

UNIVERSITE DU QUEBEC

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ À

L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN SCIENCES DE

L'ENVIRONNEMENT

PAR

LUC JOOS

EFFETS DE LA PHALLOÏDINE ET DE  
LA VIROÏSINE SUR ACANTHAMOEBA CASTELANII  
APRÈS PERMÉABILISATION

JUILLET 1985

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.

La folie suprême n'est-elle pas de vivre dans le monde tel qu'il est,  
et non tel qu'il devrait être?

CERVANTES

Ce gouffre en toi, vois-tu comment  
Il s'ouvre en toute créature  
Si ton semblable est pourriture  
Tu vas pourrir semblablement.

Le Fou d'Elsa, ARAGON.

A Edith et à Franck,  
pour les climats qu'ils inventent.

## RESUME

Acanthamoeba castellanii est une amibe du sol dont les protéines impliquées directement dans la motilité sont caractérisées biochimiquement et font l'étude de nombreuses recherches in vitro.

Cependant, l'ultrastructure de cette cellule est peu connue, en particulier à cause de l'extrême fragilité de l'actine, protéine fondamentalement impliquée dans la motilité et le mouvement amiboidé. En effet, cette composante cytosquelettique est détruite lors des opérations chimiques préparatoires à l'observation de cellules au microscope électronique.

Pour résoudre cette difficulté, nous avons utilisé deux toxines, la phalloïdine et la viroïsine, extraites d'un champignon, Amanita virosa. Celles-ci ont, in vitro, la propriété de polymériser l'actine et de la protéger lors de la fixation, et surtout lors de la post-fixation.

L'amibe étant imperméable à ces toxines, nous avons mis au point une technique de perméabilisation vitale de la cellule, afin d'y étudier, in situ, la répartition de l'actine.

Au contact de chacune des toxines, il se produit un ralentissement des mouvements intracytoplasmiques qui finissent par s'arrêter définitivement. Dans le même temps, on note un arrondissement de la cellule, un regroupement des organites en une zone centrale et l'apparition d'une zone hyaline périphérique.

En utilisant un fluorochrome qui colore spécifiquement la F-actine, on détecte la présence de câbles d'actine répartis dans toute la cellule.

Par coloration négative, on décèle une très forte augmentation

de la quantité d'actine filamenteuse chez les amibes traitées avec l'une ou l'autre toxine, les filaments pouvant être individuels et organisés en faisceaux, ou pontés en réseaux plus ou moins lâches.

Sur coupes minces, on retrouve au niveau de l'ultrastructure la différenciation des 2 zones (centrale et hyaline) observée en microscopie optique. D'autre part, on observe l'apparition de très nombreux microfilaments d'actine organisés en "câbles" (bundles), en réseaux ou en para-cristaux.

Nos résultats démontrent qu'in situ, la phalloïdine et la viroïsine ont des effets équivalents sur l'actine. Ces effets peuvent être directs (polymérisation, protection), ou indirects (actin-binding protéines, métabolites...).

Grâce à cette étude, nous avons pu montrer que chez Acanthamoeba castellanii, une relation directe existait entre l'état de polymérisation de l'actine et le mouvement cellulaire. Plus l'équilibre G-actine  $\rightleftharpoons$  F-actine est déplacé vers la forme polymérisée, moins la cellule est motile.

Enfin, ces résultats ont permis d'apporter une preuve additionnelle à la théorie moléculaire du mouvement amiboïde, et de proposer 2 modèles explicatifs de l'organisation protoplasmique d'Acanthamoeba castellanii.

## REMERCIEMENTS

- Mes parents m'ont toujours apporté leur soutien, discret et sensible.  
Je leur manifeste ici toute ma reconnaissance.
- Grâce à sa disponibilité permanente, à sa compréhension, et à un certain humour, le Professeur GICQUAUD a créé des conditions propices au déroulement de cette étude. Je lui exprime ma gratitude, sincère.
- Les membres du Groupe de Recherche en Motilité Cellulaire ont montré un intérêt bienveillant à mon sujet. Je les en remercie vivement; Mlle Hélène-Marie THERIEN en particulier.
- Merci à Mlle Chantal ALARIE.

## TABLE DES MATIERES

|  | Page |
|--|------|
| RESUME .....   | iii  |
| REMERCIEMENTS .....  | v    |
| TABLE DES MATIERES .....   | vi   |
| LISTE DES FIGURES .....  | xi   |
| INTRODUCTION .....   | 1    |
| I- Le mouvement amibioïde .....  | 2    |
| 1. Théorie de MAST .....   | 3    |
| 2. Théorie d'ALLEN .....   | 3    |
| 3. Théorie de RINALDI et BAKER .....   | 6    |
| 4. Théorie de la contraction corticale .....   | 8    |
| 5. Théorie de la "solation-contraction" couplées .....   | 11   |
| II- Biochimie de la motilité chez <u>Acanthamoeba castellanii</u> .....  | 15   |
| 1. L'actine .....  | 15   |
| 2. Les myosines .....  | 16   |
| 3. Autres protéines de la motilité et régulation de la motilité .....  | 17   |
| III- Problématique .....   | 19   |
| 1. La phalloïdine ou la viroïsine stabiliseraient-elles l'actine d' <u>Acanthamoeba castellanii</u> <i>in vivo</i> ? ..... | 22   |
| 2. Une perméabilisation vitale d' <u>Acanthamoeba castellanii</u> est-elle réalisable? .....                               | 23   |

|   |    |
|---|----|
| 3. La phalloïdine et la viroïsine ont-elles un effet, <u>in vivo</u> , sur <u><i>Acanthamoeba castellanii</i></u> , après perméabilisation? ..... | 24 |
| a. Les coupes minces .....  | 24 |
| b. Coloration négative .....  | 24 |
| c. Microscopie optique à contraste .....  | 25 |
| d. Microscopie optique à fluorescence .....   | 25 |
| 4. Les observations réalisées traduirait-elles un effet réel des toxines sur l'amibe? .....   | 25 |
| <br>MATERIEL ET METHODES .....  | 26 |
| 1. Produits utilisés .....  | 26 |
| 2. Culture des amibes .....   | 26 |
| 3. Traitement des amibes par les agents perméabilisants .....   | 27 |
| 3.1 Perméabilisation des cellules .....   | 27 |
| 3.1.1 A la digitonine .....   | 27 |
| 3.1.2 Au Nonidet P40 .....  | 28 |
| 4. Action des toxines sur les cellules perméabilisées .....   | 28 |
| 4.1 Préparation des toxines .....   | 28 |
| 4.2 Action de la phalloïdine ou de la viroïsine .....   | 28 |
| 5. Préparation des cellules pour la microscopie optique .....   | 29 |
| 5.1 Contraste de phase et interférentiel .....  | 29 |
| 5.2 Microscopie à fluorescence .....  | 29 |
| 5.2.1 Fixation des cellules .....   | 29 |
| 5.2.2 Coloration des cellules .....   | 29 |
| 6. Préparation des cellules pour la microscopie électronique.   | 30 |
| 6.1 Broyats cellulaires .....   | 30 |

|  |    |
|--|----|
| 6.2 Marquage à la méromyosine lourde ou H.M.M. ....  | 30 |
| 6.3 Coloration négative .....  | 30 |
| 6.4 Coupes minces .....  | 30 |
| 6.4.1 Fixation à la formaldéhyde .....   | 30 |
| 6.4.2 Fixation à la glutaraldéhyde .....   | 31 |
| 6.4.3 Coupes minces .....  | 31 |
| RESULTATS .....  | 32 |
| 1. Etude des cellules intactes non perméabilisées et non traitées par les toxines .....  | 32 |
| 1.1 Observations en microscopie optique .....  | 32 |
| 1.2 Observations sur coupes fines en microscopie électronique .....  | 32 |
| 1.3 Comparaison de l'effet des 2 fixateurs .....   | 37 |
| 2. Mise au point de la perméabilisation des cellules .....   | 39 |
| 2.1 Observations au microscope optique .....   | 39 |
| 2.1.1 Action de la digitonine .....  | 39 |
| 2.1.2 Action du Nonidet P40 .....  | 41 |
| 2.2 Observations, au microscope électronique, de coupes minces d'amibes perméabilisées à la digitonine ou au Nonidet P40 ..... | 41 |
| 3. Etude de l'effet de toxines sur les cellules perméabilisées .....   | 43 |
| 3.1 Effet de la phalloïdine sur les amibes perméabilisées .....  | 43 |
| 3.1.1 Observations en microscopie optique .....  | 43 |
| 3.1.2 Coloration négative de cellules traitées à   |    |

|  |    |
|--|----|
| la phalloïdine .....   | 46 |
| 3.1.3 Traitement des cellules à la N.B.D. phallaci-<br>dine .....  | 49 |
| 3.1.4 Coupes minces d'amibes traitées à la phalloï-<br>dine après perméabilisation .....   | 49 |
| 3.2 Effet de la viroïsine sur les cellules perméabili-<br>sées .....   | 56 |
| 3.2.1 Observations au microscope optique .....   | 56 |
| 3.2.2 Colorations négatives d'amibes traitées à la<br>viroïsine après perméabilisation .....                                       | 59 |
| 3.2.3 Coloration de l'actine à la N.B.D. phallaci-<br>dine .....   | 59 |
| 3.2.4 Observations en microscopie électronique de<br>coupes fines d'amibes traitées à la viroïsine<br>après perméabilisation ..... | 63 |
| DISCUSSION .....   | 69 |
| 1- La perméabilisation .....   | 69 |
| 2- La fixation .....   | 70 |
| 3- La post-fixation .....  | 71 |
| 4- Effets des toxines .....  | 72 |
| 4.1 Modifications morphologiques .....   | 73 |
| 4.2 Modifications ultrastructurales .....  | 74 |
| 5- Mode d'action des toxines .....   | 79 |
| 6- Influence des toxines sur la motilité cellulaire .....  | 81 |
| 7- Modèles de l'organisation protoplasmique d'amibes .....   | 84 |
| 7.1 Modèle d' <u>Amoeba proteus</u> .....  | 85 |

|   |    |
|---|----|
| 7.2 1er Modèle d' <u>Acanthamoeba castellanii</u> soumise à<br>l'action de la phalloïdine ..... | 87 |
| 7.3 2e Modèle d' <u>Acanthamoeba castellanii</u> soumise à<br>l'action de la phalloïdine .....  | 88 |
| CONCLUSION .....  | 89 |
| BIBLIOGRAPHIE .....   | 92 |

