gouttelettes d'eau, entourées d'une monocouche de lipides, en suspension dans l'éther.

L'éther est ensuite évaporé, à température de la pièce, sous un vide partiel, avec un évaporateur rotatif. Au début, la vitesse de rotation de l'évaporateur est réglée au maximum. Le milieu devient alors très visqueux et il se forme un gel. La vitesse de rotation est alors réduite au minimum afin d'éviter la formation excessive de mousses qui peut se produire lors de l'évaporation explosive de l'éther séquestré dans le gel. L'agitation constante du gel et l'élimination de l'éther induisent un renversement de phase qui résulte en la formation des liposomes. A la fin de la formation des mousses, l'évaporation se poursuit pendant 5 min. Nous ajoutons ensuite 2 ml d'une solution de NaCl 0.15M et continuons l'évaporation à vitesse de rotation maximale et à un vide élevé pendant 10 min de manière à éliminer toutes traces d'éther.

Il est possible de préparer des liposomes en quantité plus importante en augmentant dans les mêmes proportions les volumes des deux phases tout en respectant le rapport 66 µmoles de lipides par millilitre de phase aqueuse. Toutefois le ballon de 50 ml ne permet pas de préparer de plus petites quantités de liposomes. L'évaporation de l'éther se fait alors trop rapidement et une partie de l'eau peut aussi s'évaporer ce qui donne des vésicules multilamellaires (98).

Lorsqu'on prépare des liposomes contenant de la phalloïdine, il faut partir avec un très petit volume comme phase aqueuse initiale

car la phalloïdine est très chère. Nous avons donc mis au point un récipient qui permet de faire de petites préparations de liposomes. Il s'agit d'un tube de 13 mm de diamètre qui se termine par un joint en verre rodé (24/40). Avec ce tube il est possible de faire des préparations de liposomes en partant avec 0.33 ml et même 0.25 ml de phase aqueuse.

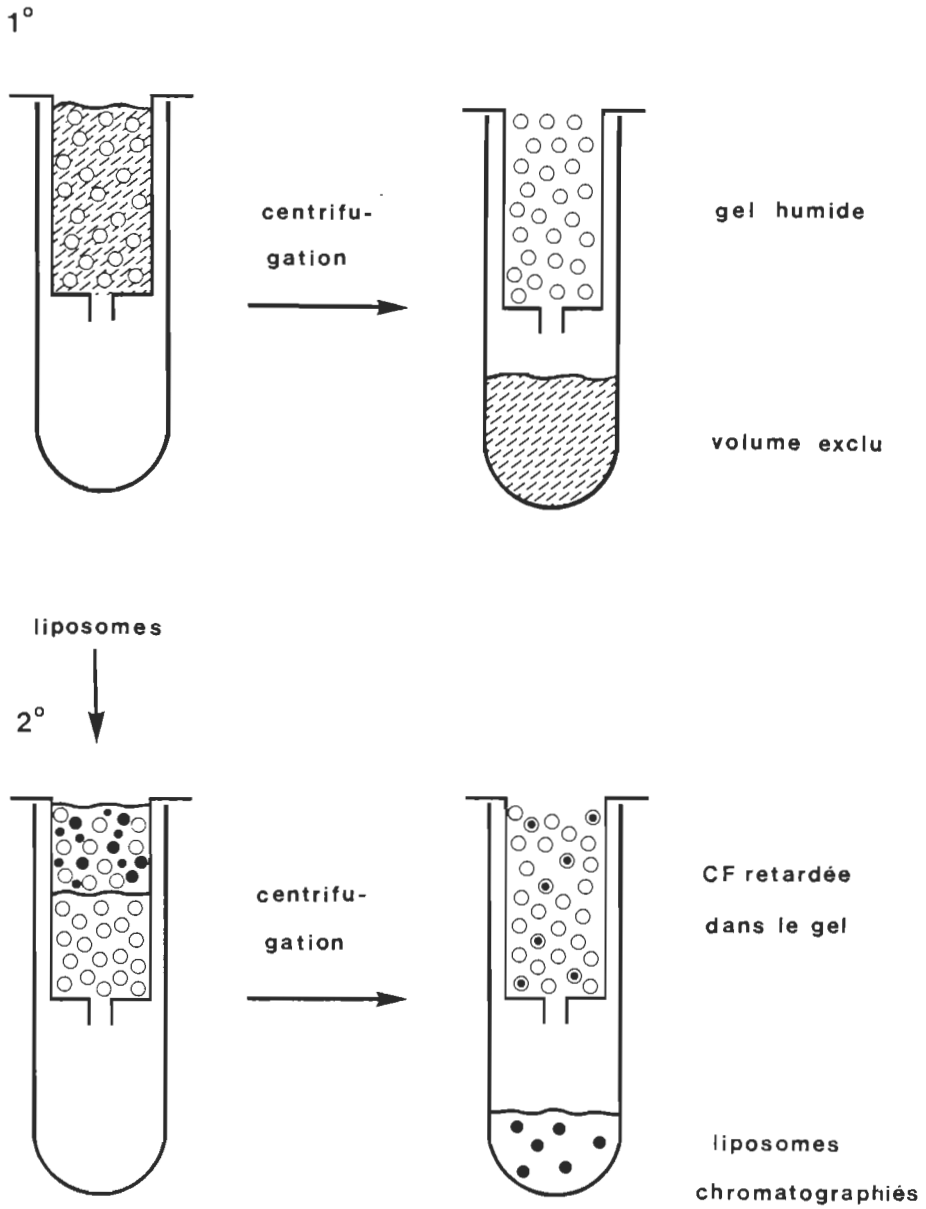
Pour encapsuler la ferritine, l'albumine ou la phalloïdine dans les liposomes, nous avons simplement utilisé une solution de ces protéines comme phase aqueuse (ferritine: 25 mg/ml dans du KCl 50 mM; l'albumine-fluorescente: 125 mg/ml dans la solution M; phalloïdine: 15 mg/ml dans du NaCl 0.15M).

2.2 Chromatographie des liposomes contenant de la CF

Les liposomes sont séparés du produit non encapsulé par chromatographie d'exclusion sur gel de Séphadex. Les liposomes sont de grosses structures qui passent avec le volume exclu tandis que la CF est retardée dans le gel. Pour accélérer l'élution nous avons utilisé la méthode de FRY (25). La figure 3 représente les principales étapes de cette chromatographie.

La colonne à chromatographie est tout d'abord centrifugée ce qui élimine le volume exclu. Puis les liposomes sont ajoutés et chromatographiés par une deuxième centrifugation. Deux gels, du Séphadex G-50 ou du G-75, ont été utilisés. La colonne consiste en une seringue de 5 ml avec du papier filtre Wattman No 1 comme filtre à la base. La centrifugeuse est une IEC (modèle clinical). Les conditions de centrifugation sont données au tableau II. Jusqu'à 1 ml de la préparation de

FIGURE 3: SCHÈMA DE LA MÉTHODE DE CHROMATOGRAPHIE DES LIPOSOMES



liposomes peut être déposé par colonne ce qui correspond à 22 µmoles de lipides.

TABLEAU II: Conditions expérimentales pour la chromatographie des liposomes

	Temps (min)	Graduation de la centrifugeuse *	
Gel		Séphadex G-50 coarse	Séphadex G-75 fine
1° centrifugation	3	3	5
2° centrifugation	10	1	2
	3	3	5

* L'équivalent en g ou rpm n'est pas donné par le manufacturier.

2.3 Mesure du taux d'encapsulation et de l'efficacité de la chromatographie

A l'aide d'un spectrofluorimètre Perkin-Elmer MPF 2A, ajusté à une longueur d'onde d'excitation de 479 nm et d'émission de 520 nm, nous avons mesuré la fluorescence d'une préparation de liposomes non chromatographiés (F_t), d'une préparation de liposomes chromatographiés deux fois selon la méthode de FRY (F_L) et la fluorescence de la CF retardée dans les gels des deux chromatographies (F_{G-1} et F_{G-2}). 0.5 ml des préparations de liposomes est dilué dans 50 ml d'une solution de triton 1%. Les deux gels, soit ce qui reste dans la seringue après chromatographie de 0.5 ml de liposomes, sont équilibrés dans 50 ml de la solution de triton. Il faut encore diluer ces 4 solutions 12 fois pour obtenir des concentrations de CF sans "quenching".

La fluorescence de la préparation de liposomes non chromatographiés égale 100 tout comme la somme des trois autres mesures. ($F_t = F_L + F_{G-1} + F_{G-2}$). Le taux d'encapsulation est donné par la mesure de la fluorescence de la préparation de liposomes chromatographiés divisée par la fluorescence de la préparation de liposomes non chromatographiés et multiplié par 100 (taux d'encapsulation $= \frac{F_L}{F_t} \times 100$). L'efficacité de la chromatographie est donnée par la fluorescence de la CF retardée dans la première chromatographie divisée par la somme de la fluorescence de la CF retardée dans les deux chromatographies (efficacité de la chromatographie $= \frac{F_{G-1}}{F_{G-1} + F_{G-2}} \times 100$).

2.4 Préparation de l'albumine fluorescente

Pour préparer l'albumine fluorescente nous avons dissous 100 mg d'albumine de boeuf et 5 mg de fluorescéine isothiocyanate dans 16.7 ml de tampon phosphate 0.1M à pH 9.0. Le tout est incubé à 4°C pendant une nuit sous une légère agitation. L'albumine fluorescente est purifiée par chromatographie sur Séphadex G-50 et concentrée à 125 mg/ml par ultrafiltration.

2.5 Chromatographie des liposomes contenant de la ferritine ou de l'albumine fluorescente

Les protéines libres non encapsulées sont séparées des liposomes par chromatographie sur gel de Séphadex G-200 pour l'albumine fluorescente et sur Sépharose 6-B pour la ferritine. Les liposomes passent avec le volume exclu. Dans ces deux cas nous avons recueilli des fractions de 3 ml et utilisé les fractions qui contenaient des liposomes.

2.6 Étude des interactions entre les liposomes et les amibes

2.6.1 Incubation des amibes avec les liposomes

Les amibes prélevées en fin de phase exponentielle de croissance, c.a.d. vieilles de 12 à 17 jours, ont été incubées avec les différents liposomes. A cette fin, les amibes sont préparées par centrifugation du milieu de culture et sont ensuite lavées 3 fois avec la solution M. Elles sont récupérées dans 1 ml de solution M. Des liposomes contenant 10^{-2} M de CF (ou autre chose) sont ajoutés à la concentration désirée et le volume est complété à 2 ml avec une solution de NaCl 0.15 M. A moins d'indication contraire, les amibes sont incubées à température de la pièce dans des tubes à centrifuger ayant des bouchons à vis. Ces tubes sont placés horizontalement pour permettre à toutes les amibes d'être attachées à un substrat solide. Après le temps d'incubation désiré, temps précisé dans les résultats, les amibes sont lavées trois fois avec la solution M ce qui élimine les liposomes libres. Les amibes sont alors observées au microscope à fluorescence (Lietz, modèle Dialux) afin d'évaluer l'incorporation de la substance fluorescente en fonction des différentes conditions utilisées.

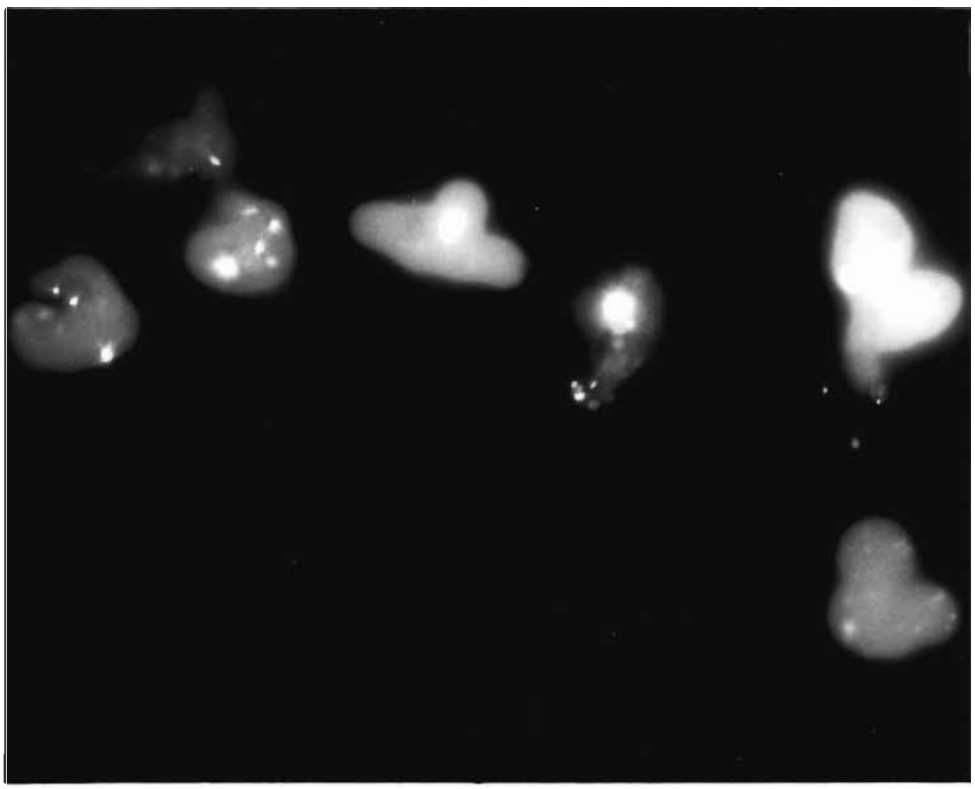
2.6.2 Évaluation des interactions entre les amibes et les liposomes

En incubant des liposomes contenant de la CF avec les amibes, nous obtenons deux distributions différentes de la fluorescence à l'intérieur des cellules; soit des points discrets de fluorescence (figure 4a) qui correspondent aux liposomes phagocytés, soit une fluorescence diffuse indiquant le transfert de la CF des liposomes vers le cytoplasme des amibes, soit une combinaison des deux (figure 4b). Nous avons donc noté la distribution de ces 2 types de fluorescence dans les amibes.

FIGURE 4: Distribution de la fluorescence dans les amibes

a) Amibes incubées 30 min avec des liposomes PC: AO (9:1) contenant de la CF 10^{-2}M.
Sur cette photo on distingue une amibe qui a phagocyté plusieurs liposomes. Certains liposomes sont hors foyer et causent des halos de fluorescence mais il n'y a pas de fluorescence diffuse; X 800.

b) Amibes incubées 3 heures avec des liposomes PC: AO (9:1) contenant de la CF 10^{-2}M.
Après 3 heures d'incubation on observe une fluorescence diffuse dans les amibes. L'intensité de la fluorescence varie d'une cellule à l'autre. Il y a aussi des points discrets de fluorescence qui correspondent à des liposomes phagocytés; X 700.



Nous avons aussi développé une méthode simple qui permet d'évaluer la concentration cytoplasmique de CF ou si on préfère du produit qui était encapsulé dans les liposomes. Cette méthode quoique semi quantitative nous permet de comparer l'efficacité du transfert de la CF des liposomes au cytoplasme de l'amibe lors des différentes expériences.

Pour évaluer la concentration cytoplasmique de CF nous avons calibré le microscope à fluorescence avec des solutions de CF de différentes concentrations. Avec un microscope, il est très difficile d'évaluer objectivement l'intensité de la fluorescence. Nous pouvons toutefois déterminer facilement une concentration de CF où l'on commence à observer de la fluorescence. Cette concentration est de 10^{-6}M avec la CF. Lorsque nous avons observé une faible fluorescence diffuse dans les amibes, nous avons conclu que la concentration cytoplasmique de CF était d'environ 10^{-6}M. Par convention, ce résultat est noté +.

Pour toutes les expériences, nous avons évalué avec le microscope à fluorescence l'intensité de la fluorescence diffuse dans les amibes, en les comparant entre elles, et en indiquant le résultat par un nombre de +. Pour quantifier l'échelle de mesure utilisée nous avons procédé comme suit: premièrement, nous avons choisi une préparation de liposomes qui permettait d'introduire beaucoup de CF dans le cytoplasme des amibes, puis nous avons refait une incubation, en diminuant la concentration de la solution de CF encapsulée dans ces liposomes, de manière à obtenir une concentration cytoplasmique de CF de 10^{-6}M. Nous pouvions donc calculer la dilution de la CF entre les liposomes et le cytoplasme des amibes. Nous avons ainsi défini que + correspondait à une concentration cytoplasmique de CF de 10^{-6}M et ++++ à une concentration cytoplasmique de 10^{-5}M.

2.7 Microscopie électronique

2.7.1 Coloration négative

Toutes nos préparations de liposomes ont été observées au microscope électronique (Phillips modèle 201). Les préparations sont tout d'abord diluées environ 20 fois. Une goutte de la préparation est étalée sur une grille de 400 mesh, recouverte de formvar-carbone, puis colorée négativement par une goutte de molybdate d'ammonium 0.5% en solution aqueuse.

2.7.2 Coupes fines

La fixation des amibes est faite par l'introduction, directement dans la préparation, de 1.5% de glutaraldéhyde dans du tampon phosphate 0.1M, pH 6.3. L'introduction du fixateur doit se faire doucement, de telle manière que les amibes restent attachées au substrat de verre. La fixation dure 1 heure à température de la pièce. On procède ensuite à une post-fixation à l'acide osmique (OsO_4) à 0.2% dans le même tampon phosphate, 15 min à 4°C. Les spécimens sont alors déshydratés par des bains successifs d'éthanol à concentration croissante, puis inclus dans la résine de SPURR (91) (vinylcyclohexène dioxyde: 10 g, éther diglycidyl de polypropylèneglycol: 6 g, nonenyl succinique anhydride: 26 g, diméthylaminoéthanol: 1 g). La polymérisation des blocs dure 5 jours à 40°C.

Les blocs obtenus sont sectionnés et les coupes colorées par 4% d'acétate d'uranium dans 50% de méthanol durant 15 min, puis par le citrate de plomb suivant REYNOLDS (82).

CHAPITRE III

ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE LES LIPOSOMES ET *ENTAMOEBA HISTOLYTICA*

1. Résultats

1.1 Caractéristiques des liposomes

Les liposomes que nous avons préparés ont les caractéristiques suivantes: ils mesurent entre 0.03 et 1 µm de diamètre et sont habituellement limités par une seule bicouche de lipides comme le montre la figure 5. Les liposomes faits avec 10% ou plus d'acide oléique possédent en plus des particules lipidiques intramembranaires (figure 6a). Ces particules sont, sans doute, des micelles inverses d'acide oléique et permettent ainsi d'incorporer un fort pourcentage de lipides insaturés à une chaîne dans la membrane des vésicules. Des pourcentages aussi élevés que 20% d'acide oléique ont été mentionnés dans quelques publications (12, 42, 44, 122).

Nous avons fait une mesure du taux d'encapsulation de nos liposomes avec une préparation composée de phosphatidylcholine et d'acide oléique (rapport molaire 9:1). Le tableau III donne les résultats de cette expérience.

Nous avons obtenu un taux d'encapsulation de 25%. Selon SZOKA (97) entre 20 et 68% du volume de la phase aqueuse initiale peut être encapsulé, tout dépendant de la force ionique de la phase aqueuse

FIGURE 5: Préparation de liposomes en coloration négative. Préparation de liposomes PC:AO (9:1) contenant de la phalloïdine (15 mg/ml) colorée négativement avec du molybdate d'ammonium 0,5%. Les liposomes sont unilamellaires et leurs tailles varient de 0,03 µm à 1 µm; X 42 000.

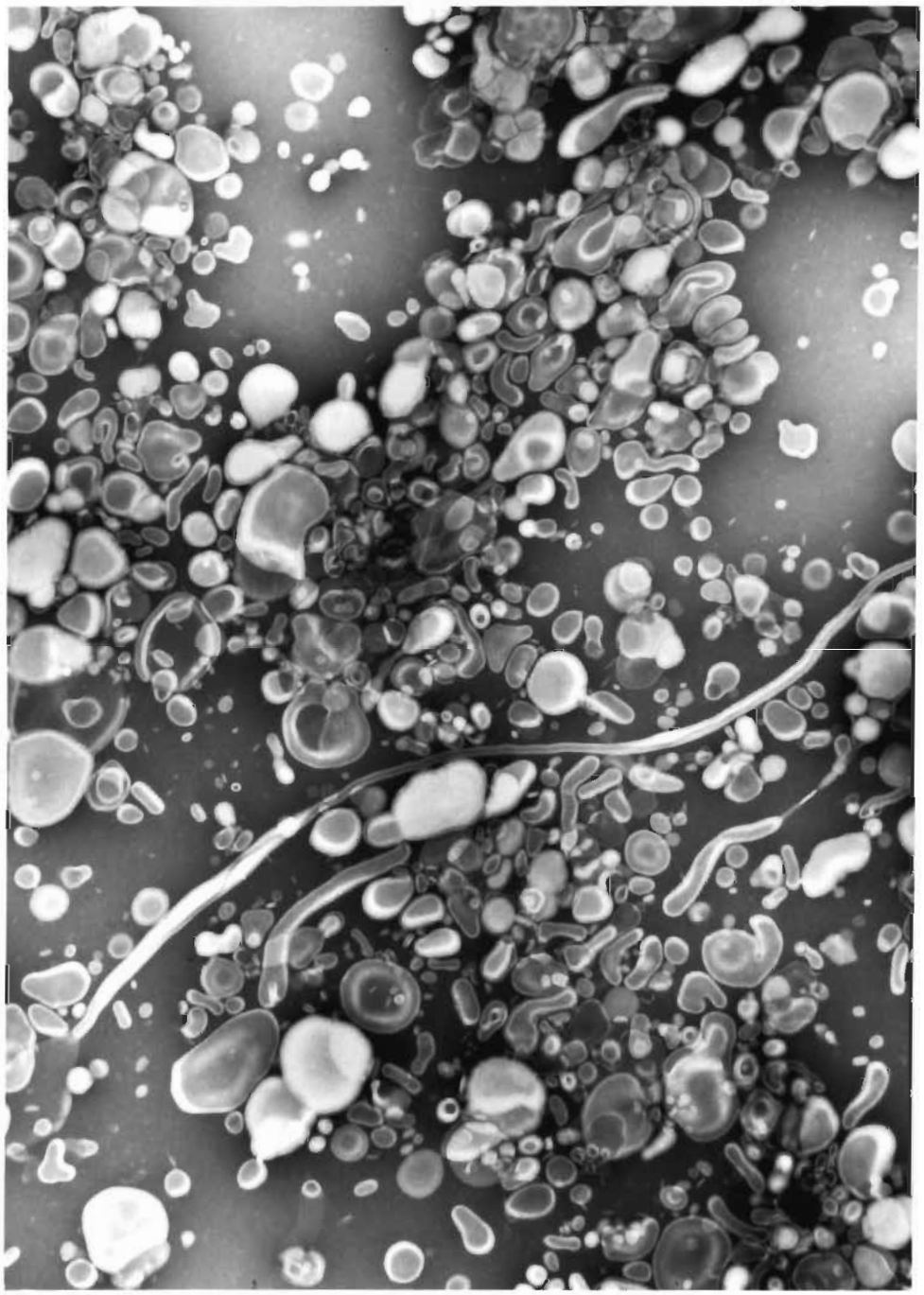


TABLEAU III: Mesure du taux d'encapsulation et de l'efficacité de la chromatographie des liposomes

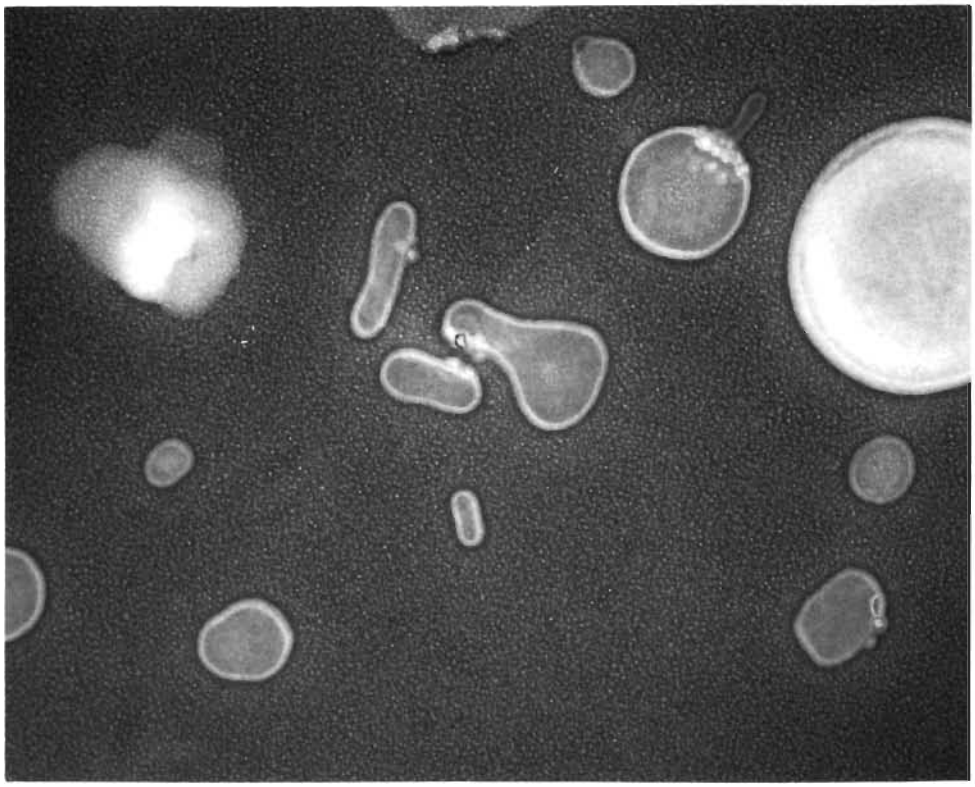
Matériel mesuré	Intensité de la fluorescence
Préparation de liposomes non chromatographiée	100
Préparation de liposomes chromatographiée 2 fois	25
CF retardée dans le gel de la 1ère chromatographie	75
CF retardée dans le gel de la 2e chromatographie	2

et du mélange de lipides utilisé. Le taux d'encapsulation de nos préparations de liposomes est donc semblable à ceux obtenus par SZOKA.