## LISTE DES FIGURES

|   | Page |
|---|------|
| Figure 1: Diagramme illustrant la théorie de MAST .....   | 4    |
| Figure 2: Diagramme illustrant la théorie de la contraction<br>en fontaine .....                          | 5    |
| Figure 3: Diagramme illustrant la théorie de RINALDI-BAKER ....   | 7    |
| Figure 4: Diagramme illustrant la théorie de la contraction<br>corticale chez <u>Amoeba proteus</u> ..... | 9    |
| Figure 5: Diagrammes illustrant la théorie de la solation-<br>contraction couplées .....                  | 13   |
| Figure 6: Formule de la phalloïdine .....   | 20   |
| Figure 7: Formule de la viroïsine .....   | 21   |
| Figure 8: <u>Acanthamoeba castellanii</u> non perméabilisée et non<br>traitée par une toxine .....        | 33   |
| Figure 9: Ultrastructure générale d'une amibe témoin non<br>perméabilisée et non traitée par une toxine.  |      |

|  |    |
|--|----|
| Fixation à la formaldéhyde .....   | 34 |
| Figure 10: Ultrastructure générale d'une amibe non perméabilisée et non traitée par une toxine. Fixation à la glutaraldéhyde .....   | 35 |
| Figure 11: Ultrastructure d'une amibe témoin non perméabilisée et non traitée par une toxine. Fixation à la glutaraldéhyde .....   | 36 |
| Figure 12: Comparaison de l'effet des deux fixateurs utilisés sur l'ultrastructure d' <u><i>Acanthamoeba castellanii</i></u> non perméabilisée et non traitée par une toxine ..... | 38 |
| Figure 13: Amibe témoin perméabilisée à la digitonine observée en microscopie optique à contraste interférentiel ...   | 40 |
| Figure 14: Observations en microscopie optique d'amibes perméabilisées au Nonidet P40 .....  | 42 |
| Figure 15: Ultrastructure d'une amibe perméabilisée à la digitonine. Fixation à la glutaraldéhyde .....  | 44 |
| Figure 16: Ultrastructure d'une amibe perméabilisée par le Nonidet P40. Fixation à la glutaraldéhyde .....   | 45 |
| Figure 17: Effets de la phalloïdine sur <u><i>Acanthamoeba castellanii</i></u>   |    |

|   |    |
|---|----|
| perméabilisée. Observations en microscopie optique à<br>contraste de phase .....  | 47 |
| Figure 18: Effets de la phalloïdine sur l'amibe perméabilisée.<br>Observations en microscopie électronique de broyats<br>cellulaires colorés négativement .....                                       | 48 |
| Figure 19: Coloration des amibes perméabilisées et traitées à<br>la phalloïdine par la N.B.D. phallacidine. Observa-<br>tions en microscopie à fluorescence et en contraste<br>interférentiel .....   | 50 |
| Figure 20: Ultrastructure d'une amibe traitée à la phalloïdine<br>après perméabilisation. Fixation à la glutaraldé-<br>hyde .....   | 52 |
| Figure 21: Détails périphériques du cytoplasme d'amibes perméabi-<br>lisées et traitées par la phalloïdine. Observations<br>en microscopie électronique après fixation à la glu-<br>taraldéhyde ..... | 53 |
| Figure 22: Détails de l'ultrastructure d'amibes traitées à la<br>phalloïdine après perméabilisation. Fixation à la<br>glutaraldéhyde .....  | 54 |
| Figure 23: Effets de la phalloïdine sur <u>Acanthamoeba castellanii</u><br>perméabilisée. Observations sur coupes minces au   |    |

|   |    |
|---|----|
| microscope électronique après fixation par la formaldéhyde .....  | 55 |
| Figure 24: Coupe tangentielle d'une amibe perméabilisée puis traitée par la phalloïdine. Fixation par la formaldéhyde .....                                   | 57 |
| Figure 25: Effets de la viroïsine sur <u>Acanthamoeba castellanii</u> perméabilisée. Observations en microscopie optique à contraste de phase .....           | 58 |
| Figure 26: Coloration négative de broyats de cellules traitées par la viroïsine après perméabilisation .....  | 60 |
| Figure 27: Coloration négative de broyats de cellules traitées à la viroïsine après perméabilisation .....  | 61 |
| Figure 28: Coloration à la N.B.D. phallacidine d'amibes après perméabilisation et traitement à la viroïsine. Observations en microscopie à fluorescence ..... | 62 |
| Figure 29: Ultrastructure d' <u>Acanthamoeba castellanii</u> perméabilisée puis traitée à la viroïsine .....  | 64 |
| Figure 30: Détails de l'ultrastructure d'amibes perméabilisées puis traitées à la viroïsine .....   | 65 |
| Figure 31: Détails de l'ultrastructure du cytoplasme d'amibes   |    |

|   |    |
|---|----|
| traitées à la viroisine après perméabilisation. Cellules fixées à la formaldéhyde ..... | 66 |
|---|----|

|  |    |
|--|----|
| Figure 32: Détails du cytoplasme d'amibes traitées à la viroisine après perméabilisation. Fixation à la glutaraldéhyde ..... | 67 |
|--|----|

## INTRODUCTION

En 1835 apparaît, dans la littérature scientifique, le concept de contractilité du cytoplasme des cellules motiles (35) (36). Au fur et à mesure que vont être développées les techniques de microscopie (photique puis électronique) et de par les progrès de la biochimie et des sciences connexes, la notion de cytosquelette va évoluer. D'une forme statique impliquée dans le maintien exclusif de la morphologie cellulaire, cette entité progressera vers la forme dynamique qu'on lui attribue désormais.

L'apparition puis le développement explosif de l'immunologie a permis de cerner l'organisation interne des cellules motiles et d'aborder, rigoureusement, la complexité des inter-relations qui existent entre les principaux composants fibreux du cytosquelette:

- Les microtubules.(170)
- Les microfilaments.(4)
- Les filaments intermédiaires.(93)
- Le réseau microtrabéculaire.(184)

D'autre part, le raffinement des techniques biochimiques a permis d'établir que le cytoplasme n'est pas cette substance gélatineusement amorphe qui "emplit" une cellule, baignant le noyau et les organites.

Tout au contraire, les changements d'états de certains de ses éléments, les variations qualitatives et quantitatives de ses protéines polymérisables ainsi que l'équilibre, nécessaire et régulé, de ses ions et molécules constituants démontrent que le cytoplasme est régi par une

organisation qui anime et guide les mouvements de la cellule.

Ainsi, des études ont pu être réalisées sur du cytoplasme démembrané d'amibes (125) ou sur des extraits de cytoplasme (128).

Il existe un très grand nombre de cellules qui sont utilisées pour l'étude du phénomène de contractilité. Parmi elles, les lymphocytes, les macrophages, les fibroblastes, les oeufs de certains invertébrés marins, les amibes...

Beaucoup de fonctions vitales de la cellule sont liées à sa contractilité comme la locomotion, la phagocytose, la pinocytose, l'exocytose ou la mitose.

#### I- LE MOUVEMENT AMIBOÏDE

Parmi le matériel vivant utilisé, les amibes connaissent un engouement notable puisqu'elles présentent, par nature, les caractéristiques essentielles du mouvement amiboïde.

Celui-ci peut être défini comme un déplacement de la cellule, partielle ou entière, résultant d'un courant cytoplasmique provoqué par une contraction interne.

Les premières théories du mouvement amiboïde font appel à une très grande diversité de structures hypothétiques. Pour mémoire, citons la théorie réticulaire (66), la théorie granulaire (7) et la théorie des gouttelettes (10). Puis vint le tour de la théorie des tensions de surfaces (79) (46) qui résista plus longuement que les précédentes, plus éphémères, mais qui fut à son tour abandonnée (11).

Par la suite, en se basant sur le concept de structure colloïdale du cytoplasme, des chercheurs purent élaborer des théories établies sur un changement de l'équilibre entre deux états cytoplasmiques: le gel et le sol (77) (124).

### 1. Théorie de MAST.(106)

MAST soutenait la théorie de la contraction du tube ectoplasmique (Fig. 1).

C'est la contraction de la couche de gel ectoplasmique à l'arrière de l'amibe qui pousserait le sol endoplasmique, plus liquide, antérieurement. Celui-ci gélifierait de nouveau au bout du pseudopode émis.

Un changement dans la consistance du cytoplasme, c'est-à-dire un cycle gel-sol-gel, permettrait de produire la force motrice. L'énergie requise pour le mouvement, dérivée de l'ATP, serait générée dans la queue ou uroïde de l'amibe, provoquant ainsi la contraction du gel (53).

Lorsque l'on a établit que le cytoplasme pouvait se contracter, même après avoir été extrait de la cellule, cette théorie a été beaucoup moins en vogue sans être, toutefois, complètement écartée (62) (5).

### 2. Théorie d'ALLEN.(2) (3)

La théorie de la contraction frontale ou "contraction en fontaine" explique le mouvement amiboidé comme un flux de l'endoplasme qui se contracterait à l'avant du pseudopode (Fig. 2).

Cette contraction dans la "zone en fontaine" provoquerait une

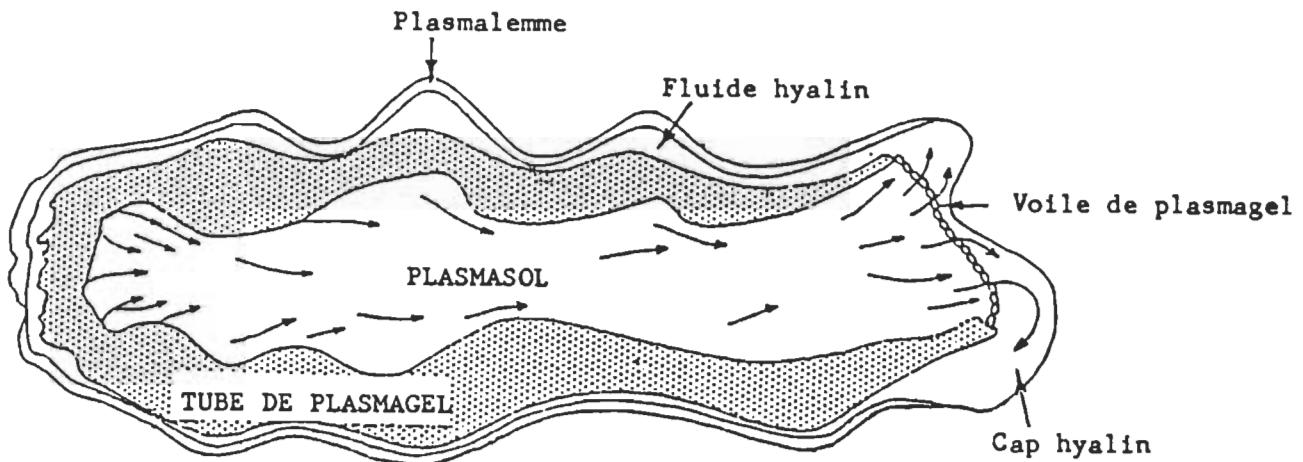


Figure 1. Diagramme illustrant la théorie de MAST.

La pression exercée par la contraction du tube de plasmagel entraîne une progression du plasmol antérieurement. (MAST, S.O.: J. Morph. 41: 347-425. 1926.)