Nous avons en même temps mesuré l'efficacité de la méthode de chromatographie utilisée pour purifier les liposomes. Après la première chromatographie 97% de la CF libre, non encapsulée, est éliminée de la préparation. La quantité de CF qui reste à l'extérieur des liposomes après une première chromatographie est donc négligeable et elle ne peut être détectée au microscope à fluorescence. Des liposomes ainsi préparés apparaissent au microscope à fluorescence sous forme de points discrets de fluorescence (figure 6b). La méthode de chromatographie de FRY a donc l'avantage d'être efficace, rapide et de ne pas diluer la préparation de liposomes. L'absence de dilution permet de connaître avec précision la concentration des liposomes que l'on incube avec les amibes sans avoir à doser les lipides.

FIGURE 6: a) Observation au microscope électronique d'une préparation de liposomes PC: AO (7:3) contenant de la CF 10^{-2}M colorée négativement avec du molybdate d'ammonium 0.5%. On remarque des particules de type lipidiques incluses dans la membrane des vésicules.

b) Observation au microscope à fluorescence d'une préparation de liposomes PC: AO (9:1) contenant de la CF 10^{-2}M chromatographiée selon la méthode de FRY. Les liposomes dont la taille est supérieure au pouvoir de résolution du microscope optique apparaissent comme des points discrets de fluorescence; X 800.



1.2 Étude des interactions liposomes-*E. histolytica*

1.2.1 Influence de la composition en lipides des liposomes sur les interactions liposomes-amibes

Les différentes préparations de liposomes (selon la nature des lipides) ont été incubées successivement avec des amibes. Le tableau IV résume les résultats obtenus. Pour chaque type de liposome, 4 concentrations différentes ont été testées, et les amibes ont été observées après trois différents temps d'incubation soit, généralement, après 3, 5 et 8 heures d'incubation, mais ces temps peuvent varier d'une expérience à l'autre. Le résultat indiqué au tableau IV est celui où nous avons observé le plus de fluorescence diffuse dans le cytoplasme de l'amibe. Les conditions expérimentales de ces résultats optimaux sont données au tableau V.

Dans le tableau IV nous remarquons que quelle que soit la composition en lipides il y a la même quantité de points discrets de fluorescence à l'intérieur du cytoplasme des amibes. Le taux de phagocytose est donc indépendant de la composition en lipides.

Par contre, l'intensité de la fluorescence diffuse dans le cytoplasme des amibes est fortement influencée par la nature des lipides qui constituent les liposomes. Si nous considérons les liposomes faits seulement de phosphatidylcholine comme notre standard, huit des quatorze compositions en lipides testées ne sont pas plus efficaces pour introduire de la CF dans le cytoplasme des amibes. Par contre, tous les liposomes préparés avec de l'acide oléique ont permis un transfert d'une quantité

TABLEAU IV: Effet de la composition en lipides sur les interactions liposomes-amibes

Composition en lipides *		Intensité relative des points de fluorescence	Intensité relative de la fluorescence diffuse
PC		+ +	+ +
PC: SA	8:2 (+)	+ +	+ +
PC: SA	8.5:1.5 (+)	+ +	+ +
PC: SA	9:1 (+)	+ +	+ + +
PC: AO	8.5:1.5 (−)	+ +	+ + +
PC: AO	9:1 (−)	+ +	+ + + + +
PC: AO	9.4:0.6 (−)	+ +	+ + + +
PC: rétinol	8.5:1.5	+ +	+ +
PC: rétinol	9:1	+ +	+ +
PC: rétinol	9.4:0.6	+ +	+
PC: PS	8:2 (−)	+ +	-
PC: SA: AO	8:1.2:0.8 (+)	+ +	+ + +
PC: AP: AO	8:1:1 (−)	+ +	+ + + +
PC: Cho: Gan	4.5:4.5:1	+	-
PC: PS	9:1 (−)	+ +	+ +

PC: Phosphatidylcholine

PS: Phosphatidylsérine

AP: Acide phosphatidique

Cho: Cholestérol

Gan: Ganglioside

SA: Stéarylamine

AO: Acide oléique

* La première colonne indique les lipides utilisés, la deuxième colonne le rapport molaire du mélange des lipides et la charge des liposomes est indiquée entre parenthèses. La composition en lipide donnée dans ce tableau est celle du mélange initial utilisé pour préparer les liposomes et non la composition lipidique des liposomes eux-mêmes. Ces deux valeurs pouvant être fort différentes.

plus importante de CF des liposomes vers le cytoplasme des amibes. C'est finalement le mélange PC:AO (9:1) qui fut le plus efficace.

Nos résultats montrent que, lorsque l'acide oléique est remplacé par d'autres lipides à une chaîne comme la stéarylamine ou le rétinol, il n'y a aucune augmentation du taux de transfert de la CF. L'effet de l'acide oléique sur la membrane des vésicules est donc différent de celui de la stéarylamine ou du rétinol. Si on substitue une partie de la phosphatidylcholine par de l'acide phosphatidique (mélange PC:AP:AO (8:1:1)) le transfert de la CF diminue. La composition de la partie polaire de la membrane des liposomes influence aussi les interactions et une quantité importante de phospholipides chargés négativement inhibe le transfert de la CF des liposomes vers le cytoplasme des amibes. Les liposomes faits de phosphatidylcholine et de phosphatidylsérine ont souvent été utilisés par d'autres auteurs pour introduire des produits encapsulés dans des liposomes à l'intérieur de cellules de mammifères (76, 106). Ce mélange s'est avéré être peu ou pas efficace avec *E. histolytica*. La nature même de la cellule influence donc les interactions liposomes-cellules et *E. histolytica* ne réagit pas de la même manière que les autres cellules. Les résultats que nous avons obtenus ne sont donc valables que pour *E. histolytica* et ne peuvent s'extrapoler à d'autres souches cellulaires.

Les conditions expérimentales permettant d'obtenir les résultats optimaux varient légèrement d'un mélange de lipides à un autre (tableau V). En général il faut entre 1 et 4 µmoles de lipides par ml et des temps d'incubation de 3 heures ou moins pour atteindre l'intensité de fluorescence diffuse maximale. Ces conditions sont semblables à celles généralement utilisées par d'autres auteurs (5, 35, 117).

TABLEAU V: Conditions optimales d'incubation en fonction de la composition en lipides.

Composition en lipides		Concentrations de liposomes (µmole/ml)	temps d'incubation *
PC		1	2h45
PC: SA	8:2 (+)	1	2H45
PC: SA	8.5:1.5 (+)	4	6H30
PC: SA	9:1 (+)	1	2h00
PC: AO	8.5:1.5 (−)	1	3h00
PC: AO	9:1 (−)	1	5h00
PC: AO	9.4:0.6 (−)	1	2h00
PC: rétinol	8.5:1.5	1	2h15
PC: rétinol	9:1	10	5h15
PC: rétinol	9.4:0.6	10	2h15
PC: PS	8:2 (−)	4	3h00
PC: PS	9:1 (−)	1	4h30
PC: SA: AO	8:1.2:0.8 (+)	4	3h00
PC: AP: AO	8:1:1 (−)	4	2h00
PC: Cho: Gan	4.5:4.5:1	2	3h00

* C'est le temps le plus court au bout duquel la fluorescence diffuse est maximum.

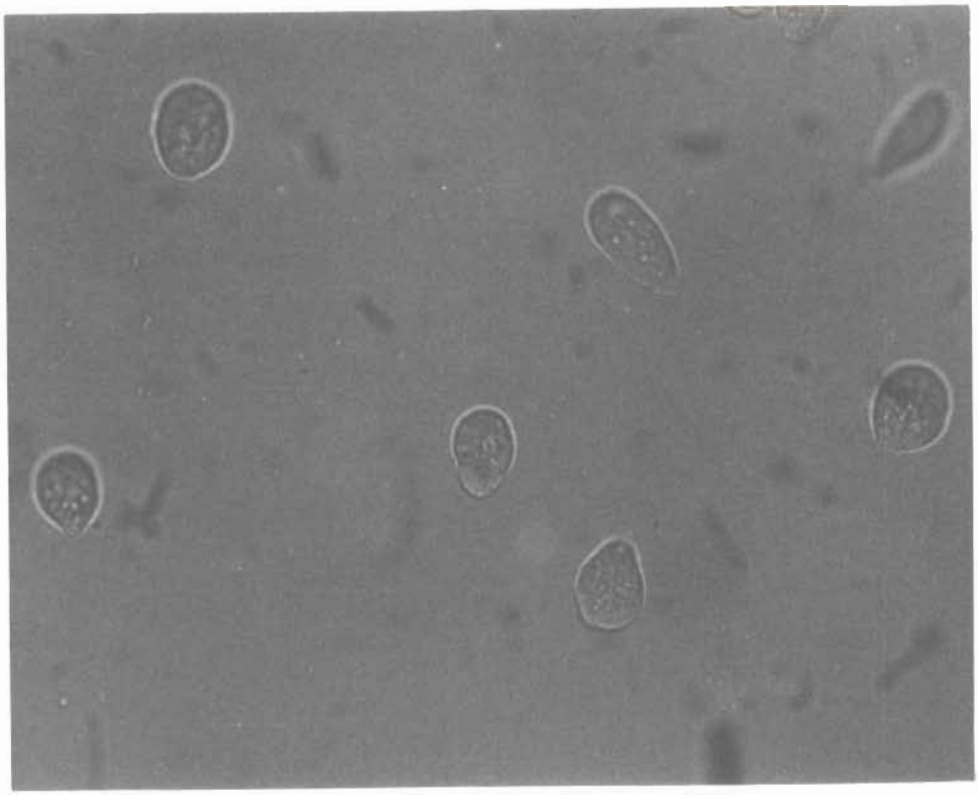
Il est à noter que dans toutes les expériences, il y avait toujours des amibes qui ne réagissaient pas avec les liposomes et n'avaient aucune fluorescence. La figure 7a montre 7 amibes vues au microscope optique en lumière transmise. La figure 7b présente les mêmes amibes observées en fluorescence; 3 des 7 amibes sont très fluorescentes, deux autres ne sont que légèrement fluorescentes et deux n'ont pas réagi .

La composition en lipides la plus efficace pour induire le transfert de la CF vers le cytoplasme des amibes est le mélange PC: AO (9:1). Dans ces conditions nous avons estimé la quantité de CF transférée dans le cytoplasme de l'amibe. Après avoir calibré le microscope avec des solutions de CF de concentrations connues, nous pouvons dire que la concentration de CF qui se retrouve dans le cytoplasme de l'amibe se situe autour de 3×10^{-5}M, dans les conditions optimum. La CF est donc diluée d'environ 330 fois en passant des liposomes au cytoplasme de l'amibe.

1.2.2 Effet de la concentration en liposomes sur le transfert de la CF dans le cytoplasme des amibes.

Pour chaque composition en lipides, nous avons évalué l'influence de la concentration en liposomes sur l'intensité du transfert de la CF des liposomes vers le cytoplasme de l'amibe. Le tableau VI présente les résultats pour des liposomes à 4 concentrations différentes. Dans tous les cas, nous observons que de fortes concentrations de liposomes (10 µmoles/ml) sont moins efficaces pour transférer la CF dans le cytoplasme des amibes. Un excès de liposomes a donc un effet inhibiteur. La concentration optimale de liposomes se situe entre 1 et 4 µmoles de lipides/ml.

FIGURE 7: Différentes sensibilités des cellules au traitement par les liposomes. Des amibes sont incubées pendant 3 heures avec 4 µmoles/ml de liposomes PC:AO (9:1) contenant 10^{-2}M de CF. Les mêmes amibes sont observées en lumière transmise (a) puis en fluorescence (b). On remarque que 2 des 7 amibes n'ont aucune fluorescence et que seulement 3 amibes sont fortement fluorescentes. Grossissement pour les deux photos, X 700.



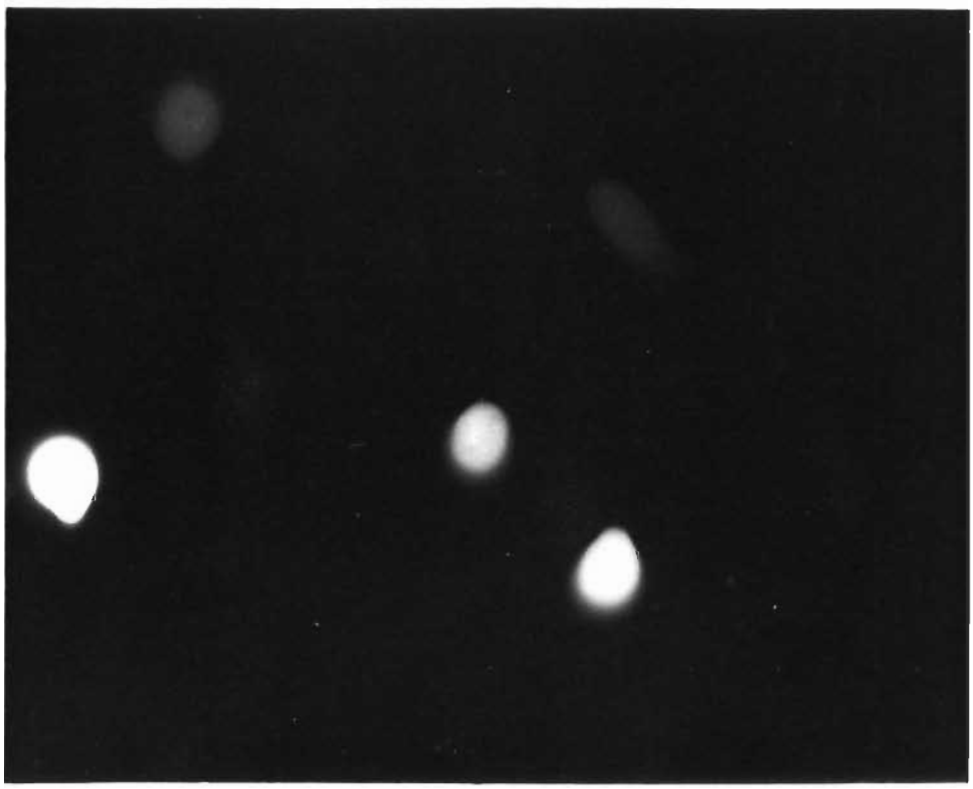


TABLEAU VI: Effet de la concentration en liposomes sur l'intensité de la fluorescence diffuse.

Compositions en lipides		Concentration en liposomes (µmole/ml)			
		1	4	7	10
PC		+ +	+	+	+
PC: SA	9:1 (+)	+ + +	+	+	+
PC: AO	9:1 (−)	+ + + + +	+ + + +	+ + +	+ + +
PC: AP: AO	8:1:1 (−)	+ + +	+ + + +	+ + + +	+ + +

Nous pouvons aussi observer cet effet inhibiteur de fortes concentrations de liposomes sur l'intensité de la fluorescence diffuse à la figure 8. Dans cette expérience des liposomes faits de PC: AO (9:1) ont été incubés avec des amibes, à 3 concentrations différentes, et nous pouvons voir que l'on obtient le transfert maximum de CF dans le cytoplasme des amibes pour des concentrations de liposomes entre 2 et 4 µmoles de lipides/ml. Pour de plus fortes concentrations de lipides (10 µmoles) il y a inhibition de l'interaction entre les liposomes et les amibes.

1.2.3 Influence du temps d'incubation

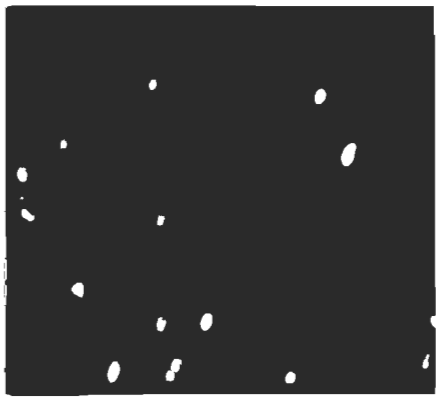
Les amibes incubées avec les liposomes ont été observées après différents temps d'incubation variant entre 2 et 20 heures. Le tableau VII donne l'intensité de la fluorescence diffuse en fonction du temps d'incubation. Après 4 heures d'incubation, il n'y a aucune augmentation de la fluorescence diffuse. Le transfert de la CF des liposomes vers le cytoplasme de l'amibe est donc un phénomène saturable.

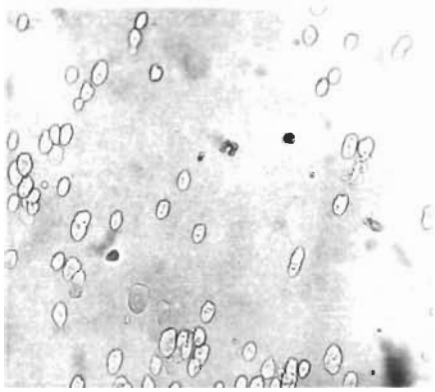
FIGURE 8: Effet de la concentration en liposomes sur l'intensité de la fluorescence diffuse dans le cytoplasme des amibes.

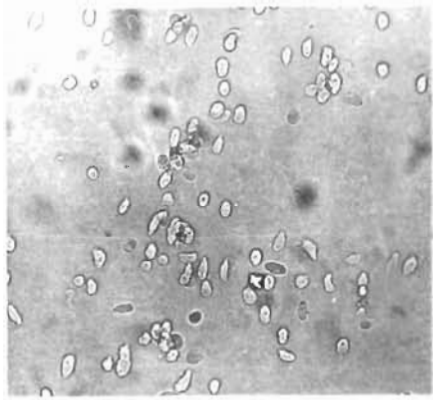
Des amibes sont incubées pendant 3 heures avec des liposomes PC:AO (9:1) contenant de la CF (10^{-2}M)et observées à la fois en lumière transmise (b-d-f) et en fluorescence (a-c-e), X 40.

Les amibes sont incubées avec 3 concentrations différentes de liposomes, 2 µmoles/ml (a-b), 4 µmoles/ml (c-d) et 10 µmoles/ml (e-f).

On remarque que les amibes de la figure 8e sont nettement moins fluorescentes que les amibes incubées avec des concentrations plus faibles de liposomes.







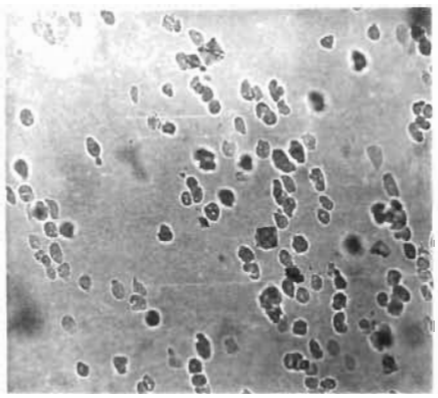


TABLEAU VII: Influence du temps d'incubation sur l'intensité de la fluorescence diffuse.

Composition en lipides		Temps d'incubation (heures)			
		2	4	8	20
PC: AO	9:1 (−)	+ + +	+ + + + +	N.D.	+ + + + +
PC: AO	9.4:0.6 (−)	+ + + +	+ + + +	+ + + +	N.D.
PC: rétinol	9.4:0.6	+	+	+	N.D.

1.2.4 Contrôle

Afin de vérifier si la CF libre non encapsulée pénètre dans les amibes, nous avons incubé les amibes durant 8 heures dans la solution M additionnée de CF à concentration de 10^{-4}M. Cette concentration correspond à la concentration que l'on obtiendrait si toute la CF encapsulée dans les liposomes était libérée dans le milieu d'incubation lors des expériences. Lorsque nous observons les amibes il n'y a aucune fluorescence dans le cytoplasme (figure 9a). Les amibes ne sont pas affectées par la présence de CF à l'extérieur. Ce résultat montre que la CF ne pénètre pas dans les amibes par simple diffusion et que la fluorescence diffuse observée dans les amibes après traitement aux liposomes ne peut être due aux traces de CF à l'extérieur des liposomes.

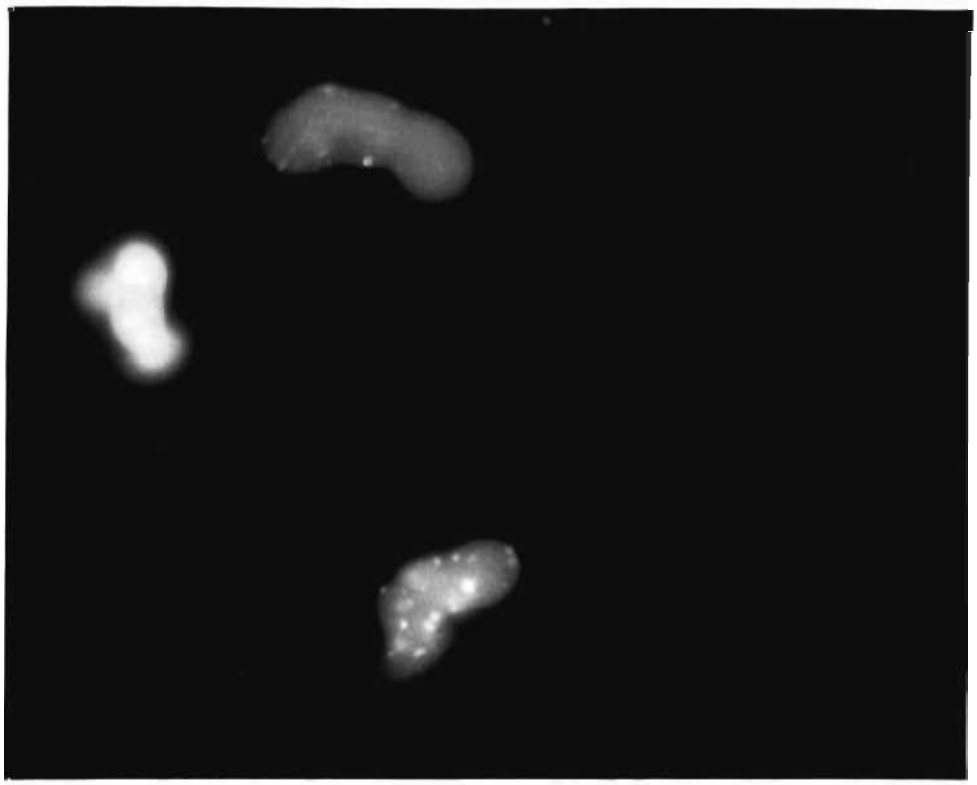
1.3 Etude du mécanisme de transfert de la CF des liposomes composés de PC: AO (9:1) vers le cytoplasme de *E. histolytica*.

Nous avons aussi déterminé le mécanisme de transfert de la CF des liposomes vers le cytoplasme des amibes. Pour distinguer entre une

FIGURE 9: Effet de la présence de CF libre dans le milieu d'incubation.

a) Amibes incubées 3 heures dans la solution M additionnée de CF à concentration de 10^{-4}M. Nous n'observons aucune fluorescence. La CF ne pénètre pas par simple diffusion dans les amibes; X 800.

b) Amibes incubées 3 heures avec 5 µmoles/ml de liposomes PC:AO (9:1) contenant de la CF 10^{-2}M. Ce sont les liposomes qui transfèrent la CF dans les amibes; X 800.



fusion des liposomes avec la membrane de l'amibe ou une phagocytose des liposomes suivie d'une diffusion de la CF des vacuoles digestives vers le cytoplasme de l'amibe,nous avons fait les expériences décrites ci-dessous.

1.3.1 Etude de la cinétique du transfert de la CF

La première expérience vise à déterminer comment la fluorescence apparaît dans les amibes. Nous avons incubé les amibes avec les liposomes pendant des temps courts de 15 et 60 min, puis nous avons éliminé les liposomes du milieu d'incubation et continué l'expérience en observant les amibes en fonction du temps. Lors de chaque observation nous avons noté l'intensité de la fluorescence diffuse ainsi que la présence de points discrets de fluorescence. Les résultats sont présentés au tableau VIII.

Pour le premier cas, nous avons ajouté les liposomes au temps 0. Après 15 min d'incubation nous avons éliminé les liposomes et 20 min plus tard soit 35 min après le début de l'expérience nous avons observé les amibes au microscope à fluorescence. 25 min plus tard nous avons observé de nouveau ces mêmes amibes et noté l'évolution de la distribution de la fluorescence dans les amibes et ainsi de suite. On remarque que lorsque les amibes sont en contact avec les liposomes, ceux-ci sont phagocytés, ce qui donne des points discrets de fluorescence. Après l'élimination des liposomes du milieu extérieur la seule source de CF qui reste est des liposomes contenant de la CF et se trouvant dans les amibes à l'intérieur de vacuoles digestives. Or, 2 heures après le début de l'expérience on observe l'apparition de la fluorescence diffuse cytoplasmique.

TABLEAU VIII: Cinétique du transfert de la CF

Temps d'incubation avec les liposomes (min)	Intensité relative de la fluorescence x min après le début de l'expérience				
	35	70	90	130	150
15	+	+	+	+	N.D. (discrète)
	–	–	–	+	N.D. (diffuse)
60		+ +	+ +	+ +	N.D. (discrète)
		–	–	+ +	N.D. (diffuse)
105				+ +	+ + (discrète)
				+ + +	+ + +(diffuse)

Cette fluorescence ne peut donc provenir que d'une diffusion de la CF à partir des vacuoles digestives.

1.3.2 Effet d'une inhibition de la phagocytose

Nous avons ensuite incubé des liposomes faits de PC: AO (9:1) contenant 10^{-2}M de CF avec les amibes à une température de 10°C. A cette température, la phagocytose est inhibée sans que les amibes n'en soient affectées. Après 2 heures d'incubation il n'y avait aucune fluorescence diffuse ni aucun point discret de fluorescence. Par conséquent, l'apparition de la fluorescence diffuse dans le cytoplasme de l'amibe doit passer par une étape de phagocytose et ne peut être provoquée par une fusion directe entre les liposomes et la cellule.

1.3.3 Étude des interactions liposomes-amibes à l'aide de deux autres marqueurs

Afin de vérifier l'hypothèse d'une diffusion de la CF à partir des vacuoles digestives, nous avons encapsulé deux macromolécules dans les liposomes: de la ferritine ou de l'albumine couplée à la fluorescéine. Ces protéines sont de grosses molécules qui ne peuvent diffuser à travers les membranes. Lorsque nous incubons les liposomes PC:AO (9:1) contenant l'albumine fluorescente avec les amibes, nous observons des points discrets de fluorescence sans jamais obtenir de fluorescence diffuse. L'albumine reste donc enfermée dans les vacuoles digestives.

L'incubation de liposomes contenant de la ferritine avec des amibes nous permet d'observer, au microscope électronique, de la ferritine à l'intérieur des vacuoles digestives (figure 10a) mais aucune molécule de ferritine libre dans le cytoplasme de l'amibe.

Ces deux expériences montrent donc que les liposomes ont été phagocytés et qu'il n'y a pas eu de fusion entre les liposomes et la membrane cytoplasmique des amibes. Il ne se produit pas, non plus, de fusion entre les liposomes phagocytés et la membrane des vacuoles digestives.

1.3.4 Mécanisme de transfert proposé

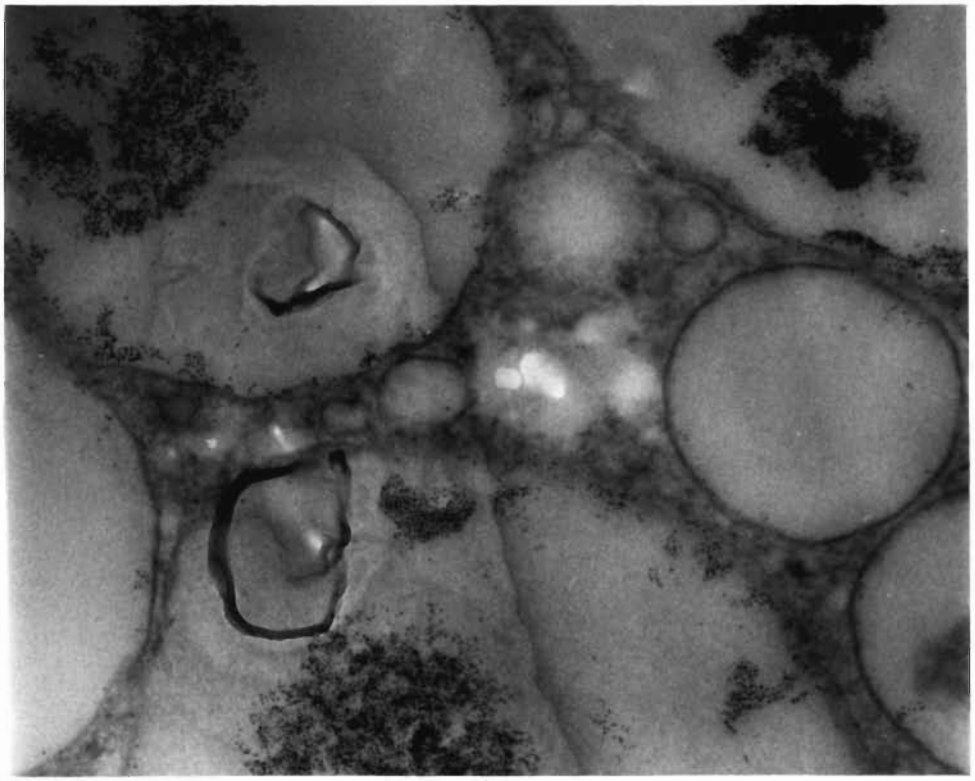
De ces expériences, nous pouvons conclure que les liposomes sont tout d'abord phagocytés, puis que la CF encapsulée dans les liposomes diffuse des vacuoles digestives vers le cytoplasme de l'amibe. En aucun moment nous n'avons obtenu un résultat suggérant une fusion des liposomes avec la membrane de l'amibe, que ce soit la membrane externe ou la membrane de la vacuole digestive.

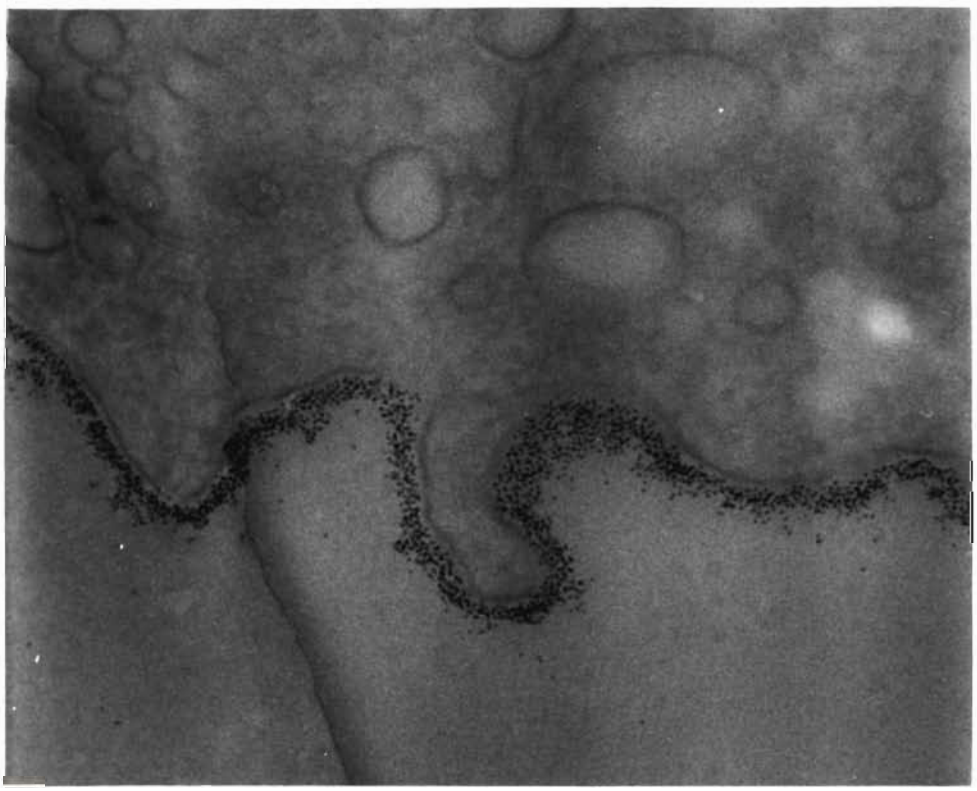
FIGURE 10: Etude des interactions liposomes-amibes à l'aide de liposomes contenant de la ferritine.

Nous observons ici des coupes fines d'amibes qui n'ont pas été colorées de manière à mettre en évidence la ferritine.

a) Amibes incubées 3 heures avec des liposomes contenant de la ferritine (25 mg/ml). On remarque qu'il y a beaucoup de ferritine à l'intérieur des vacuoles mais qu'il n'y en a pas dans le cytoplasme; X 72 000.

b) Comme contrôle pour l'expérience ci-dessus nous avons incubé les amibes en présence de ferritine libre dans le milieu d'incubation. La ferritine s'adsorbe très fortement à la surface de la membrane cellulaire mais elle ne pénètre pas dans la cellule. Il n'y a aucune molécule de ferritine dans le cytoplasme ni dans les vacuoles des amibes témoins; X 107 000.





2. Discussion

2.1 Critiques des méthodes utilisées

Notre principal objectif était d'introduire de la phalloïdine dans le cytoplasme de *E. histolytica*. Cet objectif a imposé certaines contraintes quant au choix de la méthode de préparation des liposomes et de la méthode de mesure des interactions entre les liposomes et les amibes.

2.1.1 Préparation des liposomes

2.1.1.1 Choix de la méthode de préparation des liposomes

La première contrainte provient du produit que nous désirons introduire. La phalloïdine est rare et chère. Nous devons donc utiliser une méthode qui permette un taux d'encapsulation très élevé de manière à économiser le plus possible de phalloïdine.

Il existe plusieurs méthodes pour préparer des liposomes (pour une revue voir 9). Trois méthodes donnent un taux d'encapsulation élevé. La méthode de centrifugation de prévésicules à travers une monocouche de lipides (TRAUBLE et GRELL (102)) a un rendement théorique de 100%. Cependant elle nécessite des conditions très particulières qui ne sont pas compatibles avec nos conditions expérimentales.

La méthode d'injection d'une solution d'éther de DEAMER et BANGHAM (16, 17) modifiée par SCHIEREN (87) donne aussi un bon rendement (20% d'encapsulation selon SCHIEREN (87)). Nous avons cependant préféré la méthode de SZOKA et PAPAHADJOPOULOS (97) car elle permet une encapsulation encore plus élevée (25%) et nous disposions des appareils nécessaires

à la préparation des liposomes ce qui n'était pas le cas pour la méthode d'injection de l'éther.

2.1.1.2 Mise au point de la méthode de préparation des liposomes

Au début de notre travail SZOKA (97) n'avait publié ses résultats que sous une forme préliminaire. Il manquait des informations concernant l'évaporation de l'éther. Pour obtenir de bonnes préparations de liposomes nous avons trouvé qu'il fallait, au début, évaporer l'éther lentement, soit sous un vide partiel avec l'évaporateur rotatif fonctionnant à faible vitesse de rotation. Après le renversement de phases, la préparation doit être évaporée sous le vide maximal donné par la pompe à eau.

Dans un article publié tout récemment, SZOKA (96) a précisé les étapes de l'évaporation. L'évaporation doit être faite sous une pression de 400 mm Hg jusqu'à la formation du gel. Le gel est alors soumis au vortex, puis l'évaporation se poursuit sous une pression de 730 mm Hg. Après le renversement de phases il évapore sous un vide élevé de manière à éliminer toute trace d'éther. Notre méthode d'évaporation correspond en général aux conditions expérimentales de SZOKA. Avec un ballon de 50 ml notre expérience montre qu'il est inutile d'utiliser le vortex si la vitesse de rotation de l'évaporateur est réduite. En effet, à faible vitesse de rotation, le gel est soumis à un mouvement constant ce qui produit un effet semblable au vortex. Par contre avec le tube de 13 mm de diamètre, il est préférable de soumettre le gel au vortex. Dans un tube étroit le gel ne bouge pas, mais reste collé aux parois du tube.

2.1.1.3 Caractéristiques des liposomes

La méthode de SZOKA et PAPAHADJOPOULOS produit des liposomes qui ont entre 0.03 et 1 micromètre de diamètre. Ces préparations hétérogènes en taille conviennent toutefois très bien à l'étude des interactions entre des liposomes et *E. histolytica*. L'amibe se nourrit normalement de bactéries ou de particules de tailles très diverses et la taille, dans ces limites, n'a pas d'influence sur la phagocytose.

Des liposomes de taille relativement importante (un diamètre de 0.5 µm comparé à celui de 0.030 µm des petits liposomes) offrent un avantage important car il faut moins de liposomes pour faire pénétrer un même volume de solution. En effet le volume d'un liposome de 0.5 µm a le même volume que 4600 petits liposomes de 0.03 µm de diamètre.

La majorité des vésicules produites au cours de nos expériences sont unilamellaires. Cette caractéristique est avantageuse lorsqu'on désire introduire une solution aqueuse dans une cellule. Tout d'abord, des vésicules multilamellaires n'encapsulent pas autant de solution aqueuse. D'autre part, le matériel encapsulé doit traverser plusieurs membranes pour se retrouver dans le cytoplasme ce qui ralenti ou même empêche la diffusion du produit encapsulé.

2.1.2 Critique de la méthode de mesure des interactions liposomes-amibes

Notre objectif était d'introduire une solution dans des amibes. Nous avons donc choisi une méthode de mesure qui permette de suivre la solution encapsulée sans nous intéresser aux interactions entre les lipides du liposome et la membrane de la cellule puisque ces interactions

entre les lipides sont de peu d'intérêt pour notre recherche.

Pour notre travail, il était nécessaire d'évaluer la quantité du produit encapsulé qui se retrouve dans le cytoplasme de la cellule. Nous devions donc avoir une méthode qui permette de mesurer la concentration cytoplasmique du produit transporté par les liposomes. La quantité totale de liposomes qui interéagissent avec les amibes n'était pas une mesure valable. Plusieurs chercheurs ont en effet démontré que des liposomes d'une composition donnée peuvent interagir en très grand nombre avec une cellule mais être moins efficaces pour transférer leur contenu que d'autres liposomes qui se lient moins à cette même cellule (52, 69, 104).

Dans les recherches publiées antérieurement, la quantité de substance introduite dans les cellules, par des liposomes, est très faible. Il y a généralement une dilution dans le cytoplasme des cellules de 10^5 ou plus, du produit qui était encapsulé dans les liposomes (36, 106, 117). Pour évaluer les interactions entre des liposomes et des cellules, il faut donc utiliser un marqueur que l'on peut suivre facilement à des concentrations très variées couvrant 5 ordres de grandeur. Il faut aussi déterminer la position, la distribution homogène ou non du marqueur dans la cellule. Plusieurs marqueurs fluorescents dont la 6-carboxyfluoresceine (CF), proposée par WEINSTEIN en 1977 (117), ont de telles propriétés. La CF a déjà été très utilisée afin d'évaluer les interactions liposomes-cellules (8, 41, 52, 53, 54, 55, 80, 105, 106, 116), c'est pourquoi nous avons choisi ce marqueur.

Toutefois, au cours de cette recherche plusieurs articles ont

critiqué l'utilisation de la CF (81, 94, 106). RALSTON (81) en outre a montré que les préparations commerciales de CF contiennent des impuretés qui peuvent influencer les résultats. Mais il estime que l'influence est négligeable lorsque le transfert de la CF est de l'ordre de grandeur de celui que nous avons obtenu. Pour contourner certaines difficultés causées par la CF, d'autres marqueurs fluorescents ont été utilisés (FITC dextran (106), la calceine I (1) et l'obéline (36)) mais aucun ne rencontre toutes les exigences d'un marqueur idéal et ils ne sont pas supérieurs à la CF.

Selon WEINSTEIN, l'utilisation de la CF permet de déterminer qualitativement s'il se produit une adsorption, une phagocyte ou une fusion des liposomes avec une cellule. Si on incube des liposomes contenant de la CF à des concentrations de 10^{-2}M avec des cellules, on peut observer trois phénomènes différents avec un microscope à fluorescence. Premièrement on peut observer des points discrets de fluorescence dans le cytoplasme. Ceci indique que les liposomes sont intacts et comme ils sont à l'intérieur des cellules on peut conclure qu'ils ont été phagocytés. Deuxièmement, on peut observer un cercle de fluorescence autour des cellules (55, 116) ce qui indique que les liposomes sont adsorbés à la surface. Troisièmement, si un liposome fusionne avec une cellule, son contenu se déverse dans tout le cytoplasme et malgré la dilution importante on observe une fluorescence diffuse cytoplasmique.

WEINSTEIN (117) a aussi effectué des mesures quantitatives avec la CF. Il a étudié les interactions entre des petits liposomes unilamellaires contenant de la CF à des concentrations de 200 mM et des lymphocytes. Dans les conditions expérimentales utilisées par WEINSTEIN,

l'augmentation de la fluorescence totale est fonction de la fluorescence diffuse cytoplasmique, car la fluorescence des liposomes phagocytés ou adsorbés ne représente que 20% de l'intensité de la fluorescence mesurée (106). Avec un F.C.A.S. (fluorescence-activated cell sorter, appareil mesurant la fluorescence de chaque cellule séparément), WEINSTEIN a mesuré la fluorescence diffuse chez les lymphocytes et établi un histogramme de la fluorescence diffuse de la population de lymphocytes utilisée.

Quoique pouvant donner des résultats intéressants, cette technique n'est pas applicable dans nos conditions expérimentales. Nous avons utilisé de gros liposomes pour les raisons décrites plus tôt (taux d'encapsulation élevé, volume capturé par liposome élevé, liposomes unilamellaires). De tels liposomes lorsqu'ils contiennent 200 mM de CF restent fortement fluorescents. Cette fluorescence, différente de celle des petits liposomes unilamellaires s'explique par le diamètre des liposomes ou, si on préfère, le parcours optique du produit fluorescent. Avec notre amibe il y avait presque toujours simultanément des points discrets de fluorescence et de la fluorescence diffuse dans le cytoplasme. Il aurait été impossible de relier la mesure de la fluorescence totale d'une cellule à celle de la fluorescence diffuse seulement.

Pour faire des mesures quantitatives on aurait pu briser les amibes sans briser les vacuoles digestives, séparer ces vacuoles et mesurer séparément la fluorescence des cellules brisées et du contenu des vacuoles. On obtiendrait ainsi un résultat moyen par amibe. Cependant, nous avons observé que l'intensité de la fluorescence diffuse varie beaucoup d'une cellule à l'autre (figure 7a et 7b). Cette variation n'est pas due à la composition chimique du liposome mais à d'autres

facteurs difficilement contrôlables comme le stade du cycle de croissance d'une cellule (69, 104). Il devient alors très difficile d'interpréter le résultat d'une expérience si ce résultat n'est exprimé que par un seul chiffre. Un résultat moyen masque des phénomènes pouvant être importants dans l'interprétation des interactions liposomes-amibes.

Devant ces difficultés, nous nous sommes limités à noter le type de fluorescence (discrète ou diffuse) présente dans les amibes, et à évaluer l'intensité de la fluorescence diffuse d'une manière semi-quantitative. Cette approche nous permet de comparer les résultats des différentes expériences et d'avoir une idée assez exacte de l'efficacité du transfert du contenu des liposomes vers le cytoplasme de l'amibe. De plus, ce type de mesure est suffisant pour l'utilisation que nous voulions en faire.

2.2 Analyse des résultats

2.2.1 Effet de la composition en lipides des liposomes

Dans la première partie de cette recherche, nous avons étudié l'effet de la composition en lipides des liposomes. Nous avons utilisé plusieurs mélanges de lipides pour préparer les liposomes. La majorité des mélanges ont déjà été utilisés avec d'autres cellules (pour une revue voir 33 et 70).

Certaines compositions de lipides ont été choisies pour évaluer l'effet de la charge. Nous avons préparé des liposomes neutres, des liposomes chargés positivement en incorporant de la stéarylamine, et des liposomes chargés négativement en utilisant de la phosphatidylsérine, de l'acide phosphatidique ou de l'acide oléique. A pH 7.0 environ 30% de

l'acide oléique est dissocié (le pK d'un acide gras dans des liposomes est d'environ 7.4 selon PTAK (79)).

Nos résultats ont montré que l'amibe phagocyte tous les liposomes, quelle que soit leur charge ou leur composition (tableau III). Si on élimine du tableau III les mélanges qui contiennent de l'acide oléique on remarque aucun effet de la charge sur la présence de fluorescence diffuse dans le cytoplasme de l'amibe. La charge des liposomes n'a donc aucune influence sur les interactions entre les liposomes et *E. histolytica*. HALLETT et CAMPBELL (36) ont obtenu un résultat semblable en travaillant avec des cellules adipeuses. Toutefois, dans la majorité des études publiées (5, 35, 76), la charge du liposome influence beaucoup les interactions liposomes-cellules. Il est à noter que dans ces études la principale interaction obtenue est l'adsorption des liposomes à la surface des cellules or, nous n'avons jamais observé ce type d'interaction avec nos amibes.

Nous avons aussi étudié l'effet de la présence d'agents fusogéniques dans la membrane des liposomes. Un agent fusogénique est une substance qui facilite la fusion entre deux membranes (58). Nous avons évalué l'effet de 3 agents fusogéniques: le rétinol (31), la stéarylamine et l'acide oléique (58). La présence de la stéarylamine et du rétinol dans la membrane des liposomes n'influence pas le transfert de la CF le cytoplasme de l'amibe. Par contre, l'acide oléique induit une forte augmentation de la fluorescence diffuse, c'est à dire une augmentation du transfert de CF des liposomes dans le cytoplasme. LUCY a montré que l'acide oléique est plus efficace que la stéarylamine ou le rétinol pour induire la fusion entre des cellules (58). Cependant, dans nos expériences

l'acide oléique n'induit pas de fusion, elle augmente le transfert de la CF par un autre mécanisme.

2.2.2 Analyse des conditions d'incubation

Au cours de ces recherches, nous avons observé qu'il y avait une concentration optimale de liposomes pour induire le transfert. Lorsque la quantité de liposomes était trop élevée il y avait une diminution du transfert de la CF des liposomes au cytoplasme de l'amibe. OSTRO (69) dans une étude visant à maximiser le transfert du contenu des liposomes à des cellules cancéreuses a observé le même phénomène. Cependant, quelle que soit la quantité de liposomes ajoutée (jusqu'à 20 μmoles/ml), nous n'avons jamais observé d'effet nocif des liposomes sur les cellules.

Un autre résultat que nous avons obtenu, est qu'il n'y a aucune augmentation de la fluorescence diffuse après 4 heures d'incubation avec des liposomes. Deux explications sont possibles: le nombre de liposomes pouvant réagir avec une amibe est peut-être limité. Il se peut aussi que ce phénomène soit dû à une élimination de la CF par l'amibe.

2.2.3 Analyse du rendement du transfert du produit encapsulé

Lorsque nous avons incubé les amibes avec les liposomes PC: AO (9:1) contenant de la CF 10^{-2}M, nous avons obtenu une concentration de CF libre dans le cytoplasme d'environ 3×10^{-5}M. La CF a donc été diluée 330 fois en passant des liposomes au cytoplasme de l'amibe. Seul OSTRO (69) a obtenu un transfert aussi efficace. Tous les autres auteurs rapportent des dilutions du contenu du liposomes de 10^3 à 10^5. A titre d'exemple, SZOKA a introduit, dans le cytoplasme de fibroblastes, de l'albumine fluorescente à une concentration 5000 fois plus faible que celle du produit

encapsulé (95), et WEINSTEIN a introduit la CF dans le cytoplasme de lymphocytes avec une dilution de 10^4 (117). Nous avons donc obtenu un des meilleurs rendements de transfert du produit encapsulé vers le cytoplasme d'une cellule. Certaines expériences (37) font mention d'une quantité plus importante de produit qui demeure associé aux cellules. Cependant, dans ces expériences, les liposomes sont soit adsorbés à la surface des cellules soit phagocytés. Ces résultats sont évidemment moins intéressants car le produit encapsulé ne peut agir dans les cellules puisqu'il n'est pas à l'état libre dans le cytoplasme.

2.3 Mécanisme de transfert de la CF

En utilisant des liposomes, nous avons obtenu une fluorescence diffuse cytoplasmique très intense ainsi que plusieurs points de fluorescence dans les amibes. Notre première interprétation de ces résultats, en accord avec WEINSTEIN, était qu'il se produisait simultanément une phagocytose et une fusion des liposomes avec *E. histolytica*. Mais au moment où nous obtenions ces résultats, SZOKA (94) publiait un article mettant en doute l'interprétation de WEINSTEIN. D'après cet auteur, les propriétés de la CF induisaient une surestimation du nombre de fusion.

Afin de vérifier le mécanisme de transfert de la CF, nous avons alors encapsulé deux grosses molécules dans les liposomes: la ferritine et l'albumine. Ces deux protéines ont déjà été utilisées comme marqueur dans l'étude des interactions liposomes-cellules (39, 73, 95). Nos résultats expérimentaux montrent que les deux protéines restent dans les vacuoles digestives. Il y a bien une phagocytose des liposomes mais aucune fusion de ces liposomes avec la membrane de l'amibe, ni avec la membrane des vacuoles digestives.

Devant ces résultats contradictoires, nous avons de nouveau encapsulé de la CF dans les liposomes et nous avons déterminé la cinétique d'apparition de la fluorescence dans *E. histolytica*. Le résultat de cette expérience a clairement démontré que les liposomes sont premièrement phagocytés, puis que la CF diffuse des vacuoles digestives vers le cytoplasme. Ce type de transfert n'avait pas été observé avant le début de nos travaux. Tout récemment LESERMAN (54) a observé le même phénomène chez des cellules cancéreuses très phagocytaires.

Deux facteurs permettent d'expliquer l'intensité de la diffusion de la CF. Le premier facteur a été mis en évidence dans l'article critique de SZOKA (94) qui a mesuré la perméabilité de la CF à travers la membrane de liposomes en fonction du pH. A un pH neutre, la CF est ionisée et est très peu perméable. Par contre, à un pH acide la CF n'est pas ionisée et peut ainsi diffuser à travers la membrane du liposome. Or, le pH d'une vacuole digestive est d'environ 5,3 (90). A ce pH, la CF peut donc diffuser à travers le liposome vers le cytoplasme des cellules.

Le deuxième facteur est la présence de l'acide oléique. Lorsque nous avons ajouté l'acide oléique au mélange de lipides, il y a eu une forte augmentation du transfert de la CF vers le cytoplasme. Toutefois, selon nos résultats obtenus avec la ferritine et l'albumine fluorescente, l'acide oléique n'induit pas de fusion des liposomes. Nous pensons que le rôle de l'acide oléique serait de perturber les membranes et d'accroître ainsi la perméabilité du liposome. Il se pourrait aussi qu'une partie de l'acide oléique se retrouve dans la membrane de la vacuole digestive par échange moléculaire et affecte aussi la perméabilité de la membrane de la vacuole.

Comme contrôle supplémentaire, nous avons incubé des liposomes avec les amibes dans des conditions où la phagocytose est inhibée. Nous observons alors aucune fluorescence dans les amibes. Ce résultat montre qu'il n'y a pas de fusion entre les liposomes et les amibes à 10°C.