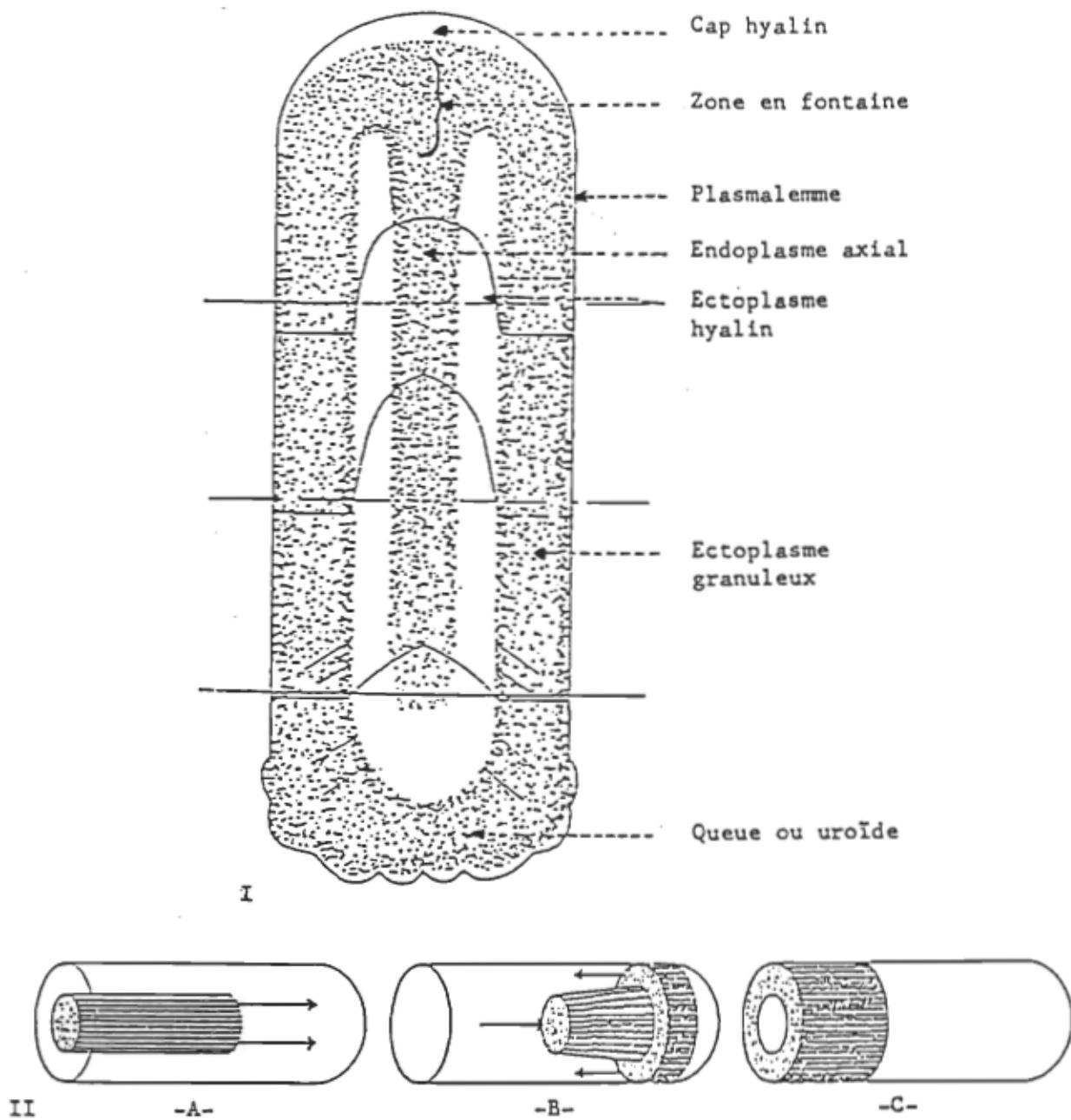


Figure 2. Diagrammes illustrant la théorie de la contraction en fontaine.

I. Diagramme d'une amibe.

II. Illustration de la théorie:

-A- Le cylindre d'endoplasme est poussé en avant.

-B- Ce cylindre subit une éversion dans la zone en fontaine.

-C- Tout l'endoplasme est éverti.

(ALLEN, R.D.: Exp. Cell Res. 8:17-31. 1961.)

"aspiration" de l'endoplasme postérieur qui subirait une éversion, suivie d'une transformation en tube ectoplasmique. A l'arrière, une transformation gel  $\rightarrow$  sol permettrait de reconstituer l'endoplasme.

Pour élaborer cette théorie, l'auteur a pris en considération un grand nombre d'expériences portant sur des mesures de rigidité du tube ectoplasmique (106), sur le rôle de ce dernier dans le maintien de la forme du pseudopode (103), sur les mesures de vitesse du courant endoplasmique (107) et sur la contractilité du cytoplasme (5).

Les théories du mouvement amiboïde que nous avons jusqu'ici évoquées n'étaient basées que sur des observations de cellules et des mesures physicochimiques. Aucun support moléculaire n'était disponible pour étayer ces modèles.

Après la découverte, sur des coupes minces d'amibes, de filaments (82) (114) (115), caractérisés biochimiquement et identifiés comme de l'actine et de la myosine (25) (26) (113) (135) (138) (164), des théories furent nouvellement élaborées, ou modifiées.

### 3. Théorie de RINALDI et BAKER (143)

Cette théorie tente d'établir une corrélation entre la contraction musculaire (75) (76) et le mouvement amiboïde, par l'intermédiaire des "filaments glissant." (Fig. 3).

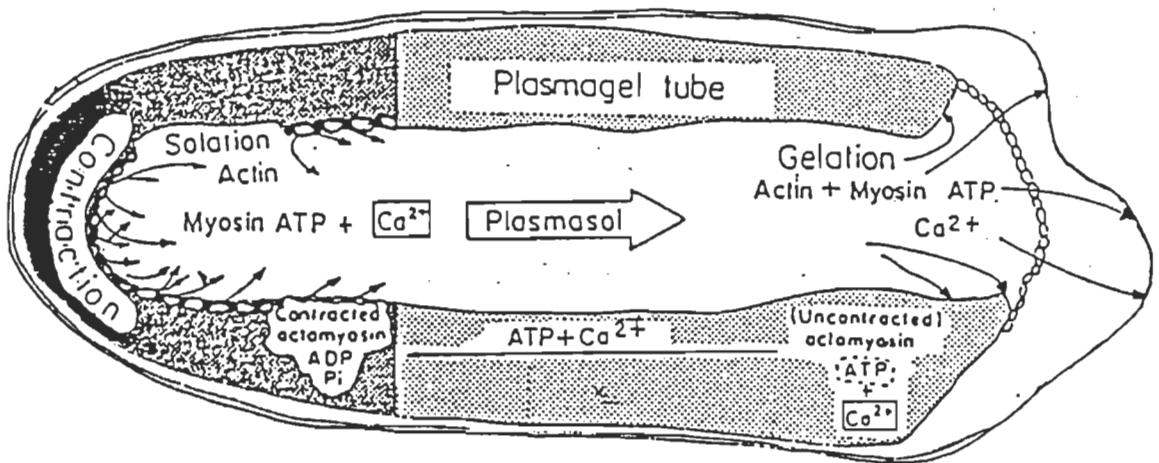


Figure 3. Diagramme illustrant la théorie de RINALDI-BAKER.

-Dans la région antérieure de l'amibe, la gélation est produite par l'actine et la myosine-ATP qui se combinent pour former de l'actomyosine et de l'ATP.

-La contraction se produit dans la partie postérieure du tube de plasmagel, localisée dans l'uroïde. L'actomyosine non contractée et l'ATP se transforment, sous l'influence du calcium, en actomyosine contractée, en ADP et Pi. Il se produit un raccourcissement du tube de plasmagel qui exerce une pression sur le plasmasol.

-A l'interface du plasmagel et du plasmasol se produit la solation, qui transforme l'actomyosine contractée en actine et myosine-ATP, le calcium étant lié.

(RINALDI, R.A.; BAKER, W.R.: J. Theoret. Biol. 23: 463-474. 1969.)

On retrouve, dans ce modèle, un tube de plasmagel ou tube ectoplasmique précédé d'une zone où s'effectuerait la contraction. Dans l'uroïde de l'amibe, le complexe actomyosine en présence d'ATP et d'ions calcium se contracterait, entraînant une hydrolyse de l'ATP et une poussée du plasmasol, ou endoplasme, vers l'avant. A l'interface des deux états cytoplasmiques, le plasmagel contracté se "solifierait" en actine et myosine-ATP, le calcium étant inactivé. Cette "solation" favoriserait un glissement des filaments des deux protéines majoritairement impliquées. A l'avant du pseudopode, la formation de plasmagel ou "gélation" serait effectuée par la combinaison de l'actine et de la myosine-ATP en complexe actomyosine, sous le contrôle d'ions calcium; l'ATP étant lié, donc inactivé.

Cette étape se déroulerait juste au dessous de la membrane plasmique, produisant ainsi un "tamis hyalin" précédant la formation du cap hyalin, presque toujours observée lors de l'émission d'un pseudopode.

#### 4. Théorie de la contraction corticale

En utilisant la microinjection de substances interférant, in situ, avec l'actine d'Amoeba proteus, comme la DNase I (177), la phalloïdine (161) ou l'actine fluorescente (74), le groupe de STOCKEM a obtenu, en microscopie électronique, des résultats lui permettant d'élaborer une nouvelle théorie (Fig. 4).

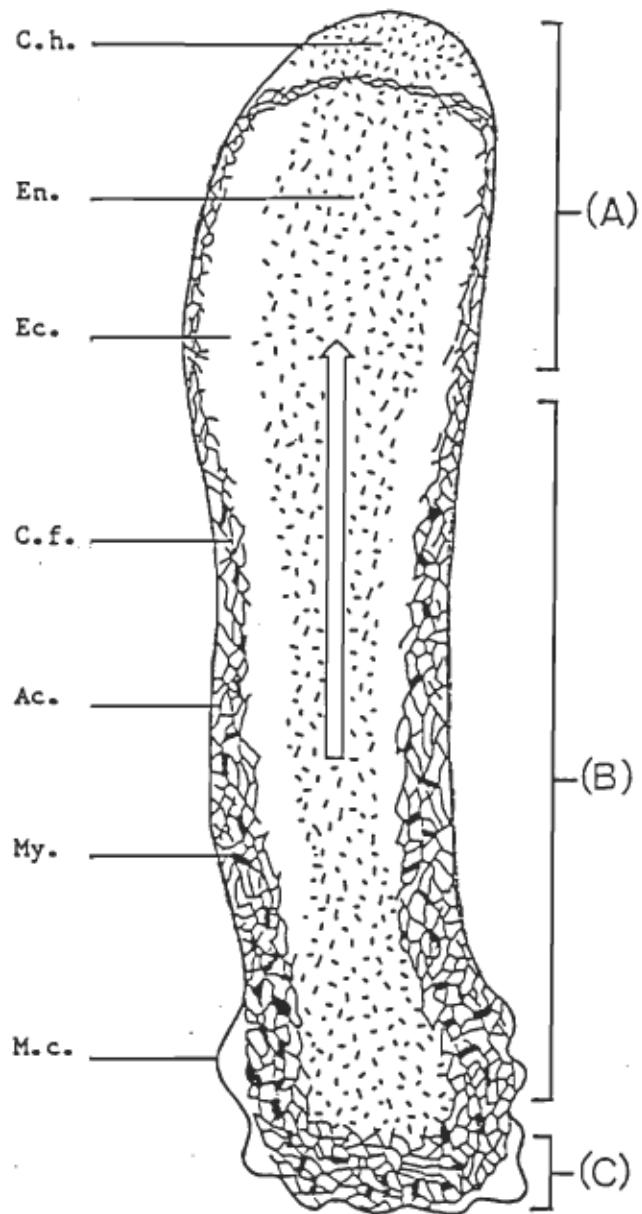


Figure 4. Diagramme illustrant la théorie de la contraction corticale chez Amoeba proteus.

A: Zone de formation de la couche filamenteuse.

B: Zone de contraction de la couche filamenteuse.

C: Zone de désagrégation de la couche filamenteuse.

C.h. Cap hyalin. C.f. Couche filamenteuse corticale.

En. Endoplasme. Ac. Filaments fins d'actine.

Ec. Ectoplasme. My. Filaments épais de myosine.

M.c. Membrane cytoplasmique.

(STOCKEM, W. et coll: Cell Tissue Res. 221: 505-519. 1982.)

Selon ces auteurs, il se produirait des contractions locales de la couche filamenteuse, sous-jacente à la totalité de la membrane cytoplasmique. Ces contractions seraient surtout produites dans la région de l'uroïde ou des pseudopodes en rétraction, provoquant ainsi un courant cytoplasmique. Cette couche filamenteuse serait composée d'actine et de myosine dont le degré de polymérisation et l'organisation spatiale varieraient selon leurs localisations au sein de l'amibe.

D'autre part, cette couche servirait à stabiliser la membrane plasmique entre la région postérieure, où naît la contraction, et la région antérieure où, sous l'influence de la pression créée, le pseudopode est émis.

Enfin, un "relâchement" localisé de cette couche corticale permettrait une déstabilisation de la surface submembranaire permettant, dans cette zone, l'expansion du cytoplasme sous la forme d'un pseudopode.

Le groupe de GREBECKI a montré, à l'aide de stimulations lumineuses, que la couche corticale filamenteuse était, chez Amoeba proteus, impliquée activement dans l'initiation et la direction du mouvement amiboïde; des observations de l'ultrastructure de l'amibe complètent et confirment les résultats du groupe allemand (59) (60) (61).

Toutes les études qui ont été réalisées pour élaborer les quelques théories que nous avons évoquées jusqu'ici avaient, comme support expérimental, principalement deux amibes: Amoeba proteus et Chaos chaos (Chaos carolinensis).

Nous allons aborder maintenant une hypothèse qui s'inspire, en

outre, de résultats d'expériences réalisées sur des extraits bruts de cytoplasme d'amibes et sur des extraits qui en sont partiellement purifiés.

5. Théorie de la "solation-contraction" couplées.(27) (68) (163) (166) (167).

TAYLOR et ses collaborateurs ont étudié, particulièrement, l'influence de la concentration d'ions  $\text{Ca}^{++}$  et du pH sur des extraits cytoplasmiques d'amibes telles que Dictyostelium discoideum, Chaos carolinensis ou Amoeba proteus (164) (165).

D'autre part, ces chercheurs ont analysé le rôle de ces deux facteurs dans des modèles partiellement purifiés de cytoplasme d'amibes, en présence ou en absence de myosine (28). Parallèlement, des études biochimiques ont permis d'isoler, de purifier puis de caractériser les protéines majeures du cytosquelette impliquées dans le phénomène de motilité: l'actine et la myosine (20) (88) (174); enfin, un certain nombre d'"actin-binding" protéines ont été isolées et leurs rôles étudiés (29) (42) (68).

Il ressort de toutes ces études un certain nombre de conclusions.

- Le gel, composé de filaments d'actine liés par une ou plusieurs "actin-binding" protéines, est une composante structurale du cytoplasme qui, dans sa partie la plus rigide, s'oppose à une contraction.
- Le gel peut être partiellement "solifié" par dissociation des fila-

ments d'actine reliés et/ou par raccourcissement de ces filaments. Ce gel, alors en partie relâché, ne peut plus s'opposer à la contraction et permet de transmettre la tension contractile.

- La contraction est initiée sélectivement dans une région où le gel est partiellement relâché (solation).
- Le processus gel  $\rightarrow$  sol  $\rightarrow$  contraction est "autodestructeur" car une fraction des filaments contractiles est dépolymérisée et va rejoindre le pool des protéines monomériques solubles.

Cette théorie moléculaire de la contractilité peut être décrite comme suit (Fig. 5): Les liens qui permettent au gel d'être cohérent peuvent être dissociés localement (solation). Ce nouvel état permet le glissement des filaments libres d'actine pendant la contraction, en présence ou non de myosine. Les filaments d'actine étant encore liés à des zones gélifiées adjacentes, il se produit un rapprochement de ces dernières. Ainsi, la solation et la contraction sont couplées. Les deux états du cytoplasme (le sol et le gel), et par conséquent la contraction, sont régulés par le pH et/ou la concentration d'ions  $\text{Ca}^{++}$  (167).

En ce qui concerne l'application de cette hypothèse au mouvement amiboïde, les auteurs envisagent une théorie où une contraction de l'uroïde serait initiatrice du courant cytoplasmique. En effet, à cet endroit, une "solation" partielle du gel d'actine permettrait un rapprochement des filaments et une contraction du complexe actomyosine, le tout étant déclenché par une élévation de la concentration du calcium et/ou du pH.

D'autre part, une contraction "frontale" se produirait dans le pseudopode

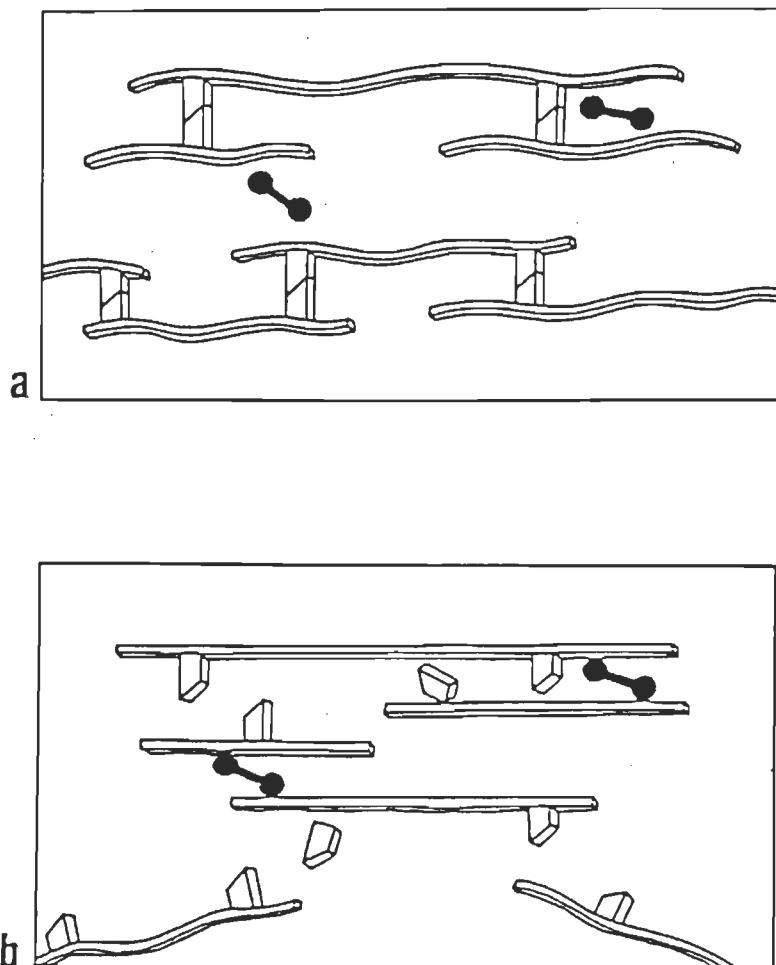


Figure 5. Diagrammes illustrant la théorie de la solation-contraction couplées.

- A pH 6,8 et avec une concentration en calcium libre 0,05 micromolaire, en présence ou non de myosine, la gélation se produit et la contraction est inhibée. La résistance à la contraction est extensive car le gel est constitué de filaments d'actine pontés. Ces filaments ne peuvent donc pas glisser.
- Si le pH devient supérieur à 6,8 ou si la concentration en calcium libre dépasse 0,6 micromolaire, en présence de myosine, les pontages sont dissociés, libérant les filaments d'actine. Ceux-ci peuvent alors glisser librement, après interaction avec la myosine. Il en résulte un raccourcissement dû à la contraction. Dans les microdomaines dépourvus de myosine, la solation est provoquée par les mêmes variations ioniques. (HELLEWELL, S.B. et TAYLOR, D.L.: J. Cell Biol. 83: 633-648.1979.)

émis, ce dernier étant le site du contrôle de la direction du mouvement.

De nombreux scientifiques ont effectué des expériences pour étudier les effets de certains facteurs sur le courant cytoplasmique, sur l'émission, ou sur la rétraction de pseudopodes d'amibes de différentes espèces.

En particulier l'ATP, le calcium et le magnésium ont été étudiés, par microinjection, sur des cellules intactes (6) (80)(87) (116) (162) ou des extraits cellulaires (68) (135) (138) (168) (179).

Il ressort de la somme de travaux effectués, en vue de comprendre et d'expliquer le mouvement amiboïde, quelques conclusions.

- a. La contractilité cytoplasmique est à la source du travail mécanique engendrant les courants cytoplasmiques et la locomotion cellulaire, avec l'ATP comme source endogène d'énergie.
- b. L'actine et la myosine sont impliquées dans la contractilité cytoplasmique, ce qui est la base du mouvement amiboïde.
- c. L'actine interagit avec d'autres protéines du cytosquelette et ces interactions sont soumises à une régulation très stricte (72) (85).
- d. Les corrélations entre la structure du cytoplasme et sa contractilité ne sont pas encore complètement élucidées, en particulier par le manque d'informations concernant la localisation de la myosine dans les cellules.
- e. Les observations ultrastructurales des cellules choisies pour l'étude de la motilité cellulaire sont, et doivent rester complémentaires des expériences pratiquées sur des extraits cellulaires; chacune des deux approches ayant ses propres limites, tant du point de vue technique que de

l'interprétation.

Les progrès dans l'exploration ultrastructurale des cellules mobiles ont été ralentis par les difficultés rencontrées pour observer, sur des coupes minces, l'organisation du cytosquelette. Les techniques de fixation en microscopie électronique ne permettent pas toujours de relier les conclusions biochimiques aux observations cytoplasmiques, et de reconstituer ainsi les différentes étapes du mouvement amiboïde.