Cependant nos trois contrôles (ferritine, albumine fluorescente et incubation à 10°C) ne prouvent pas de manière incontestable l'absence de fusion. L'utilisation de l'albumine fluorescente est criticable; il est connu que l'albumine sert à transporter les acides gras dans le sang. Elle pourrait donc réagir avec les lipides et modifier la composition en lipides des liposomes de manière à empêcher toute fusion. La même critique est valable pour la ferritine car il n'a pas été montré si cette protéine, à la concentration utilisée, réagit ou non avec les lipides. L'absence de fusion observée à 10°C n'implique pas non plus une absence de fusion à 25°C. Malheureusement nous n'avons pas trouvé de conditions expérimentales inhibant la phagocytose de *E. histolytica* à 25°C. Les inhibiteurs habituels du métabolisme (l'azide de sodium, le cyanure, l'antamycine) sont inefficaces avec cette amibe (115).

En conclusion, nous avons montré que la CF peut diffuser des vacuoles digestives vers le cytoplasme des amibes. Nos résultats suggèrent aussi l'absence de fusion entre les liposomes et *E. histolytica*.

Il peut donc exister un important transfert du matériel encapsulé de l'intérieur des liposomes vers le cytoplasme par un autre mécanisme que la fusion. L'interprétation des résultats obtenus en utilisant la CF, telle que proposée par WEINSTEIN (117) n'est donc plus valable surtout lorsque l'on utilise des cellules très phagocytaires.

CHAPITRE IV

ETUDE DE L'EFFET DE LA PHALLOÏDINE SUR L'ULTRASTRUCTURE DE *E. HISTOLYTICA*

1. Résultats

Dans une seconde étape nous avons utilisé la technique que nous avons mise au point pour faire pénétrer de la phalloïdine dans le cytoplasme des amibes. Nous avons donc incubé pendant 20 heures les amibes avec des liposomes composés de phosphatidylcholine et d'acide oléique (9:1), contenant de la phalloïdine 10^{-2}M. Puis nous avons fixé ces amibes et les avons observées au microscope électronique. Pour cette expérience, nous avons fait trois témoins dans les mêmes conditions que précédemment:

1) des amibes de la même culture incubées dans la solution M, sans liposome ni phalloïdine: c'est notre témoin sans aucun traitement.

2) des amibes incubées dans la solution M additionnée de phalloïdine libre 10^{-4}M, mais sans liposome: c'est le contrôle avec de la phalloïdine libre dans le milieu d'incubation.

3) des amibes incubées avec des liposomes contenant une solution de NaCl 0.15M: c'est le contrôle qui permet d'évaluer l'effet des liposomes seuls sur l'ultrastructure des amibes.

Cette expérience a été répétée deux fois, et les résultats sont, en général, reproductibles quoique légèrement différents d'une expérience à l'autre.

Après 20 heures d'incubation, les amibes traitées avec les liposomes contenant de la phalloïdine, ainsi que les trois témoins ont, au microscope optique, le même aspect. L'ensemble des amibes restent motiles et conservent leur forme allongée caractéristique des cellules vivantes et très actives. Dans nos conditions expérimentales, il n'y a donc pas d'effet de la phalloïdine, sur le comportement des amibes, qui soit visible au microscope optique.

Par contre, au microscope électronique, nous avons observé plusieurs différences importantes entre les amibes traitées avec les liposomes contenant de la phalloïdine et les contrôles. Il n'y a toutefois aucune différence significative entre les trois contrôles. Ceci nous indique tout d'abord que la phalloïdine libre dans le milieu d'incubation ne pénètre pas dans les amibes par simple diffusion et que d'autre part les liposomes seuls n'induisent aucune modification de l'ultrastructure des amibes.

Seule, la phalloïdine encapsulée dans les liposomes induit des modifications sur l'ultrastructure des amibes. Comme pour agir, cette phalloïdine doit se retrouver dans le cytoplasme de l'amibe, nous pouvons conclure que ce sont les liposomes qui ont permis le transfert de la phalloïdine dans le cytoplasme de *E. histolytica*.

1.1 Ultrastructure de *E. histolytica*.

L'ultrastructure de *E. histolytica* a déjà été décrite en 1970 par LUDVIK et SHIPSTONE (56). Depuis lors, les méthodes de fixation et

de préparation du matériel ont été passablement améliorées ce qui nous a permis de meilleures observations. Dans un premier temps nous allons donc décrire, en détail, l'ultrastructure des amibes témoins observées au microscope électronique.

Cytoplasme.

La membrane cytoplasmique a l'aspect trilamellaire caractéristique de la plupart des membranes biologiques (figure 12a). Immédiatement en-dessous de la membrane cellulaire, se trouve l'ectoplasme, une région contenant un matériel amorphe, coloré uniformément, gris pâle. Plus profondément, se situe l'endoplasme caractérisé par la présence de nombreux grains de glycogène fortement coloré par le plomb. Il est souvent difficile de distinguer l'ectoplasme de l'endoplasme au microscope électronique. La figure 12a montre aussi un "trigger". Il s'agit d'un petit prolongement de 0.2 µm à 0.5 µm à la surface de l'amibe. EATON (21) soutient qu'il s'agit d'un lysosome de surface servant à l'attaque de proies lors de l'infection de l'hôte par ce parasite.

La figure 12b montre l'uropode d'une amibe témoin à fort grossissement. L'uropode est la "queue" de l'amibe, c'est une région qui contient presque exclusivement le matériel amorphe caractéristique de l'ectoplasme. La membrane cellulaire, dans la région de l'uropode, est souvent très plissée. On distingue aussi sur la figure 12b une rangée de vacuoles de 0.1 µm suivies de vacuoles plus allongées se terminant à la membrane cellulaire. Il s'agit d'une coupe d'un canal de pinocytose, phénomène normal à ce niveau.

Le cytoplasme de *E. histolytica* contient de nombreux ribosomes.

Ces ribosomes sont souvent groupés et forment une structure hélicoïdale longue de 0.3 µm à 1 µm et large de 40 à 50 nm: les polysomes (figure 13b). Cette amibe possède un réticulum endoplasmique très peu développé. La synthèse des protéines se ferait principalement par les polysomes. Les polysomes peuvent s'unir et former des cristaux de plusieurs microns de diamètre. Ces cristaux sont appelés RNP (helical ribonucleoprotein bodies) (89). La formation des RNP est un phénomène rare dans les amibes en culture normale. Ces cristaux deviennent cependant très abondants dans les cellules en cours d'enkystement. Il est à noter que dans nos cultures, il ne se formait jamais de kystes.

Le cytoplasme contient aussi plusieurs petits corps tubulaires (blackbodies) mesurant entre 240 nm et 250 nm de long et 70 nm de diamètre (figure 13a). BIRD (7) a suggéré que ces organites sont des rhabdovirus, mais aucune preuve expérimentale n'est venue appuyer cette affirmation.

Dans le cytoplasme de l'amibe, nous observons plusieurs vacuoles digestives dont la taille varie de 0.5 à 12 µm. Elles contiennent souvent des bactéries ou des débris de membranes qui sont des restes de bactéries (figures 13a, 13b et 14a). La membrane qui limite toutes les vacuoles digestives a la structure trilamellaire des membranes biologiques. En plus des vacuoles digestives, le cytoplasme contient plusieurs petites vacuoles de 50 nm à 200 nm. Selon LUDVIK (56), ces petites vacuoles seraient des lysosomes.

E. histolytica ne contient aucune mitochondrie ni aucun autre organite possédant les caractéristiques des mitochondries. Il est aussi très difficile d'identifier un appareil de Golgi.

Noyau.

Le noyau de *E. histolytica* est habituellement un organite de 3 à 4 µm de diamètre (figures 14a, 14b). Il est limité par une double membrane percée de nombreux pores de 50 nm. On distingue, à la périphérie du noyau, quelques macronucléoles et parfois un grand nombre de micronucléoles qui forment une couche diffuse et granuleuse sous la membrane nucléaire. Le noyau contient aussi des vacuoles intranucléaires très particulières (figures 28 et 29). Ces vacuoles ont de 0.1 à 0.3 µm et sont toujours situées en périphérie du noyau, mais ne sont jamais en contact avec la membrane nucléaire. Elles sont limitées par une simple membrane sans pore et contiennent une substance qui, sous l'effet des fixateurs, précipite en un matériel très opaque aux électrons. La fonction de ces vacuoles n'est pas connue.

Au début de la prophase, apparaît dans le noyau, un granule dense de 1 µm de diamètre. C'est à partir de cette structure que s'élabore les microtubules de l'appareil mitotique (28). Il s'agit du MTOC (microtubules organizing center) (figures 11 et 15). La figure 14a montre un noyau en début de métaphase. Au centre du noyau, les chromosomes forment la plaque métaphasique. A la périphérie on distingue encore deux macronucléoles.

Nous avons donc retrouvé toutes les structures déjà identifiées dans *E. histolytica* par LUDVIK (56), EATON (21) et GICQUAUD (28) et nous n'avons pas observé de nouvelles structures dans nos témoins. Pour la compréhension de la suite de ce travail il est important de noter que, chez les témoins, les différentes structures cytoplasmiques sont distribuées uniformément dans le cytoplasme (figure 11).

1.2 Effet de la phalloïdine sur l'ultrastructure de *E. histolytica*.

Lorsque les amibes sont incubées avec des liposomes renfermant de la phalloïdine (figures 15 à 29) nous observons au microscope électronique deux modifications importantes de l'ultrastructure des cellules.

Premièrement les organites cytoplasmiques ne sont plus distribués uniformément. Dans les amibes montrant un effet important de la phalloïdine, le matériel cytoplasmique amorphe, coloré en gris se condense (figure 15). A l'extérieur de ces zones denses s'accumulent les grains de glycogène, les RNP et les autres organites cellulaires. La figure 16a présente l'aspect typique d'une zone dense. Elle montre une zone très bien définie formée de matériel amorphe et contenant peu de grains de glycogène ou d'autres organites cellulaires.

Dans d'autres amibes (figure 17), la distribution du matériel amorphe reste uniforme. Cependant, ce matériel est mieux fixé et il se colore plus intensément (comparer la figure 17 avec la figure 11). Dans ce cas, la phalloïdine améliore la fixation des cellules sans induire de nouvelles organisations.

Dans les amibes traitées, nous observons toutes les situations intermédiaires entre les deux extrêmes des figures 16a et 17. Ce résultat s'explique par le fait que les liposomes introduisent le produit encapsulé à des concentrations très variable d'une amibe à une autre. Il y a aussi des cellules identiques aux témoins qui correspondent aux amibes n'ayant pas réagi avec les liposomes.

Lorsque l'on examine le cytoplasme à fort grossissement, on note encore des différences très importantes dans la structure fine des zones

amorphes des amibes traitées et des témoins. Chez les témoins, ce matériel amorphe se retrouve sous la membrane cytoplasmique (figure 12a), dans le cytoplasme (figure 19b) et dans l'uropode (figure 12b). A fort grossissement, le matériel a toujours un aspect amorphe non structuré et possède une coloration homogène.

Par contre, les zones condensées des amibes traitées montrent une structure entièrement différente (figures 16b, 19a et 18). Le matériel n'est plus totalement amorphe mais est formé de nombreux filaments de 6 nm de diamètre orientés dans toutes les directions formant ainsi un réseau tridimentionnel. Comme nous observons des coupes, ce réseau tridimentionnel apparaît surtout sous forme de petits points qui sont les filaments en coupe transversale et quelques filaments en coupe tangentielle. La structure fine d'une zone dense est d'ailleurs identique à celle d'un gel d'actine observé en coupe fine (comparer nos résultats avec MOOSEKER (65)). A la périphérie des zones denses nous observons souvent des organisations de filaments plus structurées (figures 20 et 21). Ces régions contiennent des faisceaux de filaments parallèles et dans un cas (figure 21) ces faisceaux étaient interconnectés d'une manière régulière.

Dans les amibes traitées avec des liposomes contenant de la phalloïdine, nous avons observé des filaments d'actine associés à des régions actives du cytoplasme. Ainsi, lors de la formation d'un pseudopode, (figure 22) nous observons une région très filamenteuse dont les filaments sont organisés en un réseau tridimensionnel. Les filaments sont aussi très nombreux autour des vacuoles de phagocytose (figures 23a et 23b). Finalement, nous avons noté la présence de quelques faisceaux de filaments dans le cytoplasme des amibes en dehors des zones condensées (figure 24).

La deuxième modification importante de l'ultrastructure de *E. histolytica*, induite par la phalloïdine, est la formation de cristaux de RNP (figures 25 et 26). Contrairement aux témoins, nous observons régulièrement des RNP dans les amibes traitées avec des liposomes contenant de la phalloïdine. Ces cristaux forment des structures très rigides qui sont très bien préservées lors de la fixation. Ces structures n'ont pas la flexibilité nécessaire pour s'adapter aux changements de tensions qui se produisent lors de la déhydratation, ou lors de la polymérisation de la résine. Ils induisent donc des déchirures dans le cytoplasme des amibes (figures 27a et 27b). Nous notons cet artéfact seulement chez les amibes traitées avec les liposomes contenant de la phalloïdine, car seules les cellules traitées ont des cristaux de RNP. Dans un cas les RNP entourent une zone de filaments condensés (figure 27a). Comme il s'agit de deux structures rigides, nous avons alors observé une déchirure importante.

Dans un cas, il s'est produit, après traitement des amibes à la phalloïdine encapsulée dans les liposomes, un phénomène nouveau encore jamais décrit dans la littérature. Dans ce cas, nous observons la formation de RNP autour des noyaux (figures 28 et 29). Les noyaux sont complètement entourés par quelques couches de polysomes (de 2 à 5 couches). Lorsque les amibes possèdent deux noyaux, les deux sont entourés également de polysomes. Les polysomes sont à proximité de la membrane nucléaire cependant, il n'a pas été possible de mettre en évidence un lien structural entre les polysomes et la membrane nucléaire. Autour de certains noyaux, les polysomes sont si nombreux qu'ils forment de gros RNP (figure 29). Il devient alors pratiquement impossible de distinguer les pores de la membrane nucléaire. Il nous faut cependant noter que la présence

de polysomes autour du noyau ne se retrouve pas dans toutes les préparations d'amibes traitées à la phalloïdine. Ceci provient sans doute de l'état de développement des cultures d'amibes.

En résumé, les liposomes contenant de la phalloïdine causent des modifications importantes de l'ultrastructure de *E. histolytica*. Ils permettent l'observation de filaments cytoplasmiques probablement composés d'actine et induisent une réorganisation de ces filaments. La phalloïdine provoque aussi des modifications dans l'organisation des polysomes.

FIGURE 11: Ultrastructure de *E. histolytica* à faible grossissement. Amibe témoin.

On remarque ici la forme monopodiale d'une amibe qui a 30 µm de long par 10 µm de large. A ce grossissement on peut reconnaître le noyau au centre de la cellule. Ce noyau possède un MTOC (microtubules organizing center). A la partie supérieure de la photo, on distingue aussi la queue de l'amibe ou l'uropode. Il faut aussi remarquer que chez les témoins, les organites cytoplasmiques sont distribués uniformément dans le cytoplasme; X 6,700.

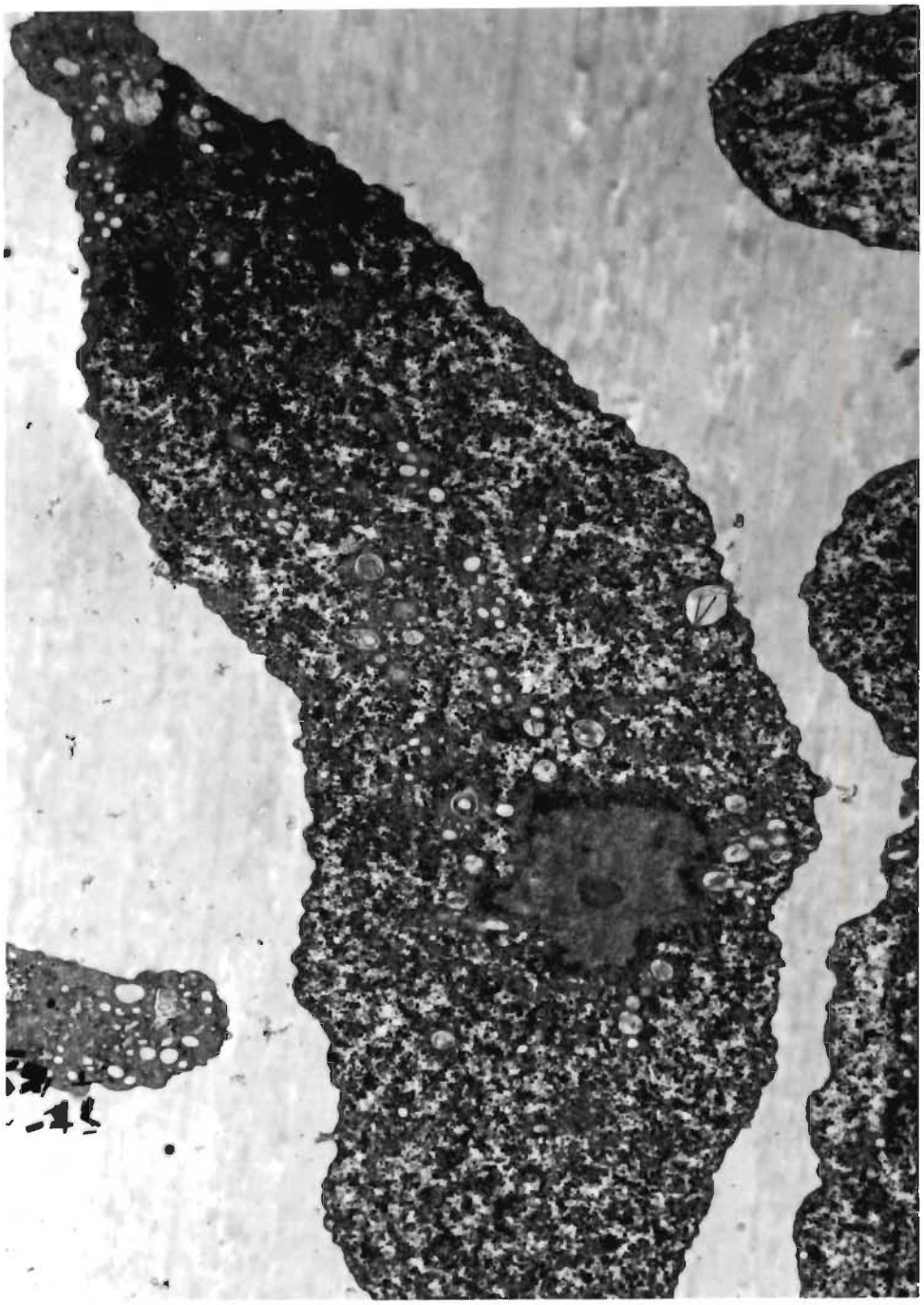


FIGURE 12a: Détails de la membrane cellulaire d'une amibe témoin.

La membrane cellulaire a la structure trilamellaire caractéristique de la plupart des membranes biologiques. En-dessous de la membrane cellulaire on remarque une région contenant un matériel amorphe coloré uniformément gris pâle: c'est l'ectoplasme. Plus profondément se situe l'endoplasme caractérisé par la présence de nombreux grains de glycogène et de vacuoles. On remarque aussi la présence d'un petit prolongement à la surface de l'amibe, il s'agit d'un "trigger"; X 28 500.

FIGURE 12b: L'uropode d'une amibe témoin.

On remarque que cette région du cytoplasme contient presque exclusivement le matériel amorphe qui se colore gris pâle. Sur cette coupe on distingue un alignement de vacuoles. Cet ensemble de vacuoles est un canal de pinocytose; X 43 000.

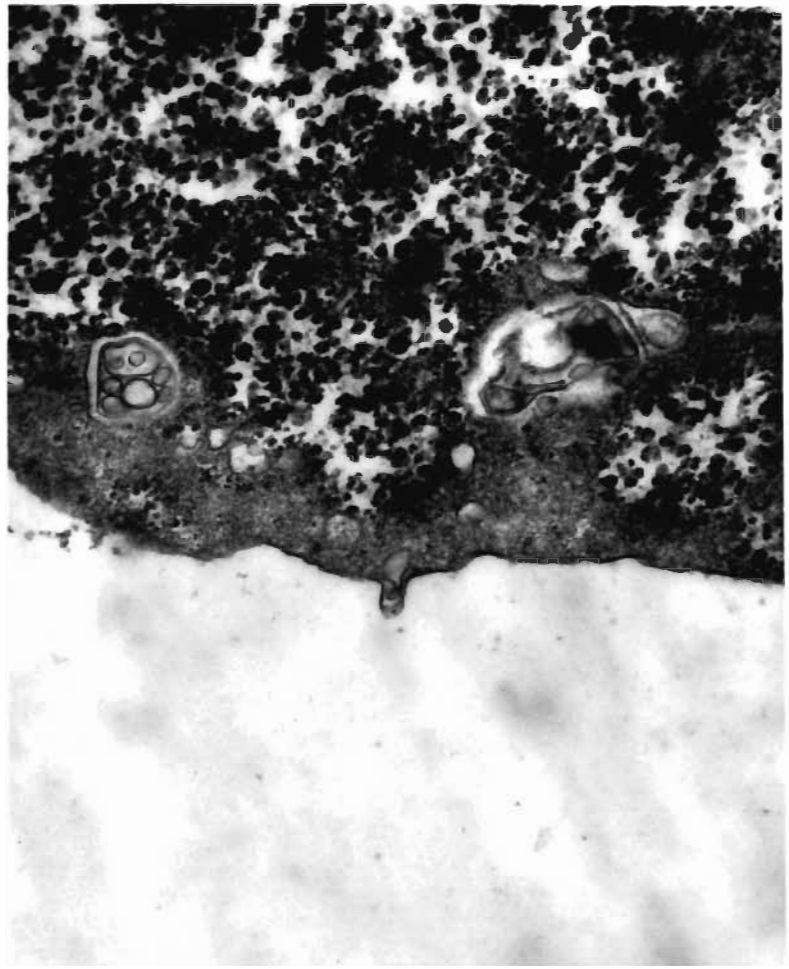
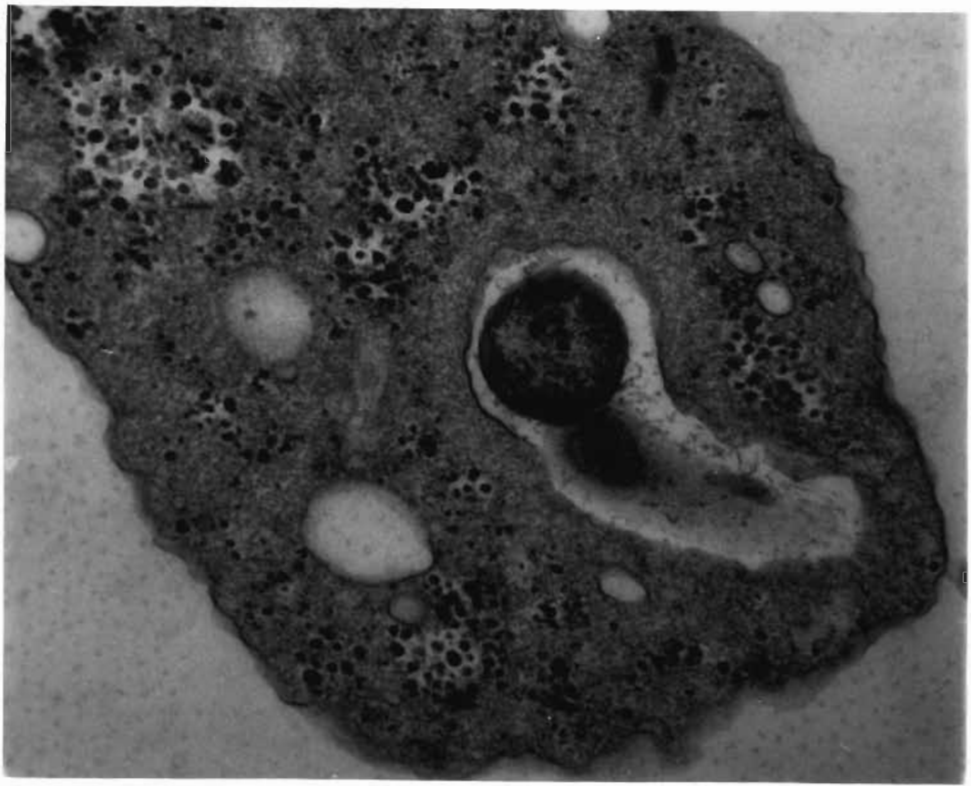


FIGURE 13a et b: Cellules témoins, détails du cytoplasme.

Le cytoplasme de ces cellules contient plusieurs vacuoles digestives. A l'intérieur de ces vacuoles, on distingue souvent des bactéries. A la partie supérieure de la figure 13a, on remarque 2 particules de 250 nm de long et de 70 nm de diamètre fortement colorées par l'acide osmique; il s'agit des "black bodies"; X 32,000. Sur la figure 13b, on remarque à droite de la vacuole digestive, des polysomes avec leur structure hélicoïdale caractéristique; X 47,000.



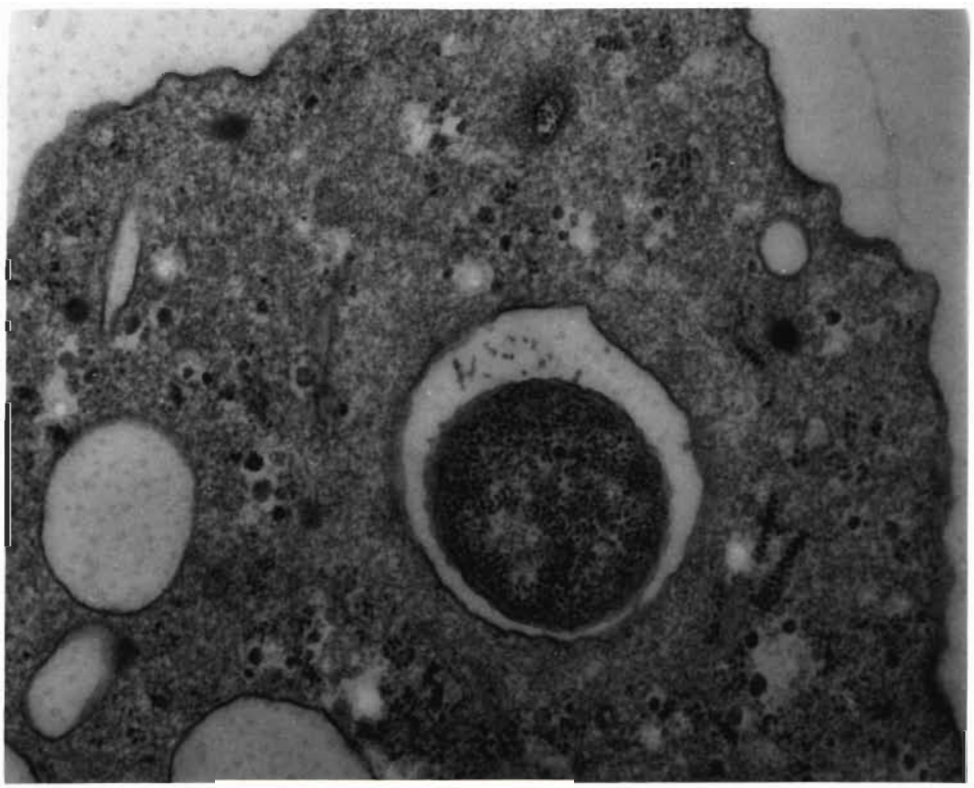
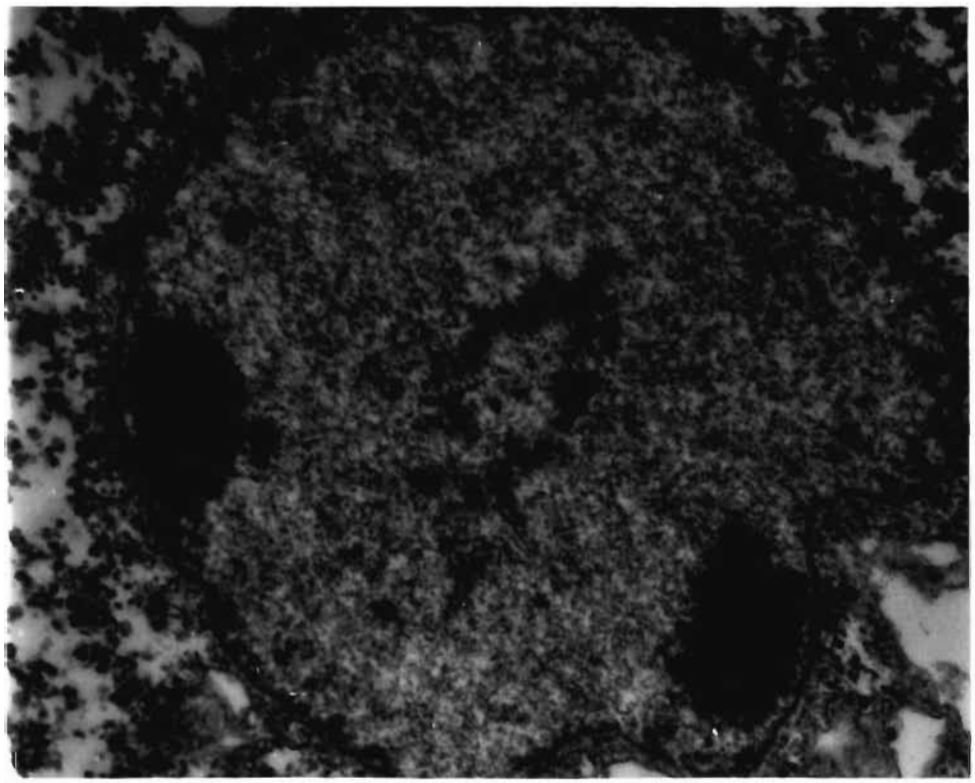


FIGURE 14a: Noyau d'une amibe témoin en métaphase.

Le noyau est un organite de 3 à 4 µm de diamètre. Dans ce noyau en métaphase on remarque,au centre,les chromosomes et en périphérie du noyau deux macronucléoles; X 22,000.

FIGURE 14b: Noyau d'une amibe témoin en interphase.

A l'interphase on ne distingue dans le noyau aucun chromosome ni aucun MTOC. On remarque seulement la présence de plusieurs macronucléoles. Le cytoplasme de cette amibe contient plusieurs vacuoles digestives et dans lesquelles se retrouvent des débris de membranes qui sont les restes de bactéries phagocytées; X 12,000.



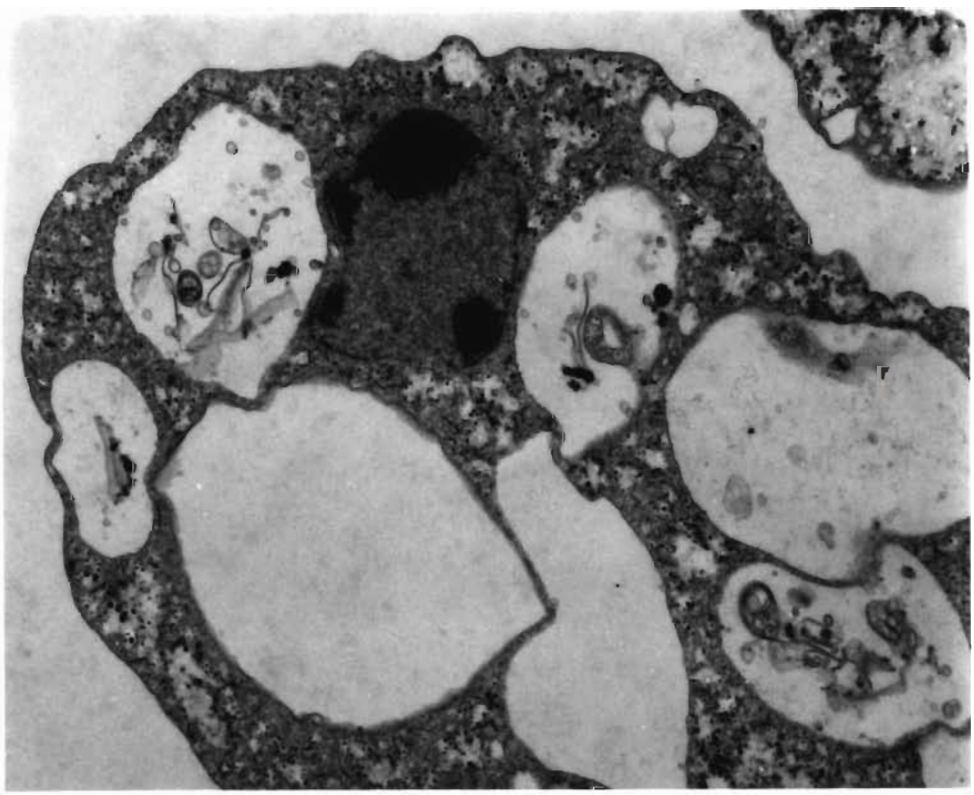


FIGURE 15: Effet de la phalloïdine sur l'ultrastructure de *E. histolytica* à faible grossissement.

A faible grossissement on remarque les cristaux de RNP fortement colorés en noir. D'autre part, on remarque que le matériel cytoplasmique amorphe n'est plus distribué uniformément, comme il l'était dans l'amibe de la figure 11, mais est concentré en deux zones dans la partie supérieure de cette amibe. A l'extérieur de ces zones, au centre de l'amibe, on note une région constituée principalement de structure membranaires. Il s'agit probablement de réticulum endoplasmique.

Même si ce n'est pas un effet de la phalloïdine, j'aimerais souligner qu'on distingue sur cette coupe un noyau en prophase où l'on voit le MTOC entouré par les chromosomes. Sur cette photo on distingue aussi nettement les pores de la membrane nucléaire; X 10 000.

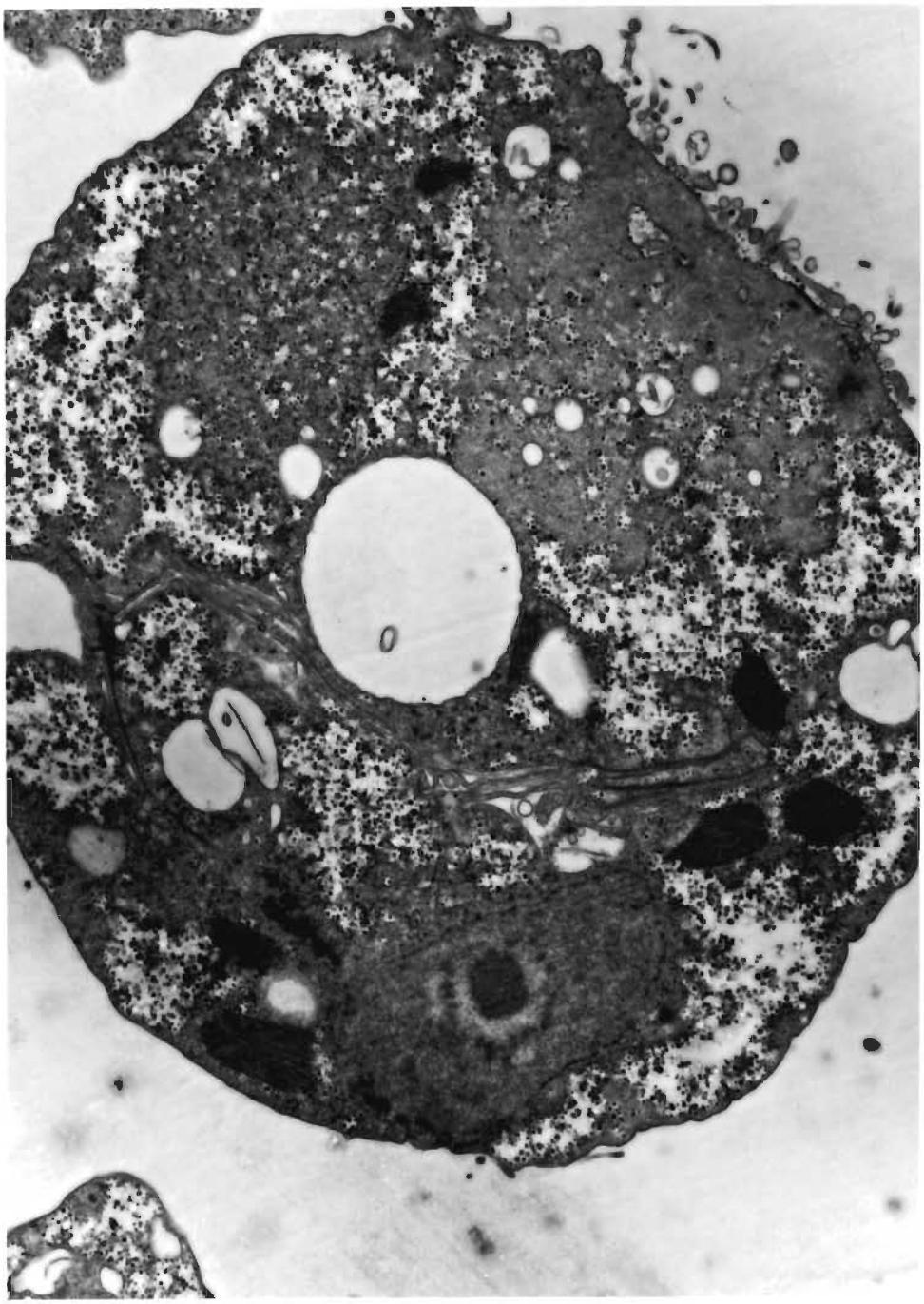


FIGURE 16a: Aspect typique d'une zone dense d'une cellule traitée.

Les zones denses forment généralement une région très bien délimitée qui contient peu de grains de glycogène et peu de vacuoles; X 15 000.

FIGURE 16b: Agrandissement montrant les détails d'une zone dense.

Lorsqu'on observe attentivement le fond du cytoplasme, on peut voir qu'il est structuré. Il s'agit ici d'une coupe dans une région qui contient de nombreux filaments de 6 nm orientés dans toutes les directions. La majorité des filaments ont été coupés transversalement et apparaissent par conséquent sous forme de points; X 60 000.

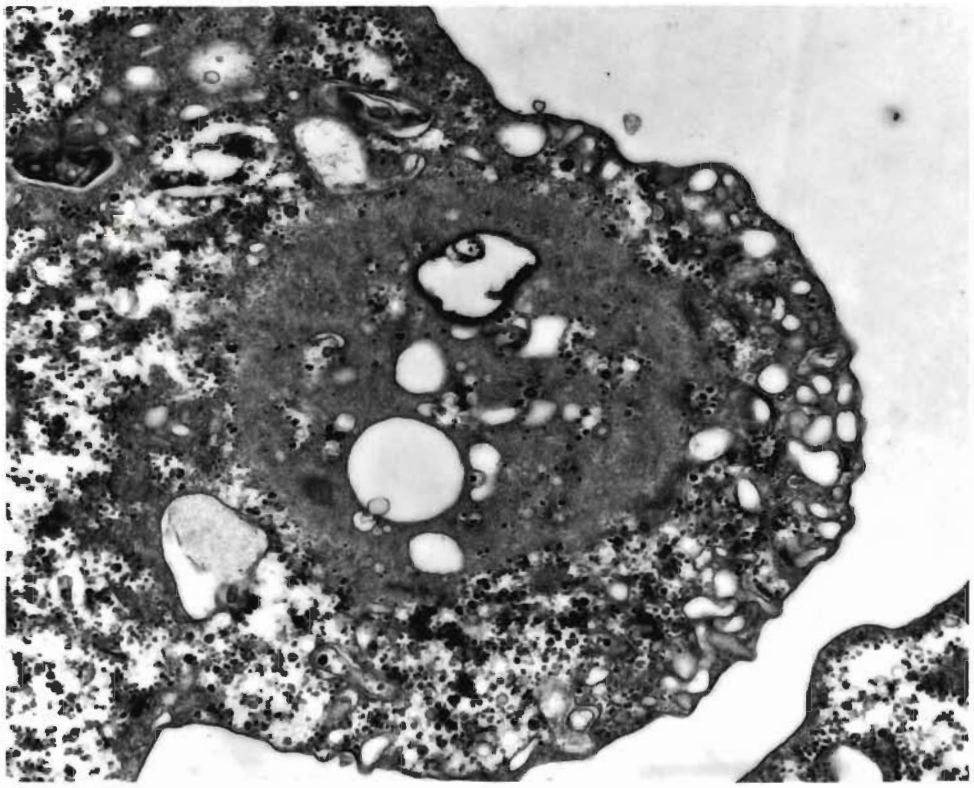


FIGURE 17: Ultrastructure d'une amibe traitée montrant peu d'effet de la phalloïdine.

Dans quelques amibes traitées avec les liposomes contenant de la phalloïdine, on n'observe pas la formation de zones denses. Les organites cellulaires sont alors distribués uniformément dans le cytoplasme de l'amibe. Toutefois, parce que le matériel est mieux préservé, le cytoplasme semble contenir beaucoup plus de matériel (à comparer avec la figure 11); X 10 000.

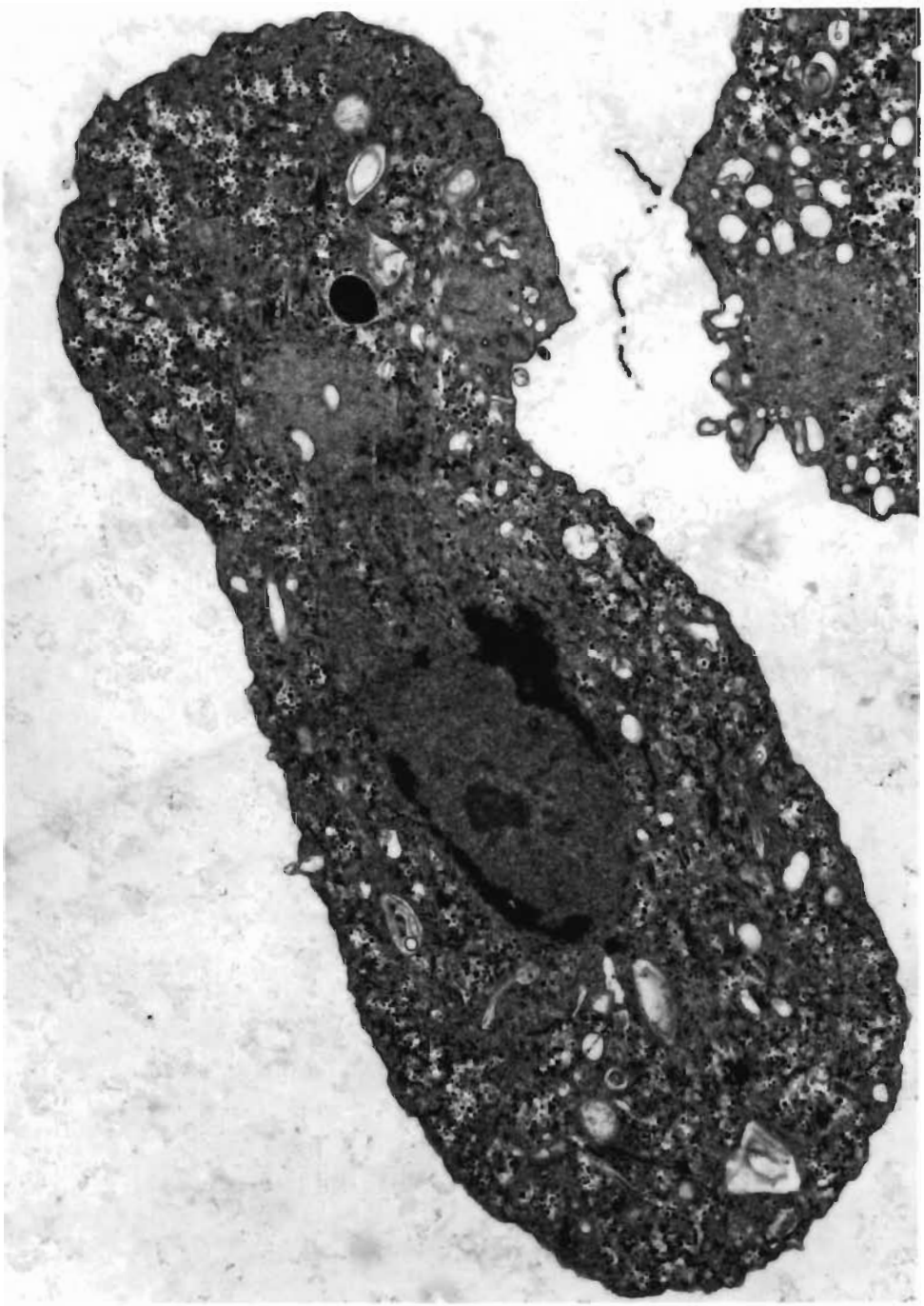


FIGURE 18: Filaments dans le cytoplasme de *E. histolytica* traitée à la phalloïdine.

Zones denses de filaments de 6 nm observées à fort grossissement. Les filaments de 6 nm forment un réseau tridimensionnel; X 71,000.

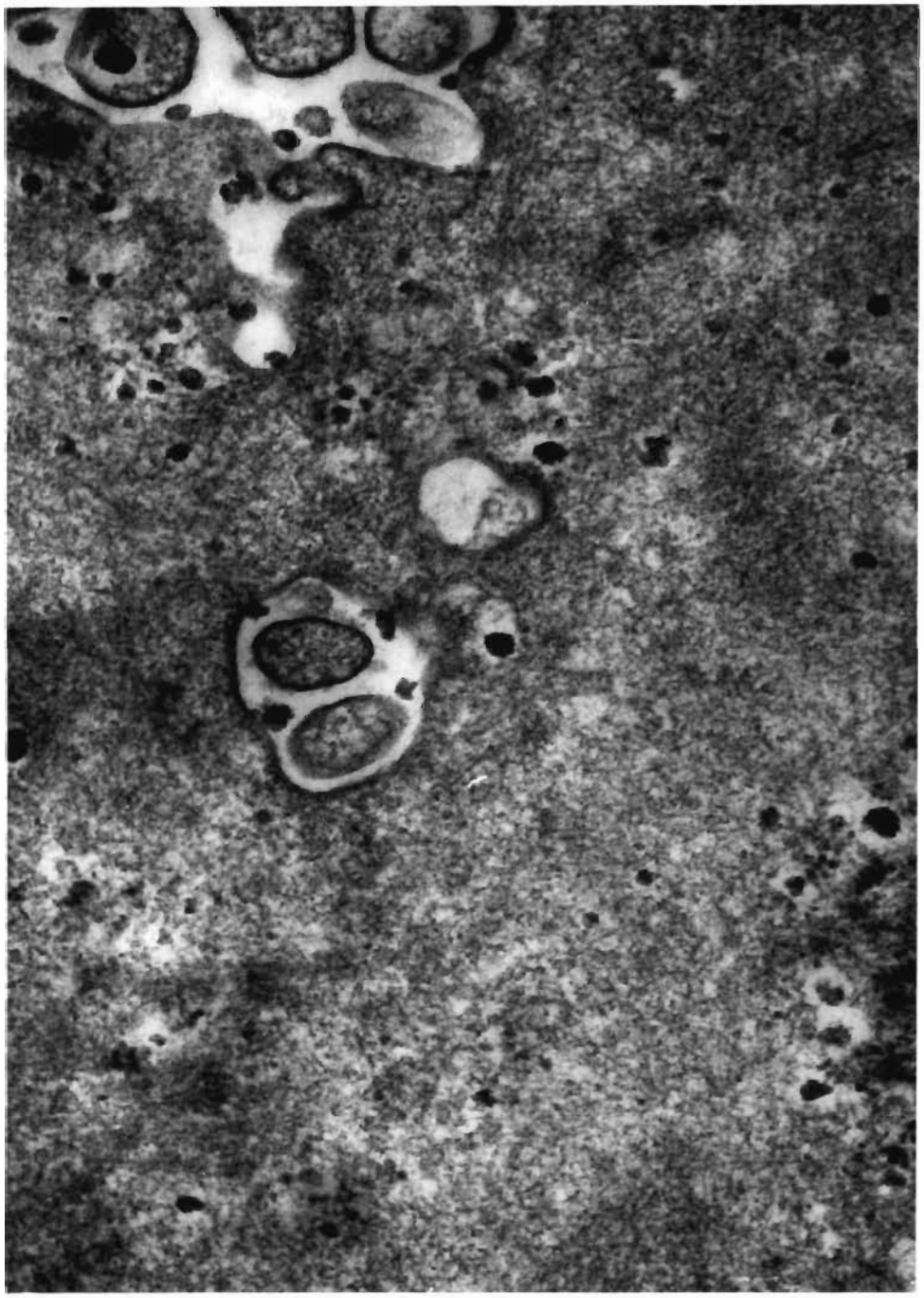
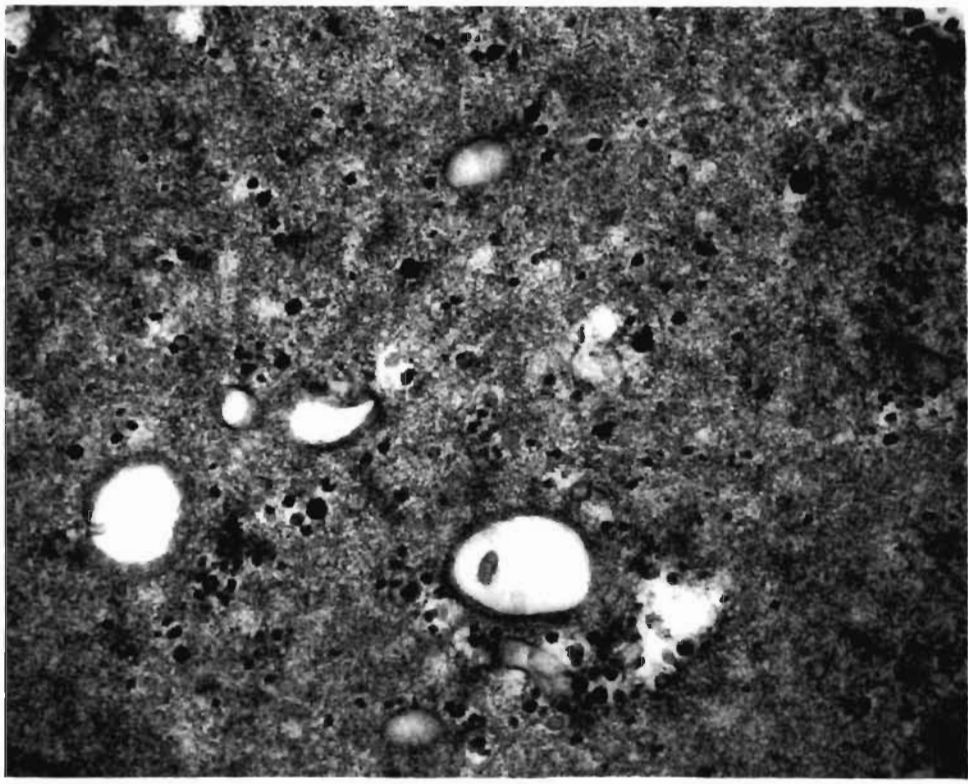


FIGURE 19: Comparaison de l'aspect du cytoplasme des amibes traitées avec les liposomes contenant la phalloïdine (a); X 43 000, et les amibes témoins (b); X 43 000.