Nous l'avons vu antérieurement, ce sont de grosses cellules (A. proteus et Chaos carolinensis) qui sont utilisées fréquemment pour les études morphologiques, les expériences de microinjection ou comme support des théories du mouvement amiboïde.

Peu d'investigations, en microscopie électronique, ont été entreprises, comparativement, sur des amibes plus petites, telle qu'Acanthamoeba castellanii. Cependant, chez cette dernière, beaucoup d'expériences biochimiques ont permis de connaître les caractéristiques des principales protéines contractiles.

## II. BIOCHIMIE DE LA MOTILITE CHEZ ACANTHAMOEBA CASTELLANII (84)

### 1. L'actine

C'est en 1971 que cette protéine a été isolée pour la première fois chez Acanthamoeba castellanii (179). Celle-ci présente environ 6% de différence dans sa composition en acides aminés avec l'actine de muscle squelettique (37), ce qui lui confère une alcalinité plus grande (54). Le poids moléculaire de l'actine de l'amibe est, comme celui de l'actine musculaire, de 42.000 d. et elle peut, elle aussi, former des

filaments de 7nm.

A faible force ionique, et en présence d'ions  $Mg^{++}$ , ces filaments peuvent activer l'ATPase de la H.M.M. de lapin, ce qui a permis d'en localiser et d'en visualiser quelques uns in vivo (138). L'activation ATPasique de la myosine par la F-actine de l'amibe est beaucoup plus lente que celle réalisée par l'actine musculaire (56), mais cette activation peut être augmentée par l'adjonction de tropomyosine musculaire, en présence d'ions  $Mg^{++}$  (54). Il faut ici noter que l'effet de la tropomyosine musculaire obtenu sur la F-actine de l'amibe est l'opposé de l'effet produit sur la F-actine musculaire. Enfin, en présence de myosine musculaire et d'une forte force ionique, l'actine d'Acanthamoeba castellanii peut former un complexe d'actomyosine.

## 2. Les myosines

Il existe, chez Acanthamoeba castellanii, deux types de myosines qui en manifestent certaines caractéristiques.

- Une activité ATPasique déclenchée par le  $K^+$ -EDTA, le  $Ca^{++}$  ou les ions  $Mg^{++}$  (par ordre décroissant), en absence d'actine;
- Une grande affinité de liaison pour la F-actine;
- Une activation de leur propriété  $Mg^{++}$ -ATPasique par la F-actine.

La première myosine à avoir été identifiée (134), isolée (136) puis caractérisée (137) possède deux isoenzymes, la myosine IA et la myosine IB. Chacune, de poids moléculaire d'environ 150.000 d., se présente sous forme globulaire, sans région caudale apparente. Elles comprennent

une chaîne lourde et une chaîne légère et n'ont pas la capacité de former des filaments par homo ou hétéro-association (104). Ces deux isoenzymes diffèrent entre elles par leur cinétique enzymatique dépendante de l'actine (1).

La seconde myosine, appelée myosine II, a environ 500.000 d. de poids moléculaire et possède une conformation plus classique. En effet, elle se compose de 2 chaînes lourdes et de 2 paires de chaînes légères (22) (105) et peut former des filaments de 200nm de long mais de largeurs variables, in vitro (132).

### 3. Autres protéines de la motilité et régulation de la motilité.

Mises à part les 2 protéines majeures, l'actine et la myosine, qui sont impliquées dans la motilité cellulaire, il en a été isolé un grand nombre d'autres chez Acanthamoeba castellanii. Celles-ci jouent un grand rôle dans les systèmes de régulation de la motilité que nous allons brièvement rappeler.

Le contrôle de la motilité est effectué au niveau de l'actine et au niveau de la myosine.

En ce qui concerne l'actine, il existe trois voies de régulation du degré de sa polymérisation (30).

- La séquestration des monomères d'actine sous forme de complexes non polymérisables. C'est la profiline qui, chez l'amibe, occupe cette fonction (172).
- Le blocage ("capping") d'une extrémité des filaments d'actine.

Une "capping protein" agit de cette manière chez Acanthamoeba castellanii, en bloquant l'addition de monomères à l'extrémité de nette polymérisation du filament (78).

- Le pontage ("cross-linkage") des filaments en faisceaux ou en réseaux. Chez la cellule que nous étudions, il a été mis en évidence au moins 5 facteurs protéiniques de ce type, dont 4 gélactines (102) (105) de poids moléculaires différents, et un facteur de gélation (131).

Pour les myosines, c'est un système phosphorylation- déphosphorylation qui contrôle leurs activités. Ces réactions sont effectuées par des kinases, spécifiques ou non (23) (64) et par au moins une phosphatase (101).

Il faut noter que cette régulation est réalisée en des sites différents d'un type de myosine à l'autre, et que la même réaction chimique peut avoir des effets inverses selon la myosine impliquée. Par exemple, la phosphorylation de la chaîne lourde des isoenzymes de la myosine I entraîne une activation de l'ATPase actinodépendante, tandis que la phosphorylation de la chaîne lourde de la myosine II entraîne une inhibition de l'activité ATPasique actinodépendante (1) (101). Les systèmes de régulation des protéines contractiles, et des enzymes qui les régissent, sont étroitement dépendants de la concentration cellulaire en cations  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  et en protons (32) (64) (132).

Une des difficultés majeures rencontrées dans le traitement des cellules, en vue de leurs observations au microscope électronique à transmission, réside dans les traitements chimiques qu'elles subissent afin de conserver, autant qu'il soit possible, l'organisation structurale

du cytoplasme.

Les protéines cytoplasmiques, et en particulier l'actine, sont très sensibles aux opérations de fixation par les aldéhydes (95) (121) ainsi qu'à la postfixation par l'acide osmique (110) (129).

Il est possible d'utiliser des conditions particulières pour limiter l'effet destructeur du tétr oxyde d'osmium (temps de réaction, force ionique du milieu, pH, température), mais les résultats obtenus, en ce qui concerne les structures contractiles des amibes, n'en sont que très légèrement améliorés.

### III. PROBLEMATIQUE

La phalloïdine est une molécule naturelle extraite d'Amanita virosa, champignon vénéneux que l'on peut trouver en Amérique du Nord (182). Ce peptide bicyclique formé de 7 acides aminés (voir Fig. 6) a la propriété de se lier spécifiquement à la F-actine. Le filament est alors plus résistant contre l'action de certains agents physiques, chimiques et biochimiques qui déstabilisent l'actine tels que les ultrasons (31), la température (32), le KI (98) ou la DNase I (149).

La viroïsine est un autre peptide, monocyclique, extrait du même champignon. Cette molécule présente, comme la phalloïdine et in vitro, les mêmes propriétés stabilisatrices de la F-actine, malgré leur différence structurale (40) (Fig. 7). Récemment, il a été montré que la viroïsine présentait une efficacité plus grande que la phalloïdine pour stabiliser l'actine F in vitro (52).

Nous avons donc été amenés, en commençant ce travail, à résoudre une première interrogation:

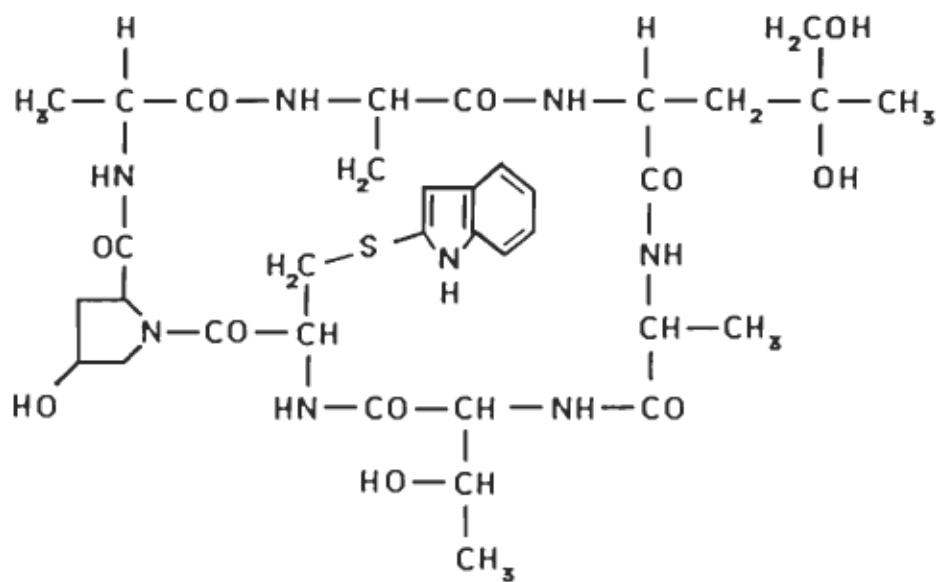


Figure 6. Formule de la phalloïdine.

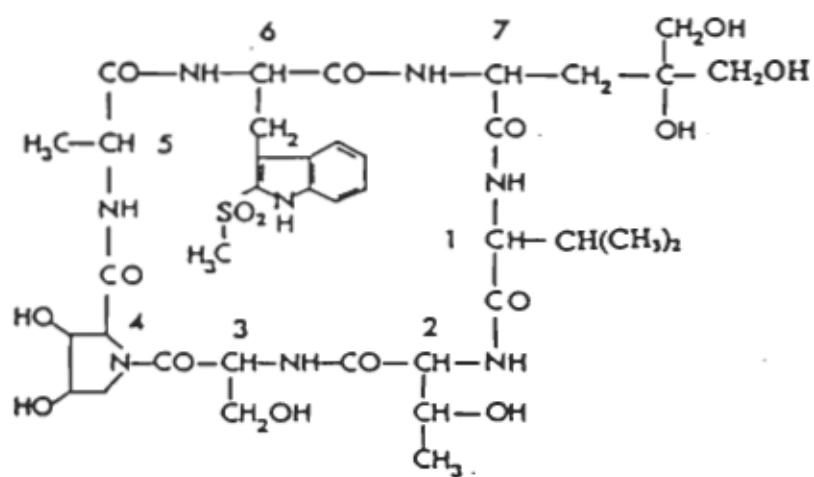


Figure 7. Formule de la virofisine.

1. La phalloïdine ou la viroïsine stabiliseraient-elles l'actine d'Acanthamoeba castellanii in vivo?

La microinjection de substances telles que la phalloïdine a été réalisée par STOCKEM dans Amoeba proteus (156) (161) (176). Il apparaît un effet de la toxine, en particulier un ralentissement du courant cytoplasmique. D'autre part, sur des coupes minces observées en microscopie électronique, on note une très nette amélioration de la conservation des filaments d'actine. Ceci a permis à l'équipe allemande de réaliser un grand nombre d'observations leur permettant d'élaborer la théorie de la contraction corticale exposée précédemment (Fig. 4). Néanmoins, cette technique, très fine, exige que l'on travaille sur un matériel cellulaire assez gros, et requiert un équipement sophistiqué.