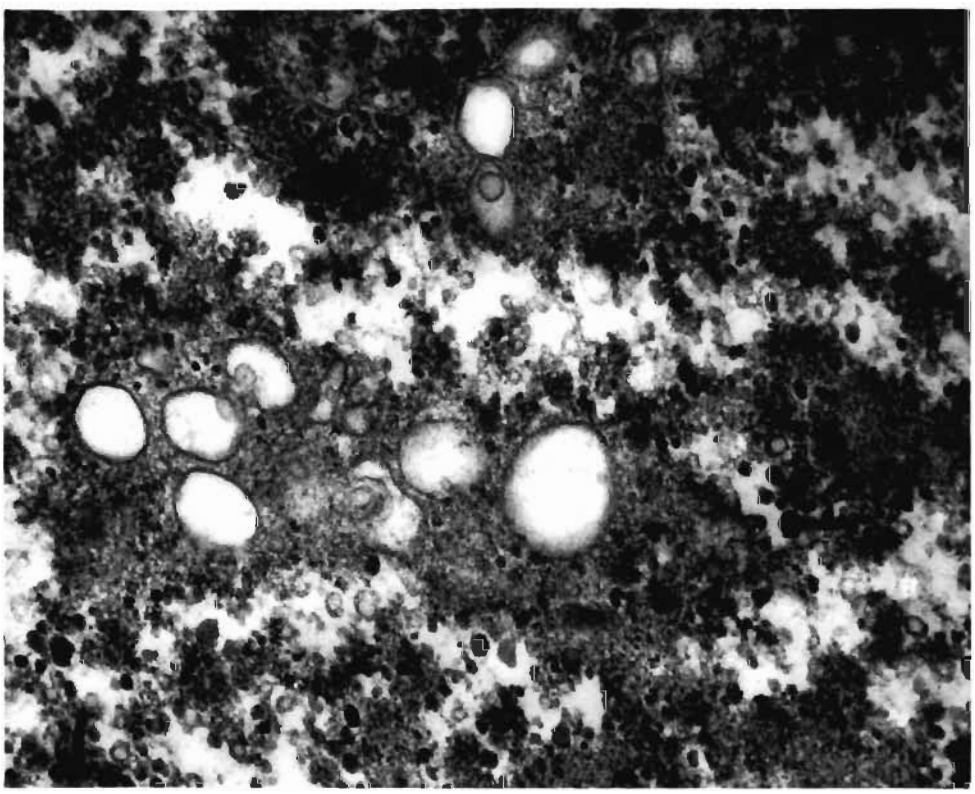


FIGURE 20: Formation de faisceaux de filaments dans le cytoplasme de *E. histolytica* traitée à la phalloïdine.

Sur cette coupe on distingue plusieurs filaments orientés parallèlement les uns par rapport aux autres et formant ainsi des faisceaux de filaments parallèles; X 63,000.

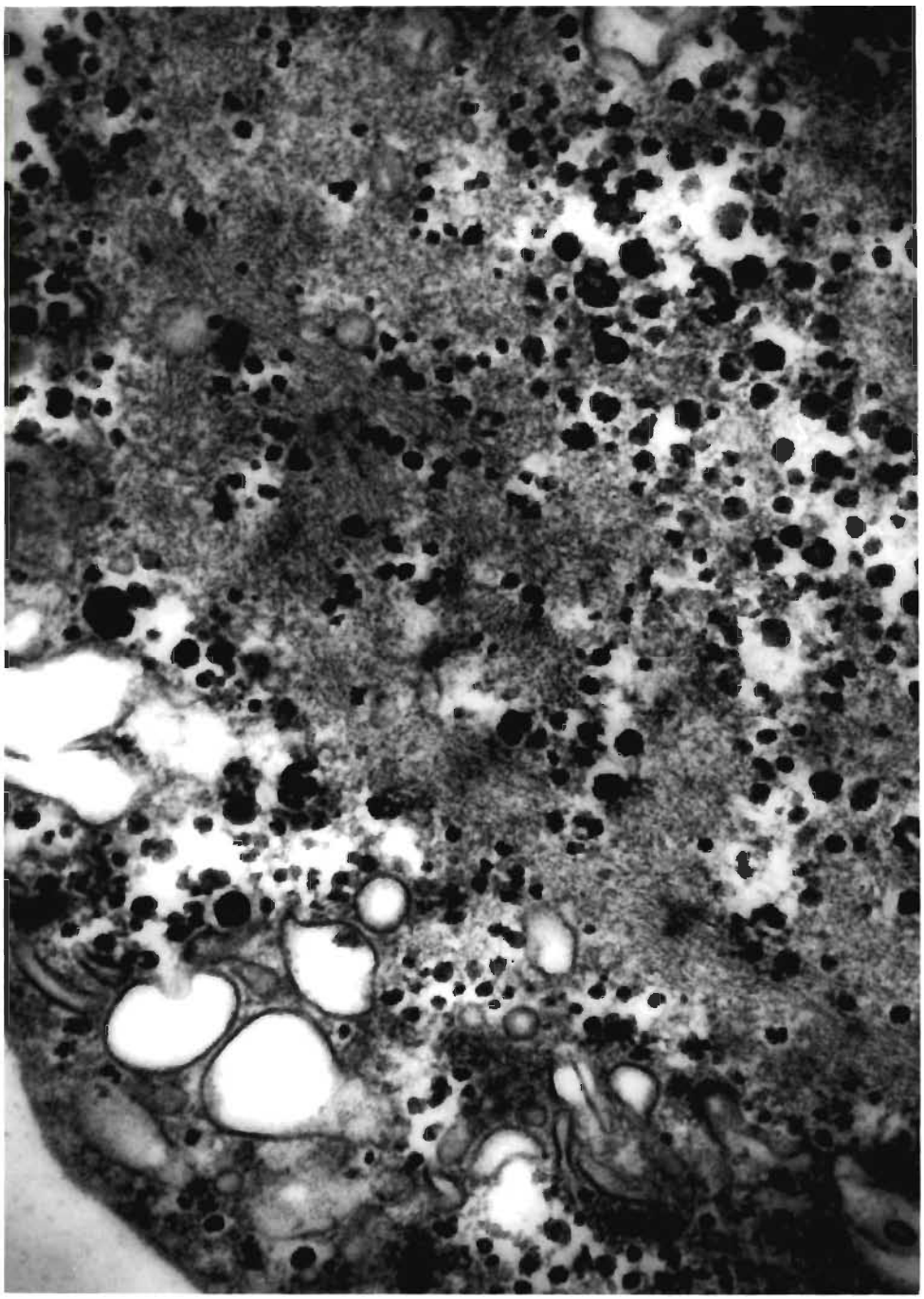


FIGURE 21: Faisceaux de filaments interconnectés dans une amibe traitée à la phalloïdine.

Sur cette coupe on remarque plusieurs faisceaux de filaments qui sont interconnectés de manière régulière; X 63 000.

FIGURE 22: Formation d'un pseudopode chez une cellule traitée à la phalloïdine.

On remarque que l'ensemble du pseudopode est formé d'un réseau tridimensionnel de filaments; X 83 000.

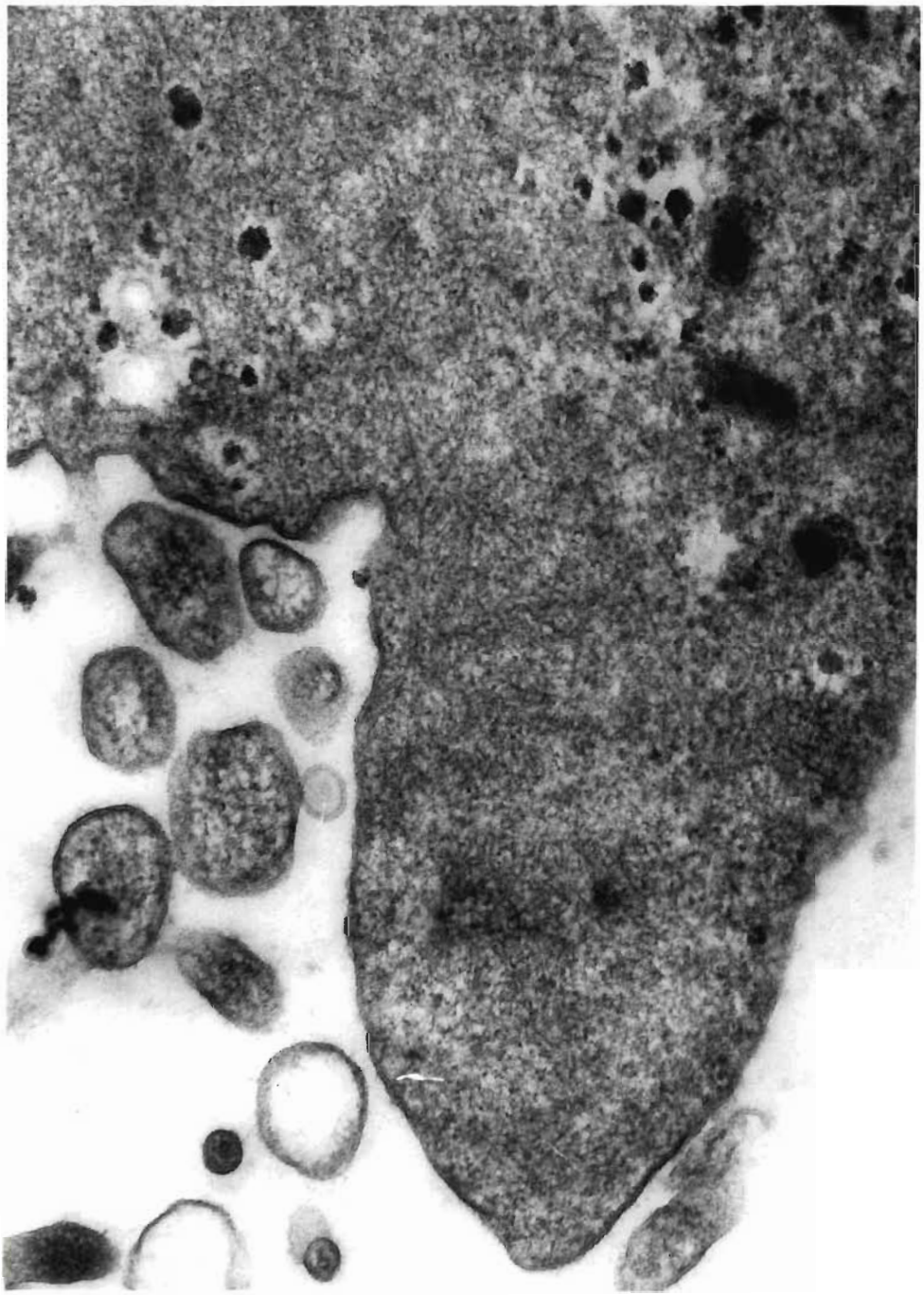


FIGURE 23: Phagocytose d'une bactérie chez une cellule traitée à la phalloïdine.

a) Formation de la capsule phagocytaire.

On remarque la formation de deux petits pseudopodes qui entourent complètement la bactérie. On note aussi que toute la région de la capsule phagocytaire est constituée d'un matériel cytoplasmique filamenteux; X 29 000.

b) Formation de la vacuole digestive; X 43 000.

FIGURE 24: Faisceaux de filaments dans le cytoplasme de *E. histolytica* traitée à la phalloïdine; X 24 000.

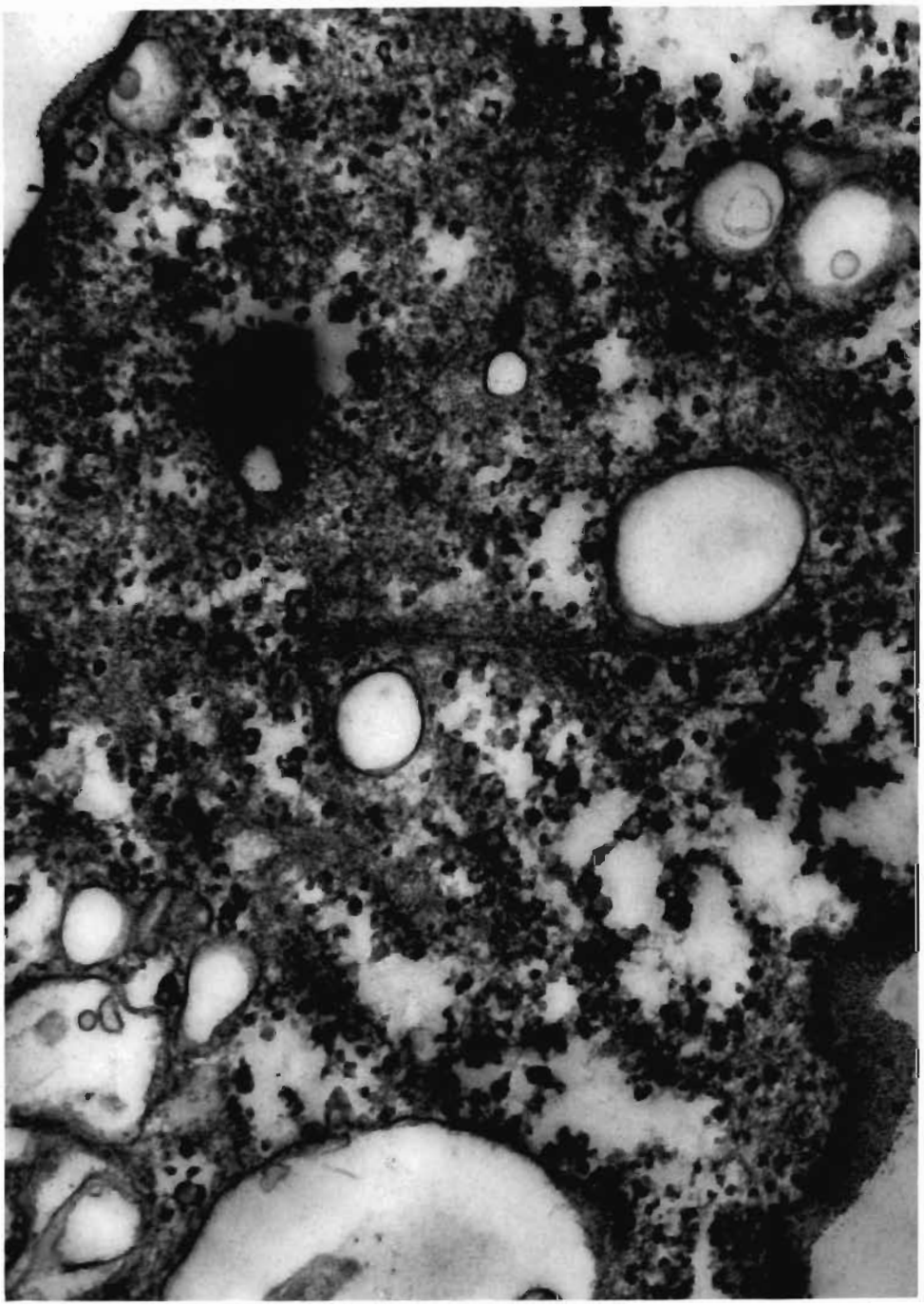


FIGURE 25: Formation des cristaux de RNP chez une amibe traitée à la phalloïdine.

C'est un agrandissement des cristaux observés à la figure 15. A ce grossissement, on distingue très bien l'organisation des polysomes organisés en structure paracristalline; X 63,000.

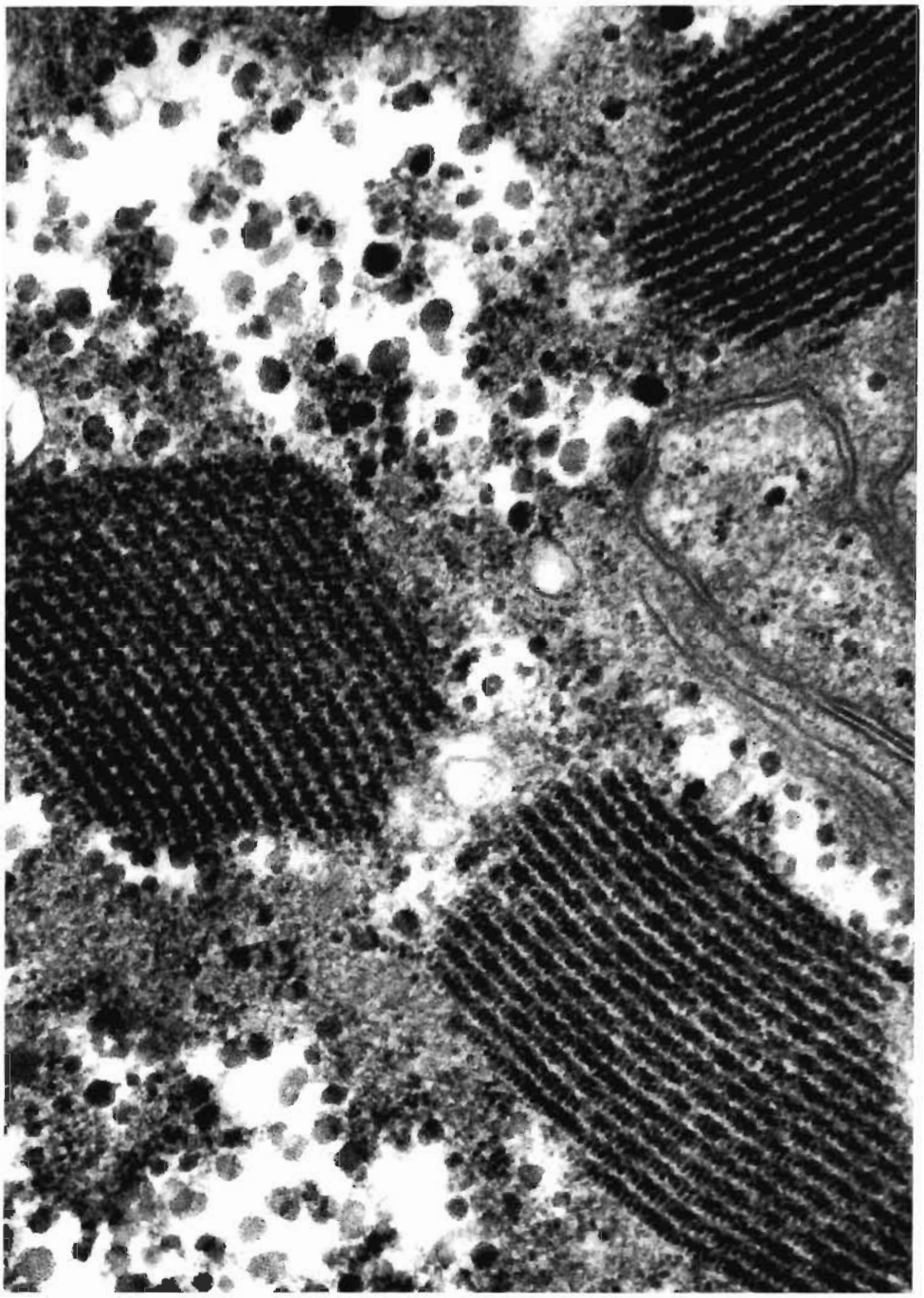


FIGURE 26: Formation de nombreux cristaux de RNP dans le cytoplasme d'amibes traitées à la phalloïdine.

Cette coupe montre l'aspect des cristaux sous plusieurs orientations différentes par rapport au plan de la coupe; X 30 000.

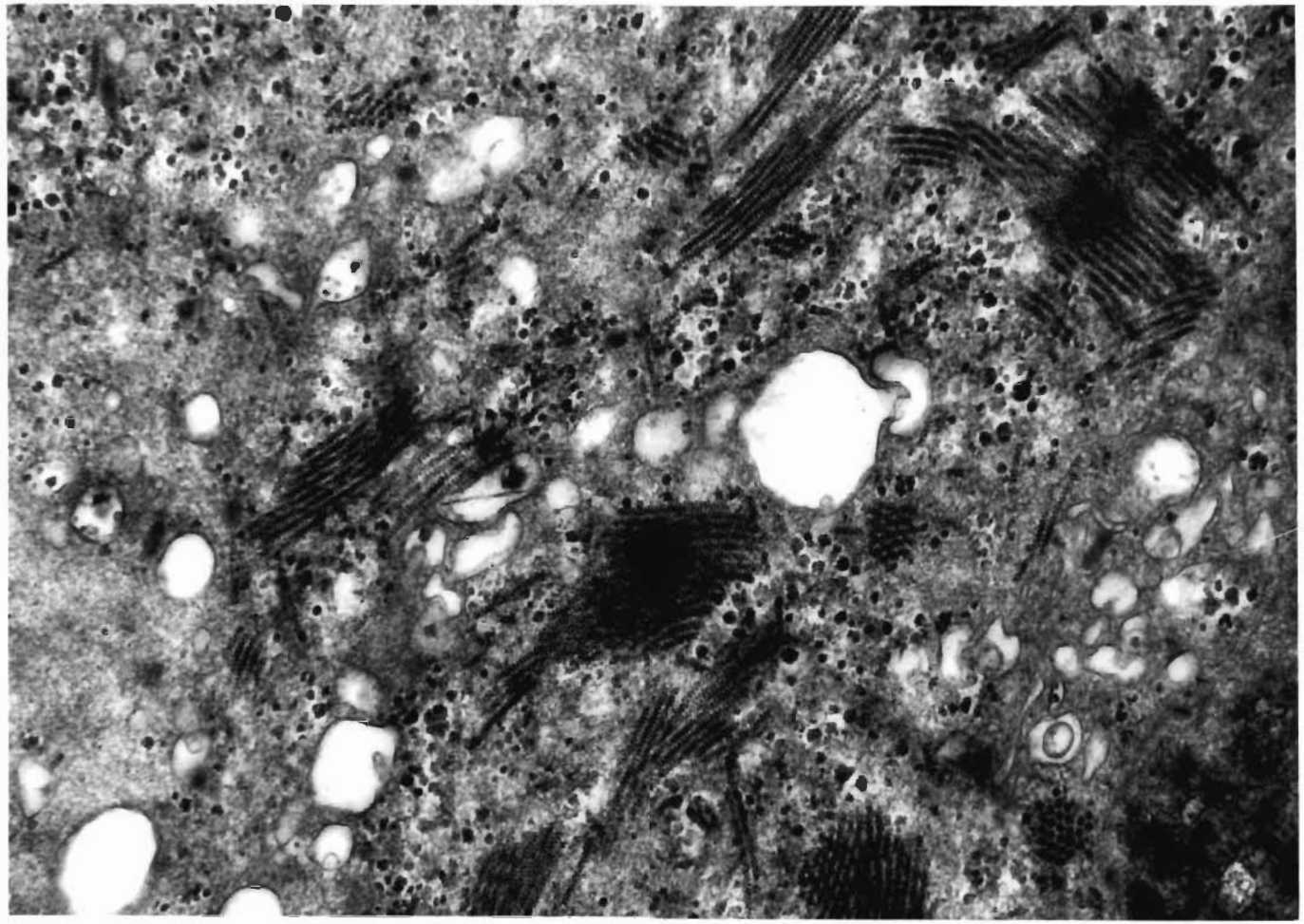
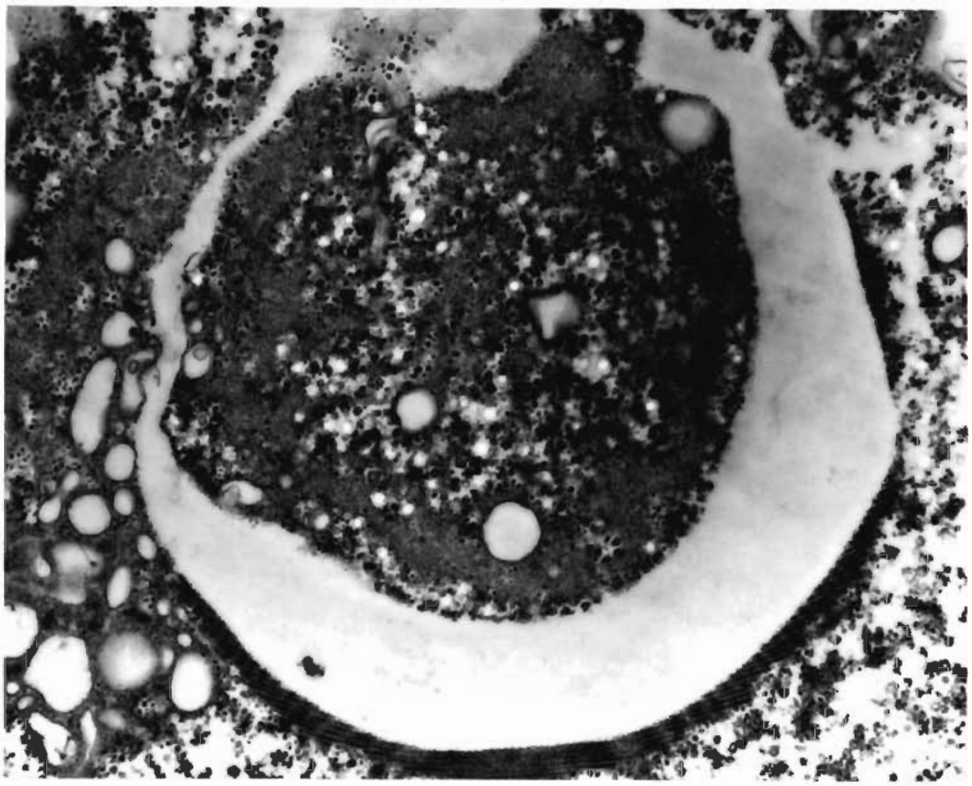


FIGURE 27: Artéfact de fixation observé chez les amibes traitées avec des liposomes contenant de la phalloïdine.

a) Les zones denses et les cristaux de RNP ne peuvent subir les changements de tensions qui se produisent lors de la préparation du matériel. Ils induisent donc des déchirures dans le cytoplasme des amibes; X 15 000.

b) Les cristaux de RNP seuls peuvent induire ces artéfacts; X 20 550.