D'autres approches ont été entreprises en vue d'utiliser la phalloïdine comme agent stabilisant soit sur le cytosquelette (154), soit sur un cytoplasme démembrané (126).

Enfin, la phalloïdine a été ajoutée lors de la fixation de cellules pour y étudier la couche filamentuse corticale (157).

Acanthamoeba castellanii est naturellement imperméable à la phalloïdine et aux autres virotoxines, comme la plupart des cellules d'ailleurs, à l'exception de l'hépatocyte (99).

Pour permettre l'entrée de la toxine dans la cellule et l'étude ultérieure de son éventuelle action sur le cytoplasme de l'amibe in vivo, nous avons choisi d'utiliser une technique de perméabilisation de la membrane cytoplasmique.

La deuxième étape de notre cheminement était alors la suivante:

## 2. Une perméabilisation vitale d'Acanthamoeba castellanii est-elle réalisable?

La perméabilisation consiste à opérer une déstabilisation douce de la membrane plasmique afin d'y provoquer l'apparition de micropores qui vont permettre la pénétration intracellulaire de petites molécules ou d'ions. Dans notre cas, il fallait nécessairement que la cellule conserve son intégrité structurale et fonctionnelle.

Les agents physiques, et surtout chimiques, utilisés pour réaliser cette perméabilisation sont variables, et cette technique a été employée avec des types cellulaires très différents comme des levures (145), des algues (171), des axones (45), des bactéries (18) ou des hépatocytes (44).

A notre connaissance, aucune amibe n'a été, jusqu'à présent, l'objet d'une telle étude, réalisée à l'aide d'une technique de perméabilisation vitale.

Les composés chimiques susceptibles de perméabiliser les cellules sont nombreux. On emploie des solvants organiques comme le toluène ou l'éthanol (10), des phospholipides (151), des chélateurs du cholestérol comme la digitonine (81) (178) (183) ou la saponine (17). Les détergents non ioniques peuvent aussi être utilisés pour perméabiliser (13) (150). Ces détergents ont surtout été utilisés dans l'étude du cytosquelette (16). Enfin, sans être exhaustif, on peut encore citer les aldéhydes (120), la force ionique du milieu (12) et le système  $\text{Ca}^{++}$  /E.G.T.A. (48) comme procédés employés pour perméabiliser des cellules.

Nous avons utilisé 2 agents perméabilisants: la digitonine et

un détergent non ionique, le Nonidet P40.

Après avoir mis un point une technique de perméabilisation vitale, nous avons entrepris l'étude de l'action de deux toxines, la phalloïdine et la viroïsine, sur l'amibe, entraînant ainsi une troisième interrogation:

3. La phalloïdine et la viroïsine ont-elles un effet, *in vivo*, sur *Acanthamoeba castellanii*, après perméabilisation?

Pour étudier une éventuelle action de ces toxines, nous avons choisi 4 techniques.

a. Les coupes minces.

Afin d'obtenir une préservation optimale de l'ultrastructure en général, et de l'actine en particulier, nous avons testé des conditions différentes de fixation. Nous nous sommes intéressés à la topographie intracytoplasmique, ainsi qu'à l'identification et à la localisation des éléments du cytosquelette des amibes, traitées ou non.

b. Coloration négative.

Nous avons réalisé, d'autre part, quelques colorations négatives de broyats cellulaires. Cette technique permet de colorer le fond d'une préparation permettant la visualisation, par contraste, des structures observables. On a ainsi pu juger, aussi bien qualitativement que quantitativement, des changements opérés sur l'actine cellulaire. D'autre part, il est possible de visualiser d'autres structures cytosquelettiques impliquées, directement ou pas, dans la motilité de la cellule comme par exemple les microtubules ou les filaments de myosine.

Il nous a paru que la microscopie optique pouvait nous apporter quelques informations complémentaires.

c. Microscopie optique à contraste.

L'observation de cellules en contraste interférentiel et en contraste de phase permet de mettre en évidence des modifications morphologiques de la cellule vivante.

d. Microscopie optique à fluorescence.

En utilisant un dérivé fluorescent de la phalloïdine, la N.B.D. phallacidine qui se fixe spécifiquement sur l'actine filamenteuse (8) (9), on peut visualiser une répartition "macroscopique" de l'actine F dans la cellule traitée.

Toutes les informations recueillies par l'examen des coupes minces et par les autres techniques choisies nous ont conduits à une dernière question:

4. Les observations réalisées traduirait-elles un effet réel des toxines sur l'amibe?

Après leur présentation, nous discuterons des résultats que nous avons obtenus; et dans la dernière partie de ce mémoire, nous tenterons de répondre aux interrogations que nous venons de formuler et qui ont été à l'origine de notre démarche dans le domaine de la motilité cellulaire.

MATERIEL ET METHODES1. Produits utilisés

- Digitonine (D58.Fisher)
- Extrait de levure (Difco 0127-01)
- Glutaraldéhyde 25% (1202 M.E.C.A. Ltd)
- N.B.D. Phallacidine (N. 354. Molecular Probes Inc.)
- Nonidet P40 (E 43 - Fisher)
- Protéose Peptone (Difco 0120-01)
- Tetroxyde d'osmium 4% aqueux (1652.M.E.C.A. Ltd.)

Tous les produits utilisés sont de pureté R.P.

2. Culture des amibes

Acanthamoeba castellanii, souche NEFF (118) est cultivée axéniquement à 28°C. Les amibes sont repiquées tous les 5 jours dans le milieu suivant, dont le pH est ajusté à 7.

|  |                      |    |
|--|----------------------|----|
| Protéose-peptone.....                  | 0,75                 | %  |
| Extrait de levure.....                 | 0,75                 | %  |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....         | 2                    | mM |
| $\text{FeCl}_3$ .....                  | 0,05                 | mM |
| $\text{CaCl}_2$ .....                  | 0,001                | mM |
| $\text{MgSO}_4$ .....                  | 1                    | mM |
| Glucose.....                           | 8,33                 | mM |
| Vit B <sub>1</sub> (Thiamine-HCl)..... | $5,93 \cdot 10^{-3}$ | mM |
| Vit H (Biotine).....                   | $1,64 \cdot 10^{-3}$ | mM |
| Vit B <sub>12</sub> .....              | $1,48 \cdot 10^{-6}$ | mM |

Le milieu est préparé pour environ 200 tubes qui sont gardés au congélateur jusqu'à la veille de leur utilisation.

### 3. Traitement des amibes par les agents perméabilisants.

Les cellules sont collectées puis centrifugées pendant 5 minutes à environ 500 g. Le culot est remis en suspension dans le tampon:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 100mM;  $\text{MgCl}_2$ , 5mM;  $\text{KCl}$ , 50mM;  $\text{pH}=6.8$ , que nous désignerons désormais comme tampon T. (109).

Le rinçage est effectué deux fois, puis les amibes sont remises en suspension et réparties en tubes. Ces cellules constitueront les témoins généraux des expériences subséquentes.

Afin d'obtenir une estimation de la reproductibilité des techniques utilisées, toutes les expériences qui vont être décrites ont été réalisées au minimum 3 fois.

#### 3.1 Perméabilisation des cellules.

##### 3.1.1 A la digitonine.

A partir d'une solution stock de digitonine à 1% dans l'éthanol absolu, on prépare dans le tampon T une solution à 0,05% de digitonine.

Les cellules sont agitées doucement avec une pipette au contact de l'agent perméabilisant pendant 2 minutes, à température ambiante. Puis, elles sont rincées 2 fois et remises en suspension dans le tampon T.

Une expérience de contrôle, où l'on a uniquement employé l'éthanol à une concentration finale équivalente à celle solubilisant la digitonine nous a indiqué que cette faible quantité d'éthanol était sans effet sur les amibes; ceci à toutes les concentrations de digitonine testées.

Des essais ont été effectués avec des concentrations de digitonine comprises entre 0,01%, et 0,2%.

### 3.1.2 Au Nonidet P40.

Comme précédemment, le culot cellulaire est remis en suspension au contact de la solution perméabilisante. Le Nonidet P40 est préparé à 0,1% dans le tampon T. Les amibes sont laissées en contact pendant 3 minutes puis rincées soigneusement trois fois avant d'être resuspendues dans le tampon T.

Des essais de concentrations comprises entre 0,05% et 0,5% ont permis de choisir la concentration optimale.

Il faut noter que le rinçage des cellules est important, et particulièrement dans le cas du Nonidet P40 qui est, on le sait, un agent très mouillant.

Toutes les cellules traitées par ces techniques serviront de témoins de perméabilisation.

## 4. Action des toxines sur les cellules perméabilisées.

### 4.1 Préparation des toxines.

La phalloïdine et la viroïsine sont extraites d'Amanita virosa et partiellement purifiées dans notre laboratoire suivant la technique de YOCUM et SIMONS modifiée par TURCOTTE et coll. (47) (173) (187) (188).

Après extraction par des solvants organiques, les fractions contenant les virotoxines sont chromatographiées sur Sephadex LH20, puis la phalloïdine et la viroïsine sont séparées par H.P.L.C.

### 4.2 Action de la phalloïdine ou de la viroïsine.

Les cellules perméabilisées à la digitonine ou au Nonidet P40 sont mises au contact d'une solution de phalloïdine ou de viroïsine

$10^{-4}$ M ou  $10^{-3}$ M préparées dans le tampon T. Le contact dure 20 minutes. Puis les cellules sont centrifugées et rincées 2 fois par le tampon T.

## 5. Préparation des cellules pour la microscopie optique.

### 5.1 Contraste de phase et interférentiel

Les différentes cellules témoins et les cellules traitées aux toxines sont montées entre lame et lamelle et observées sur un microscope Leitz-Orthoplan (objectifs Phaco.ICT). Les observations sont menées pendant 5 minutes au maximum car l'échauffement des préparations provoque des modifications morphologiques; et cela, que les amibes soient traitées ou non.

### 5.2 Microscopie à fluorescence.

#### 5.2.1 Fixation des cellules.

Les cellules sont rincées par le tampon T à 4°C. Puis elles sont fixées par l'acétone à -20°C pendant 10 minutes.

#### 5.2.2 Coloration des cellules.

Les cellules fixées sont ensuite mises au contact d'une solution à 0,14% de N.B.D. phallacidine (7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole phallacidine) (8) dans le tampon T pendant 20 minutes. Ensuite, les cellules sont rincées 3 fois pendant 5 minutes dans le tampon T pour éliminer l'excès de fluorochrome. L'observation se fait au microscope à fluorescence (objectif E.F.) entre lame et lamelle ou sur une préparation séchée à l'air.

Cette dernière technique permet une suppression partielle de la fluorescence de fond.

Des cellules perméabilisées, aussi bien par la digitonine que par le Nonidet P40, ont été mises au contact d'un mélange viroisine-NBD

phallacidine (100:1) pour évaluer la spécificité de l'effet de la toxine et du fluorochrome sur l'actine.

## 6. Préparation des cellules pour la microscopie électronique.

### 6.1 Broyats cellulaires.

Les cellules sont broyées dans le tampon T à l'aide d'un homogénéisateur Potter-Elverhjem durant 2 minutes. Une goutte de préparation est déposée sur une grille (300 mesh) recouverte de Formvar-Carbone, rendue hydrophile par 30 secondes d'exposition au plasmaglow. La goutte est ensuite aspirée par du papier filtre, laissant sur la grille un film d'homogénat.

### 6.2 Marquage à la méromyosine lourde ou H.M.M.

La myosine est obtenue à partir de muscle squelettique de lapin selon la méthode de PERRY modifiée (58) (127). La méromyosine lourde ou H.M.M. a été isolée et purifiée après digestion trypsinique de la myosine (100).

Sur la grille, on dépose en même temps que la goutte d'homogénat une goutte de H.M.M. à 0,5 mg/ml, et on laisse en contact une minute avant d'éponger l'excès avec du papier filtre.

### 6.3 Coloration négative

Sur les grilles supportant les préparations marquées ou non à la méromyosine lourde, on dépose une goutte d'acide phosphotungstique à 0,5% (pH=7) dont on élimine l'excès avec du papier filtre.

### 6.4 Coupes minces.

#### 6.4.1 Fixation à la formaldéhyde.

Les cellules sont centrifugées puis fixées pendant 30 minutes à température ambiante dans une solution de formaldéhyde 2% préparée dans

un tampon phosphate 0,1M à pH=6,8. Les cellules sont ensuite rincées 2 fois avec ce tampon avant d'être postfixées.

Pour certaines expériences, nous avons ajouté soit de la viroïdine, soit de la phalloïdine dans le fixateur, à une concentration finale de  $10^{-4}$  M, afin d'étudier une éventuelle amélioration de la fixation.

#### 6.4.2 Fixation à la glutaraldéhyde.

Les cellules sont fixées dans une solution de glutaraldéhyde à 2%, extemporanément préparée dans le tampon:  $MgCl_2$ , 10mM;  $KCl$ , 20mM; Imidazole, 10mM; pH=6,8. Cette fixation dure 20 minutes puis les cellules sont rincées 2 fois avec le même tampon.

Ici aussi nous avons testé l'action stabilisatrice de chacune des 2 toxines à  $10^{-4}$  M dans ce fixateur.

#### 6.4.3 Coupes minces.

Les cellules fixées sont postfixées par une solution d'acide osmique 0,4% dans le tampon:  $KH_2PO_4$ , 100mM;  $K_2HPO_4$ , 200mM;  $KCl$ , 50mM;  $MgCl_2$ , 5mM; pH=6.

Le traitement par l'acide osmique dure 10 minutes à 0°C. Les cellules sont ensuite lavées 2 fois par le tampon de postfixation pendant 5 minutes.

La déshydratation est réalisée dans l'acétone. Les bains des différentes concentrations (25%, 50%, 75%, 100%) durent chacun 5 minutes et on effectue deux passages dans l'acétone absolu.

L'imprégnation par la résine de SPURR (155) dure 1 heure et la polymérisation des blocs une nuit à 60°C.

Les coupes minces, obtenues au microtome dans le gris-doré, sont colorées à l'acétate d'uranyl à 4% dans le méthanol 50%, puis par le citrate de plomb à 1% (pH=12), selon la technique de REYNOLDS (142).

RESULTATS

1. Etude des cellules intactes non perméabilisées et non traitées par les toxines.

1.1 Observations en microscopie optique.

En contraste interférentiel (Fig. 8.a.) et en contraste de phase (Fig. 8.b.), les cellules montrent un cytoplasme dense où des mouvements très actifs sont visibles, entraînant les organites et le noyau. Des acanthopodes peuvent être observés fréquemment et il est parfois possible de voir un pseudopode.

1.2 Observations sur coupes fines en microscopie électronique.

Après fixation à la formaldéhyde, les cellules non perméabilisées et non traitées aux toxines présentent des formes variables et leur membrane cytoplasmique est crénélée irrégulièrement. Le cytoplasme est hétérogène et de nombreux organites et microvésicules y sont préservés (Fig. 9). Les mitochondries sont réparties uniformément dans le cytoplasme. Certains pseudopodes, parfois marqués par une affinité tinctoriale fortuite, sont constitués d'un hyaloplasme très granuleux et homogène où l'on note l'absence d'organites.

Après fixation à la glutaraldéhyde (Fig. 10), on constate que la cellule présente une ultrastructure nettement mieux préservée. Sur les coupes d'amibes, on retrouve une vacuole contractile autour de laquelle sont regroupées des mitochondries de taille et de forme variables.

Un noyau au nucléole volumineux et visible (Fig. 11.a.) et dans certains mitochondries, on décèle la présence d'un granule noir (Fig. 11.b).

Figure 8. Acanthamoeba castellanii non perméabilisée et non traitée par une toxine.

a. Amibe témoin observée en microscopie à contraste interférentiel.

On note le noyau (N) au nucléole volumineux et une vacuole contractile (V). Le cytoplasme granuleux est réparti uniformément dans toute la cellule. (x 3000.

Barre = 5 $\mu$ m.)

b. Amibe témoin observée en microscopie à contraste de phase. On retrouve les mêmes caractéristiques nucléaires et cytoplasmiques. On note la présence de nombreux acanthopodes (A) sur toute la périphérie de la cellule. (x 1660. Barre = 9 $\mu$ m.)

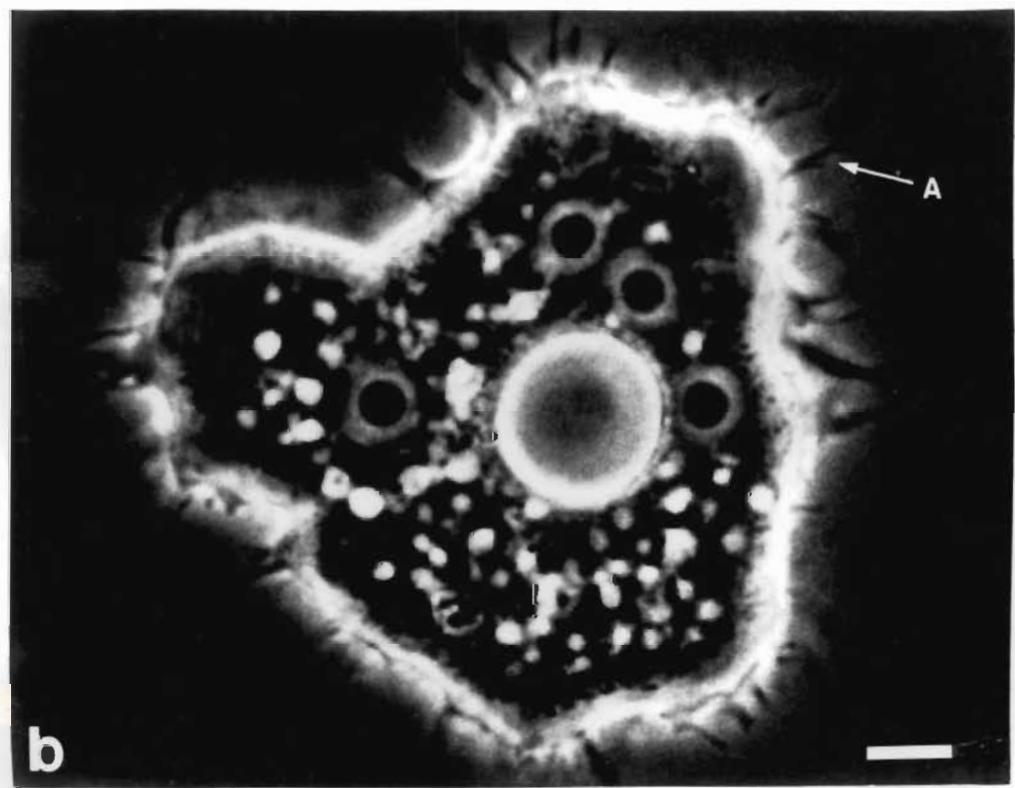
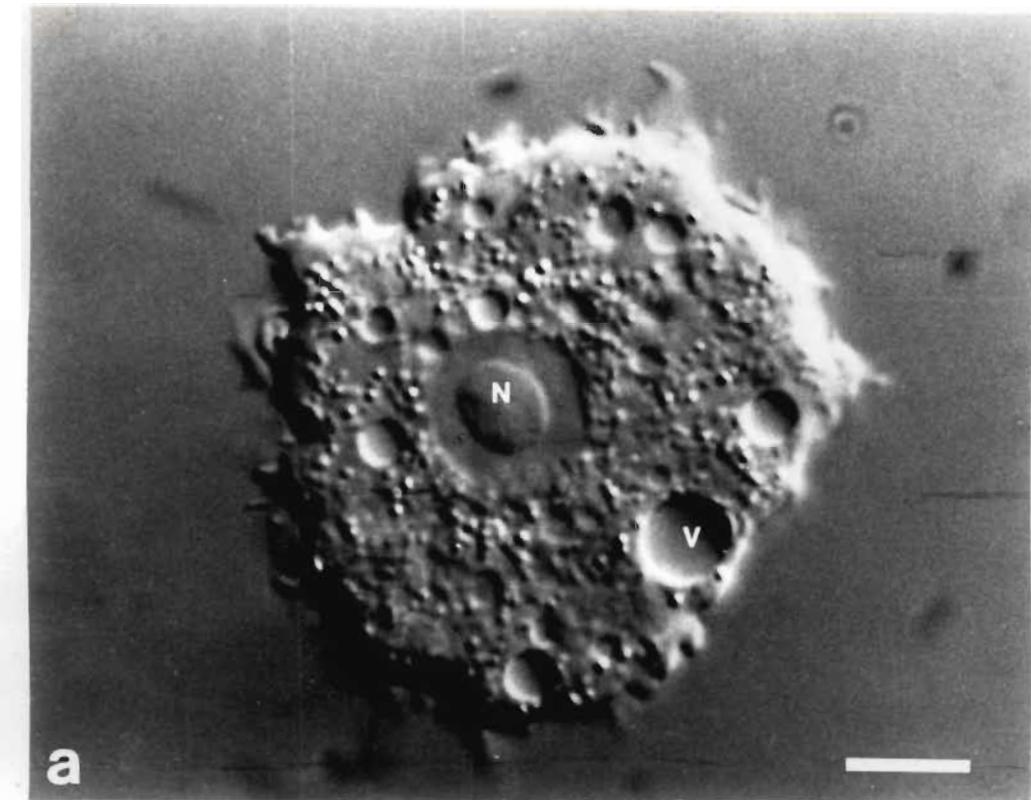


Figure 9. Ultrastructure générale d'une amibe non perméabilisée et non traitée par une toxine. Fixation à la formaldéhyde.

L'affinité tinctoriale fortuite\* d'une partie du cytoplasme permet, ici, de bien visualiser le pseudopode de cette amibe (p). Dans cette zone, on ne retrouve pas de mitochondries au sein du hyaloplasme dense et granulé.