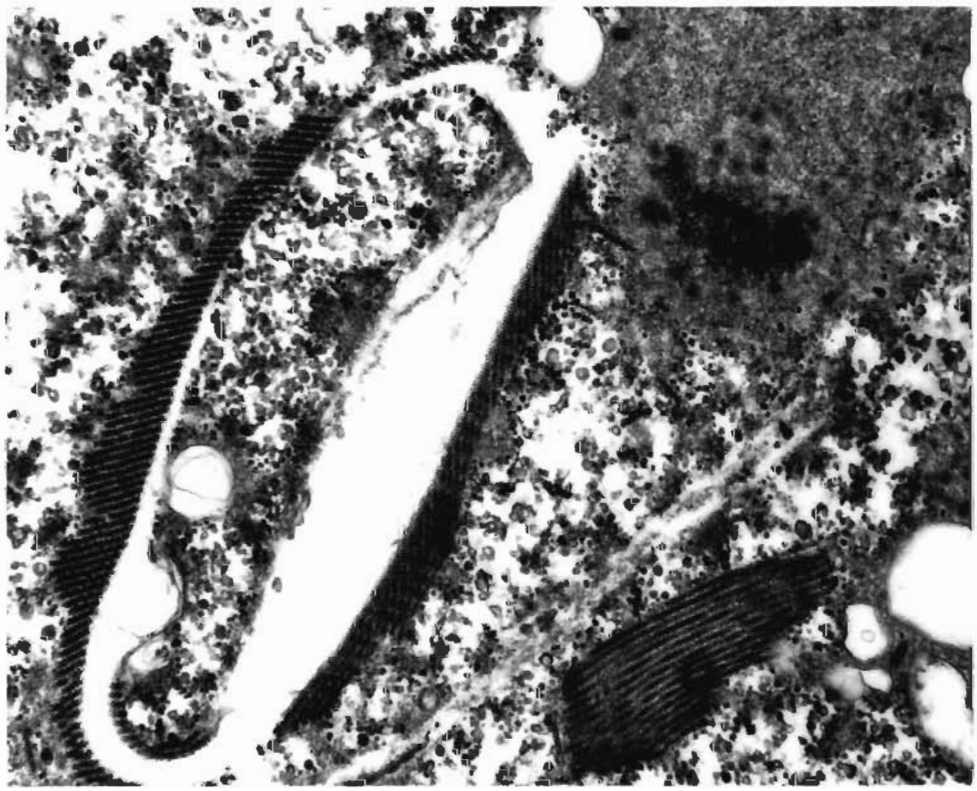


FIGURE 28: Noyaux de *E. histolytica* traitées à la phalloïdine, entourés de polysomes.

Sur cette coupe, on distingue deux noyaux, entourés également de polysomes. On remarque que ces polysomes sont perpendiculaires à la membrane nucléaire ou parallèles à cette membrane; X 23 400.

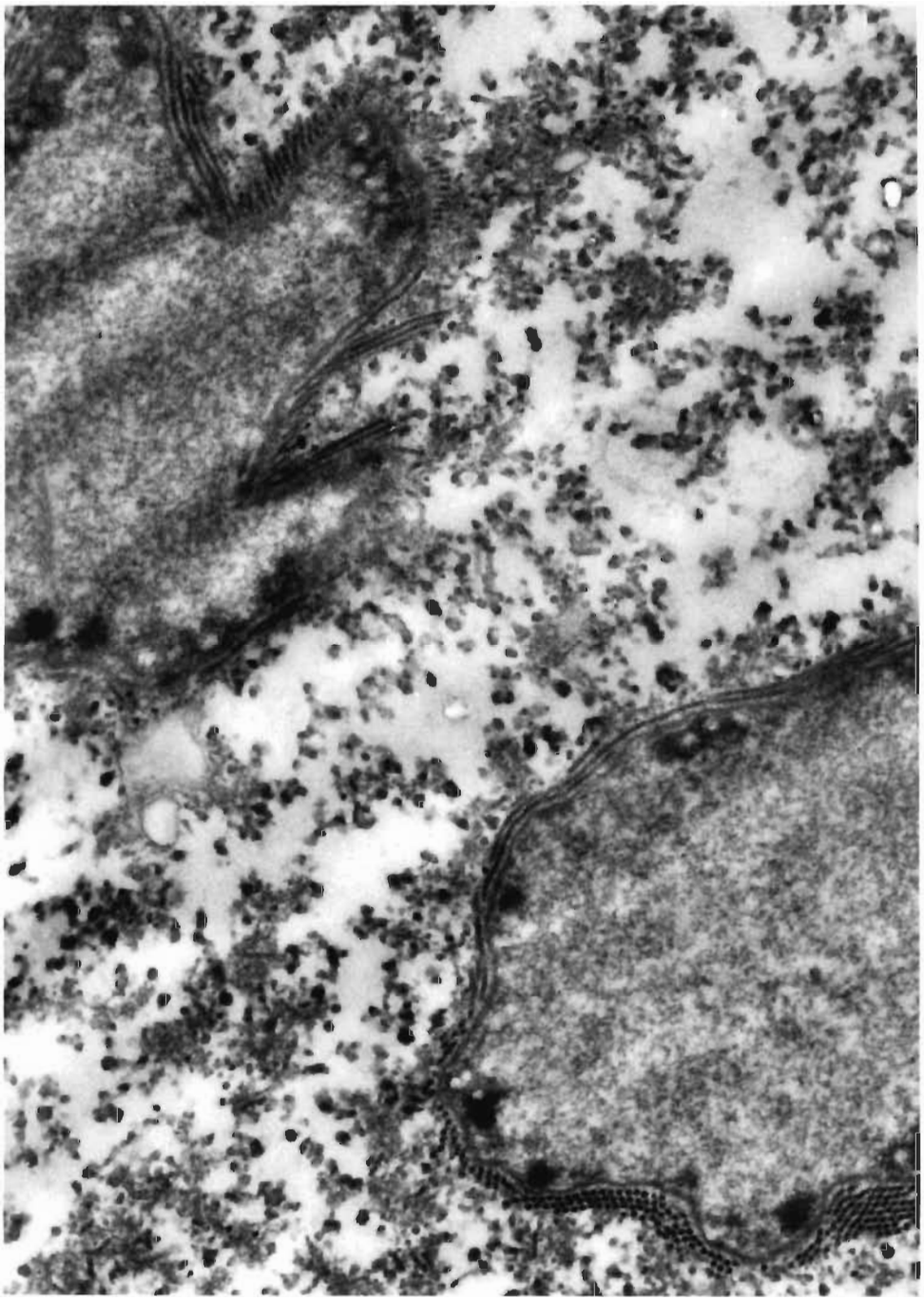
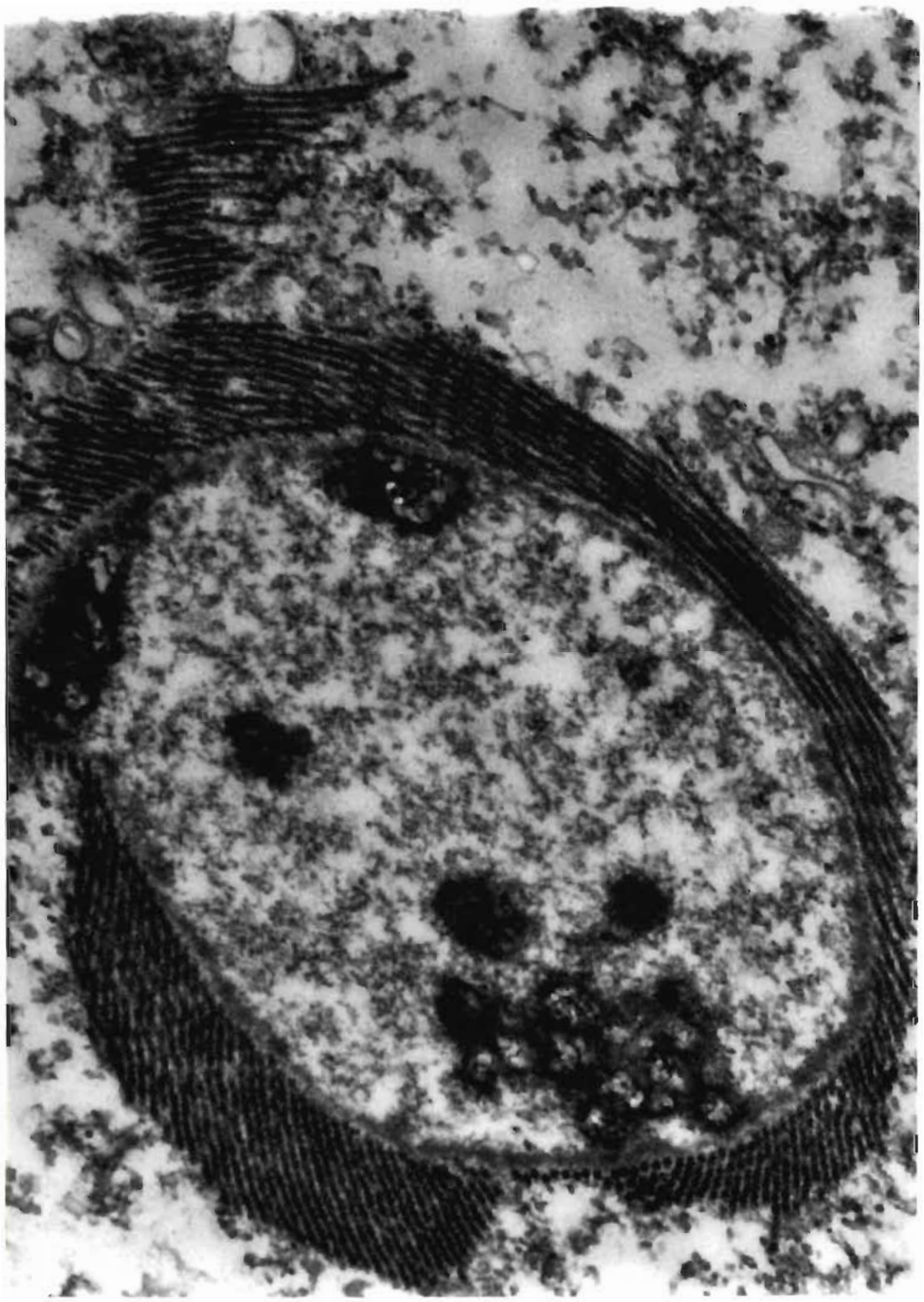


FIGURE 29: Noyau de *E. histolytica* traitée à la phalloïdine, entouré par des cristaux de RNP; X 32,000.



2. Discussion

Dans la seconde partie de notre travail, nous avons introduit de la phalloïdine dans le cytoplasme de *E. histolytica* à l'aide de liposomes. Nos contrôles nous montrent que la phalloïdine encapsulée dans les liposomes agit dans le cytoplasme de l'amibe. Les liposomes permettent donc de contourner la barrière de perméabilité de la membrane cellulaire de l'amibe. La phalloïdine pénètre probablement par le même mécanisme que la CF c'est à dire une phagocytose des liposomes suivie d'une diffusion de leur contenu vers le cytoplasme. Toutefois, il faut une incubation de 20 heures pour faire pénétrer la phalloïdine comparée à deux heures pour introduire la CF. Ceci est probablement dû au fait que les membranes sont plus imperméables à la phalloïdine (92) qu'elles ne le sont à la CF (94, 117). Cependant, contrairement à la CF, nous ne savons pas si la phalloïdine se retrouve seulement à l'intérieur des liposomes. Elle pourrait être soit dans la bicouche soit en interaction polaire avec la surface des liposomes. Le mécanisme de transfert serait alors différent.

La phalloïdine nous permet d'observer, dans le cytoplasme de *E. histolytica*, de nombreux filaments de 6 nm de diamètre. Il existe plusieurs structures filamenteuses dans les cellules qui sont, en microscopie électronique, caractérisées par leur diamètre (les microtubules 25 nm, les filaments intermédiaires 10 nm, les microfilaments 6 nm). Les microfilaments sont en général composés d'actine (74). Dans notre cas nous observons des microfilaments après traitements à la phalloïdine. La phalloïdine agit spécifiquement sur l'actine (119) et protège les filaments d'actine contre les fixateurs utilisés en microscopie électronique (29). Par conséquent, nous pensons que les microfilaments que nous

observons sont des filaments d'actine. Toutefois nous n'avons pas de preuve directe que ces microfilaments soient bien de l'actine.

Il existe une seule étude biochimique sur l'actine de *E. histolytica*. Elle a été réalisée par GADASI (26). Elle est très récente et incomplète. GADASI a isolé une protéine qui peut polymériser et activer l'ATPase de la myosine, il s'agit donc d'une actine. Toutefois, la protéine isolée par GADASI a un poids moléculaire de 48,000 daltons mesurée par électrophorèse sur PAGE, comparé à l'actine musculaire qui a un poids moléculaire de 42 000. De plus, l'actine isolée par GADASI n'inhibe pas l'activité de la DNAse-I. L'actine de *E. histolytica* semble donc être très différente de l'actine du muscle ce qui est très surprenant car l'actine est une protéine très conservatrice: toutes les actines isolées auparavant étaient pratiquement identiques. Les différences observées par GADASI pourraient cependant s'expliquer par la présence d'un acide aminé inhabituel sans que les fonctions biologiques importantes de l'actine ne soient modifiées. Il faudra d'autres études pour déterminer si les différences observées par GADASI sont réelles et importantes.

GADASI a aussi montré plusieurs ressemblances entre l'actine de *E. histolytica* et l'actine du muscle. L'actine de *E. histolytica* peut polymériser et la F-actine formée réagit avec H.M.M. (Heavy meromyosine), comme l'actine du muscle. Les 4 ou 5 sites nécessaires à ces deux réactions sont donc semblables. Dans une autre étude, KETTIS (43) a montré que des anticorps anti-actine de muscles lisses réagissent avec l'actine de *E. histolytica*. Les deux protéines ont donc des antigènes communs. Devant ces informations, nous devons nous poser une question importante: est-ce que l'actine de *E. histolytica* réagit avec la phalloïdine de la même manière que l'actine des muscles? Il n'existe présentement aucune preuve biochimique

qui permettrait de répondre à cette question. Cependant nos résultats seraient difficilement explicables si la phalloïdine ne réagissait pas avec l'actine de *E. histolytica*. Il faudra vérifier cette hypothèse pour éliminer les doutes que soulèvent les expériences de GADASI.

La phalloïdine a déjà été introduite dans plusieurs cellules: une amibe, *A. proteus* (92), une moisissure *P. polycephalum* (32, 92) et plusieurs cellules de mammifères en culture (112, 113, 114). Dans toutes ces expériences, la phalloïdine a été introduite par microinjection. Cette technique produit une concentration cytoplasmique de phalloïdine libre très importante et instantanée. Avec les liposomes la phalloïdine pénètre lentement, il faut 20 heures avant d'observer un effet. Comme la phalloïdine a une très forte affinité pour la F-actine ($K_d = 2 \times 10^{-8}$M) (4), elle se lie très rapidement à l'actine et nous n'avons jamais de concentration de phalloïdine libre importante. Avec les liposomes, l'amibe a le temps de réagir et de s'adapter au fait qu'une partie importante de son actine soit maintenue sous forme filamenteuse. Même si nous admettons que, à la fin de notre expérience, la concentration cytoplasmique de phalloïdine est du même ordre de grandeur que celle obtenue par microinjection, l'effet ne pourrait être le même. Nos résultats seraient plus comparables avec l'expérience de BARAK (4) qui a utilisé un dérivé fluorescent de la phalloïdine, perméable à travers les membranes. Ce dérivé de la phalloïdine pénètre par diffusion donc de manière lente. Mais BARAK n'a montré que des résultats en fluorescence et n'a pas fait d'observation en microscopie électronique.

Dans les amibes traitées à la phalloïdine, nous observons des filaments d'actine qui sont surtout organisés sous forme de zones denses.

Ce résultat est semblable à celui obtenu par WEHLAND (112) avec les cellules de mammifères en cultures. Il est par contre différent des résultats obtenus par STOCKEM avec *A. proteus* (92). La microinjection de la phalloïdine dans *A. proteus*, induit la formation d'une couche filamenteuse à la périphérie de l'amibe. Puis cette couche se contracte en emprisonnant tous les organites cellulaires au centre de la cellule. Nous n'avons jamais observé de couche filamenteuse à la périphérie de *E. histolytica* et les zones denses de filaments que nous observons contiennent peu d'organites cellulaires. Il faudra d'autres études pour déterminer si les différences observées chez ces deux amibes proviennent des techniques utilisées, de la concentration de phalloïdine introduite, ou de l'existence de deux systèmes contractiles différents.

Les résultats obtenus par STOCKEM sont en accord avec les théories du mouvement amiboïde de ALLEN (2) et de TAYLOR (101). Selon STOCKEM la phalloïdine provoquerait une polymérisation de l'actine dans la cellule non pas de manière aléatoire, mais seulement dans la région où les filaments d'actine existent dans les conditions normales, c'est-à-dire dans la zone périphérique de la cellule. Si on applique ce même raisonnement à nos expériences il faudrait admettre l'existence de zones de filaments d'actine non en périphérie, mais au centre de la cellule. L'existence de telles zones ne s'intègre à aucune des théories du mouvement amiboïde connues. Mais il se pourrait quand même que de telles structures existent à l'état naturel dans les amibes. OPAS (66) et LEMONS (51) en utilisant de nouvelles techniques microscopiques (microscopie holographique, microscopie acoustique) ont montré que le cytoplasme des amibes n'est pas homogène mais contient des zones plus denses. Si ces structures sont une

réalité et non un artéfact, il faudrait déterminer leur rôle dans le mouvement amiboïde.

Dans les expériences avec les cellules de mammifères, WEHLAND (112) considérait les zones d'actine comme des artéfacts induits par la phalloïdine et non comme des structures physiologiques. Une deuxième possibilité est donc que les zones denses que nous avons observées soient des artéfacts. Les filaments d'actine stabilisés par la phalloïdine ne pouvant plus se dépolymériser seraient inutilisés par l'amibe dans ses déplacements et ils s'accumuleraient en une masse au centre du cytoplasme.

Dans les zones denses, et à leur périphérie nous observons plusieurs organisations de filaments. Ces filaments forment souvent un réseau tridimensionnel. Cette organisation est caractéristique des gels d'actine, c'est à dire de plusieurs filaments interconnectés par des "actin binding protein" (38, 65). Nous observons aussi des faisceaux de filaments parallèles, et quelquefois ces faisceaux sont interconnectés. C'est à notre connaissance la première fois que l'on observe une telle organisation en coupe fine chez *E. histolytica*. Cette organisation a déjà été observée par HEUSER (40), WOLOSEWICK (121) et MATTSON (61) chez d'autres cellules lorsqu'ils ont étudié des extraits de cytosquelettes de cellules de mammifères par des techniques microscopiques non conventionnelles (fixation par congélation ultra-rapide à la température de l'hélium liquide, microscopie électronique à haut voltage).

Nous allons maintenant comparer nos résultats avec d'autres chercheurs qui ont étudié l'ultrastructure de *E. histolytica* sans utiliser la phalloïdine. KRESS (46) et MICHEL (63, 64) ont observé des filaments de 6 nm dans *E. histolytica* qui formaient une structure ressemblant à un

jet d'eau «fountain zone», c'est-à-dire un faisceau de filaments parallèles fortement liés à une extrémité mais lâches à l'autre extrémité. Cette structure se situait au centre de la cellule. Toutefois, MICHEL n'a pas expliqué le fonctionnement de cette structure en «fontaine» dans le mouvement amiboïde. Chez nos témoins ainsi que chez les amibes traitées à la phalloïdine, nous n'avons jamais observé de telles structures en «fontaine». Ces différents résultats s'expliquent probablement par le fait que nous avons utilisé des techniques de fixation différentes.

En examinant la structure fine du cytoplasme de *E. histolytica*, nous n'avons jamais observé de filaments épais ou des structures correspondant aux filaments de myosine. Il n'existe pas de preuves biochimiques de l'existence de myosine dans *E. histolytica*. Il faut donc encore rechercher, chez cette cellule, la structure possédant une activité ATPasique dans la contraction cellulaire.

Nous avons aussi observé, dans les amibes traitées avec les liposomes contenant de la phalloïdine, une modification de l'organisation des polysomes qui se cristallisent en RNP. Il n'existe présentement aucune expérience démontrant un effet direct de la phalloïdine sur les ribosomes ou les polysomes. Nous allons ci-dessous présenter deux hypothèses pouvant expliquer l'effet observé.

La première hypothèse est que dans *E. histolytica*, les polysomes soient liés aux filaments d'actine. La phalloïdine en agissant sur l'état de polymérisation de l'actine influencerait cette liaison d'une manière encore inconnue. Il s'ensuivrait une libération des polysomes dans la

cellule et une réorganisation de ces polysomes en cristaux. VAN VENROOIJ (107) a montré que dans des cellules de mammifères, les polysomes actifs dans la synthèse des protéines sont liés au cytosquelette par les ARNm. HEUSER (40) et WOLOSEWICK (121) ont apporté des preuves ultrastructurales de la liaison ribosomes-actine dans les cellules de mammifères. Il pourrait donc exister dans *E. histolytica* une liaison semblable entre les polysomes et les filaments d'actine.

La deuxième hypothèse est que le traitement des amibes avec des liposomes contenant de la phalloïdine soit un stress important pour les amibes. Se retrouvant dans un environnement défavorable elles commencent alors à s'enkyster. Or il a été montré que la formation des RNP est l'une des premières étapes dans l'enkystement (78).

Nous ne disposons pas d'informations permettant de trancher entre ces deux hypothèses. Nous avons remarqué un effet de la phalloïdine sur l'organisation des polysomes et c'est la première fois qu'un tel effet est observé. Il nous semble important de poursuivre cette recherche car nos résultats soulèvent plusieurs questions fondamentales, soit au niveau de la synthèse protéique si c'est la première hypothèse qui est valable, soit au niveau des mécanismes d'enkystement si c'est la deuxième hypothèse.

Finalement, en étudiant l'effet de la phalloïdine, nous avons eu la chance d'observer la phagocytose à un stade légèrement plus avancé (figure 23a) que MARTINEZ-PALOMO (60). Nous pouvons confirmer leurs premières observations. Quand *E. histolytica* phagocyte une bactérie, elle forme deux petits pseudopodes qui entourent complètement la bactérie.

Dans cette recherche, nous avons donc montré qu'il est possible d'observer les filaments d'actine dans *E. histolytica* en utilisant la phalloïdine. Au microscope électronique, nous avons eu le temps de n'étudier en détail qu'une centaine de cellules. Nos premières observations fournissent déjà plusieurs informations sur les organisations possibles des filaments d'actine dans *E. histolytica*. En accumulant les observations et en notant la position des filaments d'actine en fonction de la forme et de la physiologie de l'amibe, nous croyons qu'il deviendra possible de décrire le cytosquelette de *E. histolytica* et d'expliquer les mécanismes du mouvement de cette cellule.

CHAPITRE V

CONCLUSION GENERALE

Notre objectif principal était d'introduire de la phalloïdine dans *E. histolytica*. Pour réaliser cet objectif, nous avons utilisé des liposomes. C'était une approche nouvelle et originale car les liposomes ont été jusqu'à maintenant très peu utilisés comme transporteur. Ce travail est d'ailleurs l'un des rares où les liposomes sont utilisés pour étudier un processus physiologique. Les études réalisées par d'autres auteurs jusqu'à maintenant, visaient surtout à décrire et comprendre les interactions liposomes-cellules. Dans les quelques cas où l'on a étudié des processus physiologiques, on a introduit des produits possédant des effets multiplicateurs ou des catalyseurs comme des enzymes (34, 83, 118), des acides nucléiques (19, 24, 59, 68, 86, 122) ou des hormones (71, 77) soit des produits qui agissent à l'état de traces. Dans cette recherche, nous avons introduit de la phalloïdine. La phalloïdine n'est pas un catalyseur. Dans le cytoplasme chaque mole de phalloïdine réagit avec une mole d'actine. Pour observer un effet il est donc nécessaire d'obtenir un transfert très important du produit encapsulé.

Pour réaliser notre travail, nous avons donc été confronté tout au long de la recherche à des problèmes de rendement des méthodes. Il nous a fallu mettre au point la méthode de préparation des liposomes qui possède le taux d'encapsulation le plus élevé et modifier cette méthode de manière à n'utiliser qu'une très petite quantité de phalloïdine

Nous avons dû aussi trouver des conditions d'incubation qui permettent un transfert plus efficace du produit encapsulé aux cellules que celui obtenu dans toutes les expériences déjà réalisées.

Nous avons déjà longuement discuté les problèmes de mesure des interactions liposomes-cellules ou, si on préfère, de l'absence de méthode de mesure vraiment efficace permettant de quantifier ces interactions. Au cours de notre recherche nous avons mis en évidence un mécanisme de transfert du contenu des liposomes qui n'avait pas encore été décrit. Les méthodes de mesures existantes avant le début de notre recherche ne tenaient donc pas compte de la possibilité d'une diffusion du produit encapsulé des vacuoles digestives après une phagocytose des liposomes. Nous avons montré que ce mécanisme existe et qu'il peut être exploité pour accroître l'efficacité du transfert d'un produit encapsulé dans un liposome vers le cytoplasme d'une cellule. Ce résultat présente par conséquent beaucoup d'intérêt pour d'éventuelles applications futures. Notre résultat met aussi en doute les conclusions de travaux antérieurs réalisés avec la CF comme marqueur.

Les conditions que nous avons développées nous ont permis d'introduire de la phalloïdine dans le cytoplasme de *E. histolytica*. WEHLAND (112) et STOCKEM (92) ont déjà proposé la phalloïdine comme un outil pour étudier le cytosquelette des cellules et les mouvements cellulaires, mais ils n'avaient qu'une technique pour introduire la phalloïdine dans les cellules: la microinjection. Dans ce travail nous avons développé une deuxième technique. Il devient maintenant possible d'agir sur l'actine des cellules par une technique qui est moins drastique. Un autre avantage de notre méthode est que nous pouvons traiter un plus grand nombre de cellules simultanément alors que la microinjection ne

permet de traiter qu'une cellule à la fois.

Sous l'effet de la phalloïdine, nous avons observé au microscope électronqiue de nombreux filaments. Nos premières observations nous montrent que les filaments d'actine peuvent former des gels, des faisceaux de filaments parallèles et des faisceaux de filaments parallèles interconnectés. Nous avons aussi observé un résultat inattendu, l'introduction de la phalloïdine induit une modification dans l'organisation des polysomes. Ces polysomes forment d'énormes cristaux qui entourent parfois le noyau.

Nous avons donc mis au point une méthode qui permet d'introduire de la phalloïdine dans le cytoplasme de *E. histolytica* par l'intermédiaire des liposomes. Avec cette méthode, il devient maintenant possible d'entreprendre l'étude plus détaillée de l'organisation du cytosquelette de *E. histolytica*.

BIBLIOGRAPHIE

1. ALLEN, T.M., L.G. CLELAND (1980). Serum induced leakage of liposome contents. Biochim. Biophys. Acta 597, 418-426.

2. ALLEN, R.D., D.L. TAYLOR (1975). The molecular basis of amoeboïd movement. Dans S. Inoué, R.E. Stevens (édi.): Molecular and cell movement. pp. 239-258. Raven Press, New-York.

3. BANGHAM, A.D., M.M. STANDISH, J.C. WATKINS (1965). The action of steroids and streptolysins on the permeability of phospholipid structures to cation. J. Mol. Biol. 13, 238-252.

4. BARAK, L.S., R.R. YOCUM, W.W. WEBB (1981). *In vivo* staining of cytoskeletal actin by auto-internalization of non-toxic concentrations of nitiobenzoxadiazole-phallacidin. J. Cell Biol. 89, 368-372.

5. BATZRI, S., E.D. KORN (1975). Interaction of phospholipid vesicles with cells. J. Cell Biol. 66, 621-634.

6. BANDWIN, H., C. STOCK, D. VINCENT, J.E. GRENIER (1975). Microfilamentous system and secretion of enzyme in the exocrine pancreas. J. Cell Biol. 66, 165-181.

7. BIRD, R.G., T.F. McCAUL (1976). The rhabdoviruses of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*. Ann. of Trop. Med. Parasitol. 70, 81-93.

8. BLUMENTHAL, R., J.N. WEINSTEIN, S.O. SHARROW, P. HENKART (1977). Liposome-lymphocyte interaction: saturable sites for transfer and intracellular release of liposome contents. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 5603-5607.

9. BRENNER, S.L., E.D. KORN (1979). Spectrin-actin interaction: phosphorylated and dephosphorylated spectrin tetramer cross-link F-actin. J. Biol. Chem., 254, 8620-8627.

10. CARLSSON, L., L.E. NYSTRÖM, I. SUNKVIST, F. MARKEY, V. LINDBERG (1977). Actin polymerizability is influenced by profilin a low molecular weight protein in non-muscle cells. J. Mol. Biol. 115, 465-483.

11. CRAIG, S.W., T.D. POLLARD (1982). Actin-binding proteins. Trends Biochem. Sci. 7, 88-92.

12. CULLIS, P.R., M.J. HOPE (1978). Effects of fusogenic agent on membrane structure of erythrocyte ghosts and the mechanism of membrane fusion. Nature 271, 672-674.

13. DANCKER, P., I. LOW, W. HASSELBACH, Th. WIELAND (1975). Interaction of actin with phalloïdin: polymerization and stabilization of F-actin. Biochim. Biophys. Acta 400, 407-414.

14. DE VRIES, I., A. SCHAFER, H. FAULSTICH, Th. WIELAND (1976). Protection of actin from heat denaturation by various phallotoxins. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 1139-1143.

15. DE VRIES, I., Th. WIELAND (1978). The influence of phallotoxins and metal ions on the rate of proteolysis of actin. Biochemistry 17, 1965-1968.

16. DEAMER, D. (1978). Preparation and properties of ether-injection liposomes. Ann. N.Y. Acad. Sci. 308, 250-258.

17. DEAMER, D., A.D. BANGHAM (1976). Large volume liposomes by an ether vaporization method. Biochim. Biophys. Acta 443, 629-634.

18. DIAMOND, L. (1968). Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinm, 1903 and *E. histolytica* like amoeba. J. Parasitol. 54, 1047-1056.

19. DIMIATRIADIS, G.J. (1978). Translation of rabbit globin mRNA introduced by liposomes into mouse lymphocytes. Nature 274, 923-924.

20. DREYER, D. (1961). Growth of a strain of *Entamoeba histolytica* at room temperature. Texas Rep. Biol. Med. 19, 393-396.

21. EATON, R., E. MEEROVITCH, J. COSTENTON (1969). A surface active lysosome in *Entamoeba histolytica*. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 63, 678-680.

22. ECKERT, B., E. LAZARIDES (1978). Localization of actin in *Dictyostelium* amebas by immunofluorescence. J. Cell Biol. 77, 714-721.

23. EDELMAN, G.M. (1976). Surface modulation in cell recognition and cell growth. Science 192, 218-226.

24. FRALEY, R., S. SUBRAMANI, P. BERG, D. PAPAHADJOPOULOS (1980). Introduction of liposome-encapsulated SV40 into cells. J. Biol. Chem. 255, 10431-10435.

25. FRY, D.W., J.C. WHITE, I.D. GOLDMAN (1978). Rapid separation of low molecular weight solutes from liposomes without dilution. Anal.

Biochem. 90, 809-815.

26. GADASI, H. (1982). Isolated *Entamoeba histolytica* actin does not inhibit DNAse-I activity. Biochem. Biophys. Res. Commun. 104, 158-164.

27. GAWLITTA, W., W. STOCKEM, J. WEHLAND, K. WEBER (1980). Organization and spatial arrangement of fluorescein-labelled native actin microinjected into normal locomoting and experimentally influenced *Amoeba proteus*. Cell Tissue Res. 206, 181-191.

28. GICQUAUD, C. (1979). Etude de l'ultrastructure du noyau et de la mitose de *Entamoeba histolytica*. Biol. Cellulaire 35, 305-312.

29. GICQUAUD, C., J. GRUDA, J.-M. POLLENDER (1980). La phalloïdine protège la F-actine contre les effets destructeurs de l'acide osmique et du permenganate. Eur. J. Cell Biol. 20, 234-239.

30. GILLIN, F.D., L. DIAMOND (1980). Attachment and short-term maintenance of motility and viability of *Entamoeba histolytica* in a defined medium. J. Protozool. 27, 220-225.

31. GOODALL, A.H., D. FISHER, J.A. LUCY (1980). Cell fusion haemolysis and mitochondrial swelling induced by retinol and derivatives. Biochim. Biophys. Acta 595, 9-14.

32. GÖTZ VON OLENHUSEN, K., K.E. WOHLFARTH-BOTTERMANN (1979). Evidence for actin transformation during the contraction-relaxation cycle of cytoplasmic actomyosin cycle blockade by phalloïdin injection. Cell tissue Res. 196, 455-470.

33. GREGORIADIS, G. (1976). The carrier potential of liposomes in biology and medicine. N. Engl. J. Med. 295, 704-710, 765-770.

34. GREGORIADIS, G., R.A. BUCKLAND (1973). Enzyme-containing liposomes alleviate a model for storage disease. Nature 244, 170-172.

35. GRUENBERG, J., D. CORAL, A.L. KNUPFER, J. DEHUSSES (1979). Interaction of liposomes with *Trypanosoma brucei* plasma membrane. Biochem. Biophys. Res. Commun. 88, 1173-1179.

36. HALLET, M.B., A.K. CAMPBELL (1980). Uptake of liposomes containing the photoprotein obelin by rat isolated adipocytes. Biochem. J. 192, 587-596.

37. HEATH, T.D., R.T. FRALEY, D. PAPAHADJOPOULOS (1980). Antibody targetting of liposomes: cell specificity obtained by conjugation of F $(ab^1)_2$ to vesicle surface. Science 210, 539-541.

38. HELLEWELL, S.B., D.L. TAYLOR (1979). The contractile basis of ameboid movement. VI The solation-contraction coupling hypothesis. J. Cell Biol. 83, 633-648.

39. HERMANDEZ-YAGO, J., E. KNECHT, A. MARTINEZ-RAMON, S. GRISOLIA (1980). Autophagy of ferritin incorporated into the cytosol of Hela cells by liposomes. Cell Tissue Res. 205, 303-309.

40. HEUSER, J.E., M.W. KIRSCHNER (1980). Filament organization revealed in platinum replicas of freeze-dried cytoskeletons. J. Cell Biol. 86, 212-234.

41. HUANG, L., K. OZATO, R.E. PAGANO (1978). Interaction of phospholipid vesicles with murine lymphocytes: I Vesicles-cell adsorption and fusion as alternate pathways of uptake. Membrane Biochem. 1, 1-26.

42. KANTOR, H.L., J.H. PRESTEGARD (1978). Fusion of phosphatidylcholine bilayer vesicles: role of free fatty acid. Biochemistry 17, 3592-3597.

43. KETTIS, A.A., K. LIDMAN, A. FAGRAEUS (1977). Actin in *Entamoeba histolytica* trophozoites revealed by human actin antibodies. J. Parasitol. 63, 581-583.

44. KLAUSNER, R.D., A.M. KLEINFLED, R.L. HOOVER, M.J. KARNOVSKY (1980). Lipid domains in membrane. J. Biol. Chem. 255, 1286-1295.

45. KORN, E.D. (1978). Biochemistry of actomyosin-dependent cell motility. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 588-599.

46. KRESS, Y., M. WITTNER, R.M. ROSENBAUM (1971). Site of cytoplasmic ribonucleoprotein-filament assembly in relation to helical body formation in axenic trophozoites of *Entamoeba histolytica*. J. Cell Biol. 49, 773-784.

47. LAZARIDES, E. (1975). Tropomyosin antibody: the specific localization of tropomyosin in non-muscle cells. J. Cell Biol. 65, 549-561.

48. LAZARIDES, E., K. BURRIDGE (1975). α-actinin: immunofluorescent localization of a muscle structural protein in non muscle cells. Cell 6, 289-298.

49. LAZARIDES, E., K. WEBER (1974). Actin antibody: the specific visualization of actin filaments in non-muscle cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 2268-2272.

50. LEHER, S.S. (1981). Damage to actin filaments by glutaraldehyde; protection by tropomyosin. J. Cell Biol. 90, 459-466.

51. LEMONS, R.A., C.F. QUATE (1975). Acoustic microscopy - a tool for medical and biological research. Acoustical Holography 6, 305-317.

52. LESERMAN, L.D., P. MACHY, J. BARDET (1981). Cell-specific drug transfer from liposomes bearing monoclonal antibodies. Nature 293, 226-228.

53. LESERMAN, L.D., J.N. WEINSTEIN, R. BLUMENTHAL, S.O. SHARROW, W.D. TERRY (1979). Binding of antigen-bearing fluorescent liposomes to the murine myeloma tumor MOPC 315. J. Immunol. 122, 585-591.

54. LESERMAN, L.D., J.N. WEINSTEIN, R. BLUMENTHAL, W.D. TERRY (1980). Receptor-mediated endocytosis of antibody-opsonized liposomes by tumor cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4089-4093.

55. LEUNG, J.G.M. (1980). Liposomes. Effect of temperature on their mode of action on single frog skeletal muscle fibers. Biochim. Biophys. Acta 597, 427-432.

56. LUDVIK, J., A. SHIPSTONE (1970). The ultrastructure of *Entamoeba histolytica*. Bull. WHO 43, 301-308.

57. LOW, I., Th. WIELAND (1974). The interaction of phalloïdin , some of its derivatives, and of other cyclic peptides with muscle actin as studied by viscometry. FEBS Lett. 44, 340-343.

58. LUCY, J.A. (1978). Mechanisms of chemically induced cell fusion. Cell surface reviews 5, 267-304.

59. MAKINS, J.F., G. HOLT (1981). Liposomes mediated transformation of streptomycetes by chromosomal DNA. Nature 293, 671-673.

60. MARTINEZ-PALOMO, A., A. GONZALES-ROBLES, B. CHAVEZ de RAMIREZ (1976). Ultrastructural study of various *Entamoeba* strains. Dans Proceed. international conference on amebiasis, Sepulveda, B., et L. Diamond (eds.), Mexico, p. 226-237.

61. MATTSON, J.C., C.A. ZUICHES (1981). Elucidation of the platelet cytoskeleton. Ann. New-York, Acad. Sci. 370, 11-21.

62. MAUPIN-SZAMIER, P., T. POLLARD (1978). Actin filament destruction by osmium tetroxide. J. Cell Biol. 77, 827-853.

63. MICHEL, R., E. SCHUPP (1974). Darstellung von mikrofilamenten in cityplasma von *Entamoeba histolytica*. Z. Parasitenk. 43, 285-298.

64. MICHEL, R., E. SCHUPP (1976). Cytoplasmic fibril and their relation to amoeboid movement of *Entamoeba histolytica*. Dans Proceed, international conference on amibiasis. Sepulveda B., L. Diamond (eds.), Mexico, p. 300-310.

65. MOOSEKER, M.S., T.A. GRAVES, K.A. WHARTON, N. FALCO, C.L. HOWE (1980). Regulation of microvillus structure: calcium-dependent solation and cross-linking of actin filaments in the microvilli of intestinal epithelial cells. J. Cell Biol. 87, 809-822.

66. OPAS, M. (1980). Cytoplasmic streaming: is the stream in *Amoeba* really homogeneous? Bull. Acad. Pol. Scien. 28, 515-519.

67. OPAS, M. (1981). Actin distribution in *Amoeba proteus*. Bull. Acad. Pol. Sci. 28, 511-514.

68. OSTRO, M.J., D. GIACOMONI, D. LAVELLE, W. PAXTON, S. DRAY (1978).

Evidence for translation of rabbit globin mRNA after liposome mediated insertion into a human cell line. Nature (London) 274, 921-923.

69. OSTRO, M.J., O. LAVELLE, W. PAXTON, B. MATTHEWS, D. GIACOMONI (1980). Parameters affecting the liposome-mediated insertion of RNA into eukaryotic cells *in vitro*. Arch. Biochem. Biophys. 201, 392-402.

70. PAGANO, R., J.N. WEINSTEIN (1978). Interaction of liposomes with mammalian cells. Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 7, 435-468.

71. PAPAHADJOPOULOS, D., G. POSTE, E. MAYHEY (1974). Cellular uptake of cyclic AMP captured within phospholipid vesicles and effect on cell growth behaviour. Biochim. Biophys. Acta 363, 404-418.

72. PAULIN-LEVASSEUR, M., C. GICQUAUD (1981). Observations des structures contractiles dans le cytoplasme démembrané d'*Amoeba proteus* après traitement à la phalloïdine. Eur. J. Cell Biol. 26, 144-149.

73. PETTY, H.R., D.G. HAFEMAN, H.M. McCONNELL (1981). Disappearance of macrophage surface folds after antibody-dependent phagocytosis. J. Cell Biol. 89, 223-229.

74. POLLARD, T.D., R.R. WEIHING (1974). Actin and myosin and cell movement. CRC Crit. Rev. Biochem. 2, 1-65.

75. POLLENDER, J.M., J. GRUDA (1979). Effect of phalloïdin on actin proteolysis as mesured by viscometry and fluorimetry. J. Can. Biochim. 57, 49-55.

76. POSTE, G., D. POPAHADJOPOULOS (1976). Lipid vesicles as carriers for introducing materials into cultured cells: influence of vesicle

lipid composition on mechanism(s) of vesicle incorporation into cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 1603-1607.

77. POSTE, G., D. PAPAHADJOPOULOS (1976). Drug-containing lipid vesicles render drug resistant tumour cell sensitive to actimomycin D. Nature (London) 261, 699-701.

78. PROCTOR, E.M., M.A. GREGORY (1973). Ultrastructure of cysts of *E. histolytica*. Int. J. Parasitol. 3, 455-456.

79. PTAK, M., M. EGRET-CHARLIER, A. SANSON, O. BOULOUSSA (1980). A NMR study of the ionization of fatty acid, fatty amines and N-acyl amino acids incorporated in phosphatidylcholine vesicles. Biochim. Biophys. Acta 600, 387-397.

80. RALSTON, E., R. BLUMENTHAL, J.N. WEINSTEIN, S.O. SHARROW, P. HENKART (1980). Lysophosphatidylcholine in liposomal membranes. Enhanced permeability but little effect on transfer of a water-soluble fluorescent marker into human lymphocytes. Biochim. Biophys. Acta 597, 543-551.

81. RALSTON, E., L.M. HJELMELAND, R.D. KLAUSNER, J.N. WEINSTEIN, R. BLUMENTHAL (1981). Carboxyfluorescein as a probe for liposome-cell interactions; effect of impurities, and purification of the dye. Biochim. Biophys. Acta 649, 133-137.

82. REYNOLDS, S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. 17, 208-212.

83. ROERDINK, F.H., A.J.B.M. Van RENSWOUDE, B.Y. WIELINGA, A.M. KROON, G.L. SCHERPHOF (1976). Entrapment within liposomes facilitates uptake

of amyloglucosidase by cultured fibroblaste from a patient with Pompe's disease (glycogenosis type II). J. Mol. Med. 1, 257-264.

84. RYMAN, B.E., D.A. TYRELL (1980). Liposomes-Bags of potential. Essay in Biochem. 16, 49-98.

85. SCHAFER, A., I. DE VRIES, H. FAULSTICH, Th. WIELAND (1975). Phalloïdin interacts the inhibitory effect of actin DNAse I. FEBS Lett. 57, 51-54.

86. SCHAEFER-RIDDER, M., Y. WANG, P.H. HOFSCHNEIDER (1982). Liposomes as genes carriers: efficient transformation of mouse L cells by thyamine kinase gene. Science 215, 166-168.

87. SCHIEREN, H., B. STEVEN, M. FINKELSTEIN, P. COLEMAN, G. WEISSMAN (1978). Comparaison of large unilamellar vesicles prepared by a petroleum ether vaporization method with multilamellar vesicles. Biochim. Biophys. Acta 542, 137-153.

88. SCHROEDER, T.E. (1973). Actin in dividing cells: contractile ring filaments bind heavy meromyosine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 1688-1692.

89. SIDDIQUI, W.A., M.A. RUDZINSKA (1965). The fine structure of axenically-grown trophozoites of *Entamoeba invadens* with special reference to the nucleus and helical ribonucleoprotein bodies. J. Protozool. 12, 448-459.

90. SILVERSTEIN, S.C., R.M. STEINMAN, Z.A. COHN (1977). Endocytosis. Ann. Rev. Biochem. 46, 669-722.

91. SPURR, A. (1969). A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J. Ultrastruct. Res. 26, 31-43.

92. STOCKEM, W., K. WEBER, J. WEHLAND (1978). The influence of microinjected phalloïdin on locomotion, protoplasmic streaming and cytoplasmic organization in *Amoeba proteus* and *Physarum polycephalum*. Cytobiol. 18, 114-131.

93. SZAMIER, P., T. POLLARD, K. FUGIWARA (1975). Tropomyosin prevents the destruction of actin filaments by osmium. J. Cell Biol. 67, 424a.

94. SZOKA, F.C., K. JACOBSON, D. PAPAHADJOPOULOS (1979). The use of aqueous space markers to determine the mechanism of interaction between phospholipid vesicles and cells. Biochim. Biophys. Acta 551, 295-303.

95. SZOKA, F., K.E. MAGNUSSON, J. WOJCIESZYN, Y. HOU, Z. DERZKO, K. JACOBSON (1981). Use of lectins and polyethylene glycol for fusion of glycolipid containing liposomes with eukaryotic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 1685-1689.

96. SZOKA, F., F. OLSON, T. HEALTH, W. VAIL, E. MAYHEW, D. PAPAHADJOPOULOS (1980). Preparation of unilamellar liposomes of intermediate size (0.1 - 0.2 μm) by a combination of reverse phase evaporation and extrusion through polycarbonate membranes. Biochim. Biophys. Acta 601, 559-571.

97. SZOKA, F., D. PAPAHADJOPOULOS (1978). Procedure for preparation of liposomes with large aqueous space and high capture by reverse-

phase evaporation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4194-4198.

98. SZOKA, F., D. PAPAHADJOPOULOS (1980). Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9, 467-508.

99. TAYLOR, D.L., J.S. CONDEELIS (1979). Cytoplasmic structure and contractility in amoeboid cells. Int. Rev. Cytol. 56, 57-144.

100. TAYLOR, D.L., Y.-L. WANG (1978). Molecular cytochemistry: incorporation of fluorescently labeled-actin into living cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 857-861.

101. TAYLOR, D.L., Y.-L. WANG, J.M. HEIPLE (1980). Contractile basis of ameboid movement VII. The distribution of fluorescently labeled actin in living amebas. J. Cell Biol. 86, 590-598.

102. TRAUBLE, H., E. GRELL (1971). The formation of asymmetrical spherical lecithin vesicles. Neurosci. Res. Program. Bull. 9, 373-380.

103. TURCOTTE, A. (1982). Séparation des virotoxines du champignon *Amanita virosa* et étude de leurs interactions sur l'actine *in vitro*. Mémoire de maîtrise en environnement, Université du Québec à Trois-Rivières, 106 p.

104. VAKIRTZI-LEMONIAS, C., G. GREGORIADIS (1978). Uptake of liposome-entrapped agents by the trypanosome *Crithidia fasciculata*. Biochem. Soc. Trans. 6, 1241-1244.

105. VAN RENSWOUDE, J., D. HOEKSTIA (1980). Cell-induced leakage of liposome contents. Biochemistry 20, 540-546.

106. VAN RENSWOUDE, A.J.B.M., P. WESTENBERG, G.L. SCHERPHOL (1979). *In vitro* interaction of Zajdela ascites hepatoma cells with lipid vesicles. Biochim. Biophys. Acta 558, 22-40.

107. VAN VENROOIJ, W.-J., P.T.G. SILLEKENS, C.A.G. VAN EEKELEN, R.J. REINDERS (1981). On the association of mRNA with the cytoskeleton in uninfected and adenovirus-infected human KB cells. Exp. Cell. Res. 135, 79-91.

108. VERDERAME, M., D. ACORTA, M. EGNOR, K. SMITH, R. POLLACK (1980). Cytoskeletal F-actin patterns quantitated with fluorescein isothiocyanate-phalloïdin in normal and transformed cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 6624-6628.

109. WALLACH, D., P.J.A. DAVIES, I. PASTAN (1978). Purification of mammalian filamin. J. Biol Chem. 253, 3328-3385.

110. WANG, K., J.F. ASH, S.J. SINGER (1975). Filamin: a new high-molecular weight protein found in smooth muscle and non-muscle cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 4483-4486.

111. WEBER, K., U. GROESCHEL-STEWART (1974). Antibody to myosin: the specific visualization of myosin containing filaments in non-muscle cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 4561-4564.

112. WEHLAND, J., M. OSBORN, K. WEBER (1977). Phalloïdin-induced actin polymerization in the cytoplasm of cultured cells interferes with cell locomotion and growth. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5613-5617.

113. WEHLAND, J., M. OSBORN, K. WEBER (1980). Phalloïdin associates with microfilaments after microinjection into tissus culture cells.

Eur. J. Cell Biol. 21, 188-194.

114. WEHLAND, J., K. WEBER (1981). Actin rearrangement in living cells revealed by microinjection of a fluorescent phalloïdin derivative. Eur. J. Cell Biol. 24, 176-183.

115. WEINBACH, E. (1981). Biochemistry of enteric parasitic protozoa. Trends Biochem. Sci. 6, 254-257.

116. WEINSTEIN, J.N., R. BLUMENTHAL, S.O. SHARROW, P. HENKART (1978). Antibody-mediated targeting of liposomes: binding to lymphocytes does not ensure incorporation of vesicle contents into the cells Biochim. Biophys. Acta 509, 272-288.

117. WEINSTEIN, J.N., S. YOSHIKAMI, P. HENKART, R. BLUMENTHAL, W.A. HAGINGS (1977). Liposome-cell interaction: transfer and intracellular release of a trapped fluorescent marker. Science 195, 489-492.

118. WEISSMAN, G., C. COHEN, S. HOFFSTEIN (1977). Introduction of enzymes, by means of liposomes, into non phagocytic Human cells *in vitro*. Biochim. Biophys. Acta 498, 375-385.

119. WIELAND, Th., H. FAULSTICH (1978). Amatoxins, phallotoxins, phallolysin and antamanide: the biologically active components of poisonous *Amanita* mushrooms. Crit. Rev. Biochem. 5, 185-260.

120. WIELAND, Th., W. SCHON (1955). Uber die Giftstoffe des grümen knollenblätterpilzes. X. Die konstitution des phalloïdins. Justus Liebigs. Ann. Chem. 593, 157.

121. WOLOSEWICK, J.J., K.R. PORTER (1979). Microtrabecular lattice of

the cytoplasmic ground substance. J. Cell Biol. 82, 114-139.

122. WONG, T.K., C. NICOLAU, P.H. HOJSCHNEIDER (1980). Appearance of B-lactamase activity in normal cells upon liposome-mediated gene transfer. Gene 10, 87-94.

123. WULF, E., A. DEBODEN, F.A. BAUTZ, H. FAULSTICH, Th. WIELAND (1979). Fluorescent phallotoxin, a tool for the visualization of cellular actin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4498-4502.