Au centre de la cellule, une vacuole digestive (v.d.) contient quelques débris organiques. (x 9500. Barre = 1,5 $\mu$ m.)

\* Cette affinité n'est pas due au fixateur.

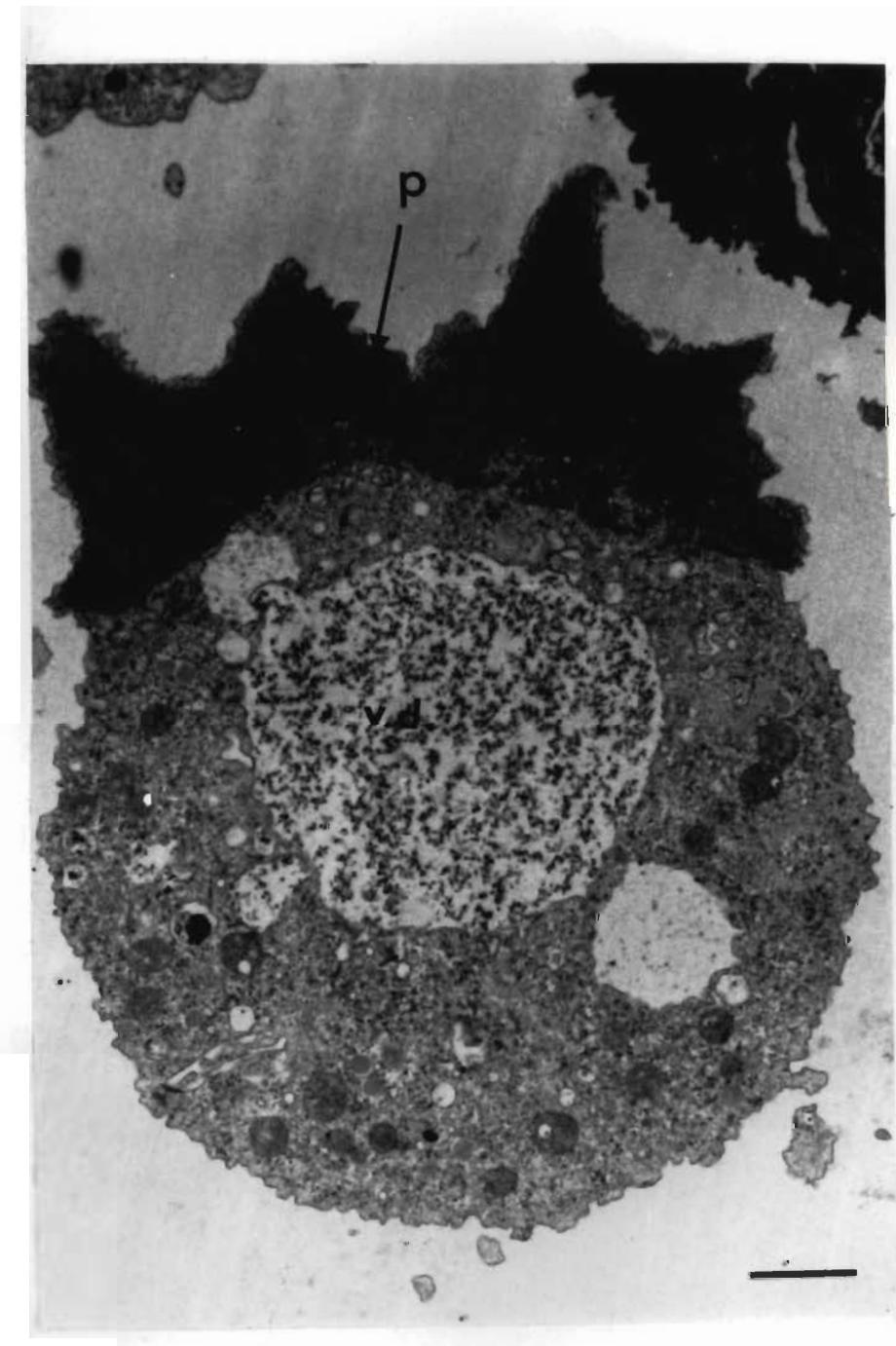


Figure 10. Ultrastructure générale d'une amibe témoin non perméabilisée et non traitée par une toxine. Fixation à la glutaraldéhyde.

La vacuole contractile (V) est nettement visible et les mitochondries (M) sont réparties dans le cytoplasme à l'exception du pseudopode(P) dans la partie supérieure.(x 1500. Barre = 1,5 $\mu$ m.)

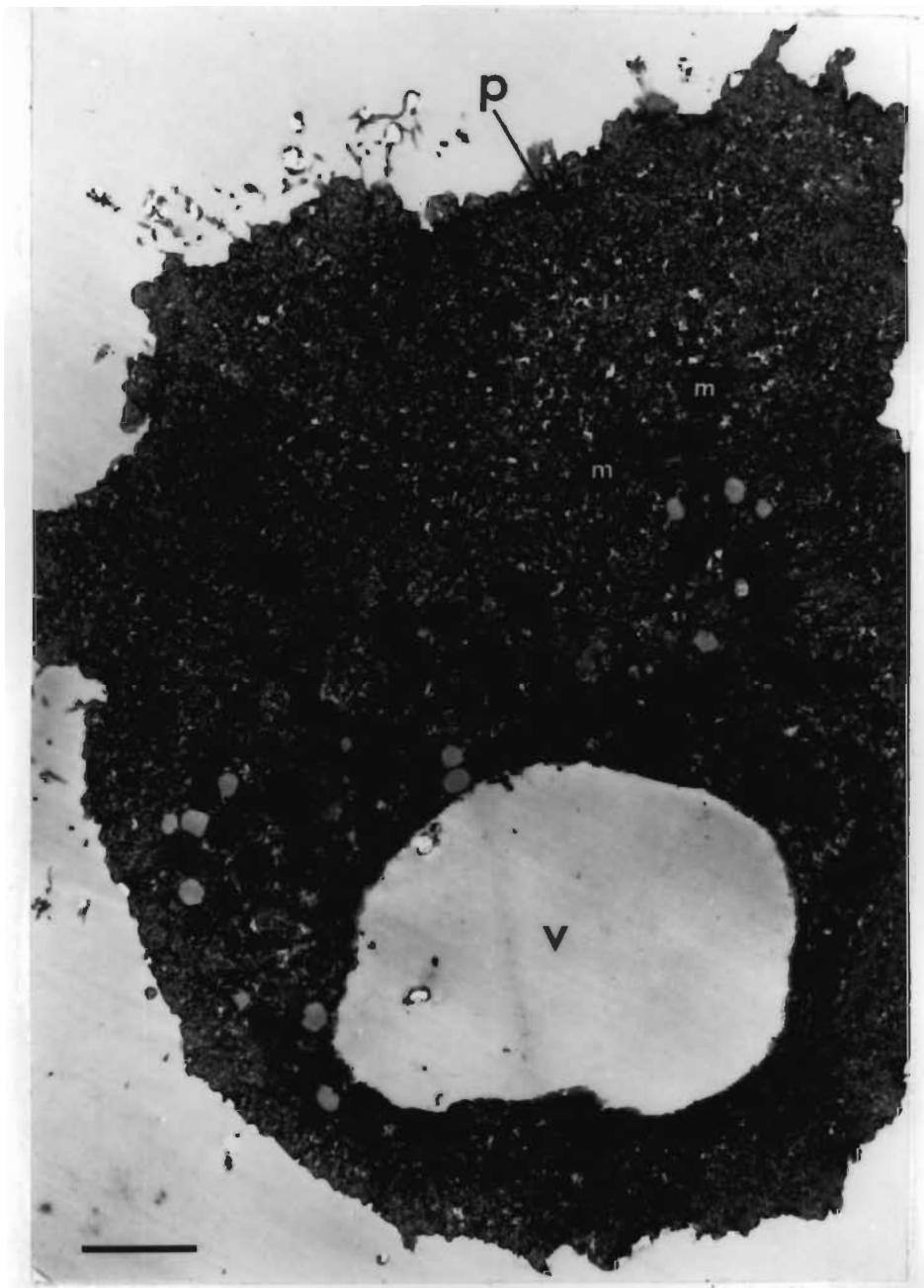
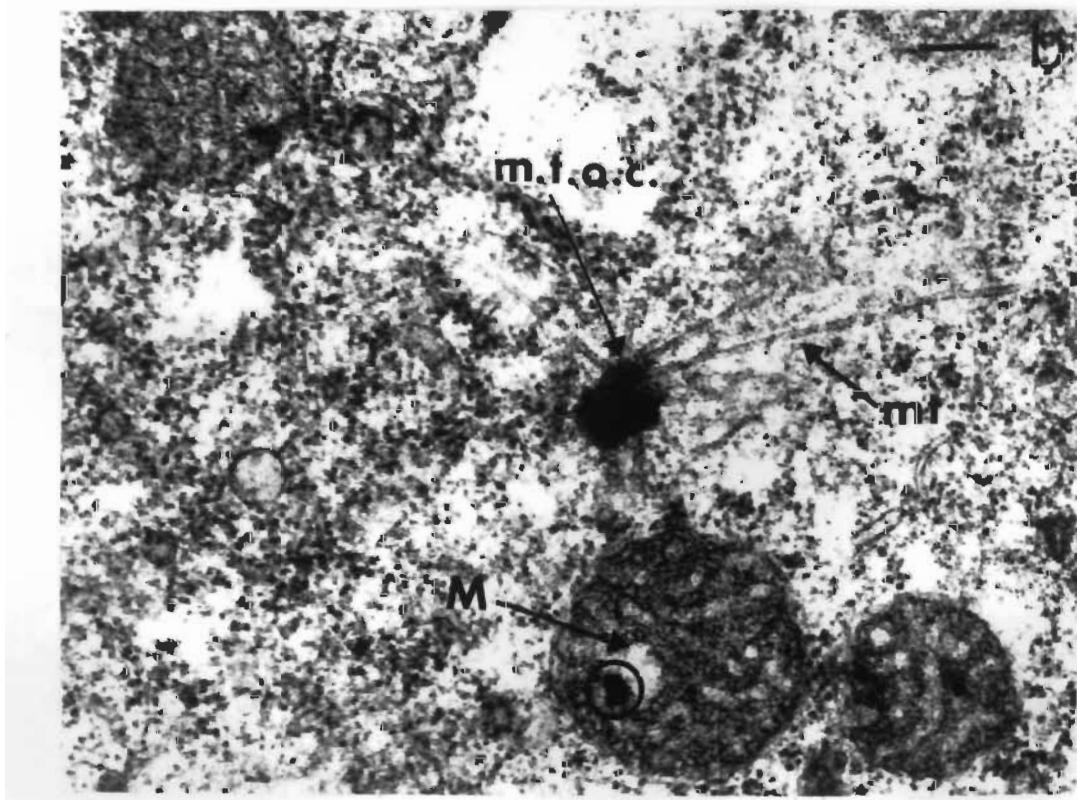
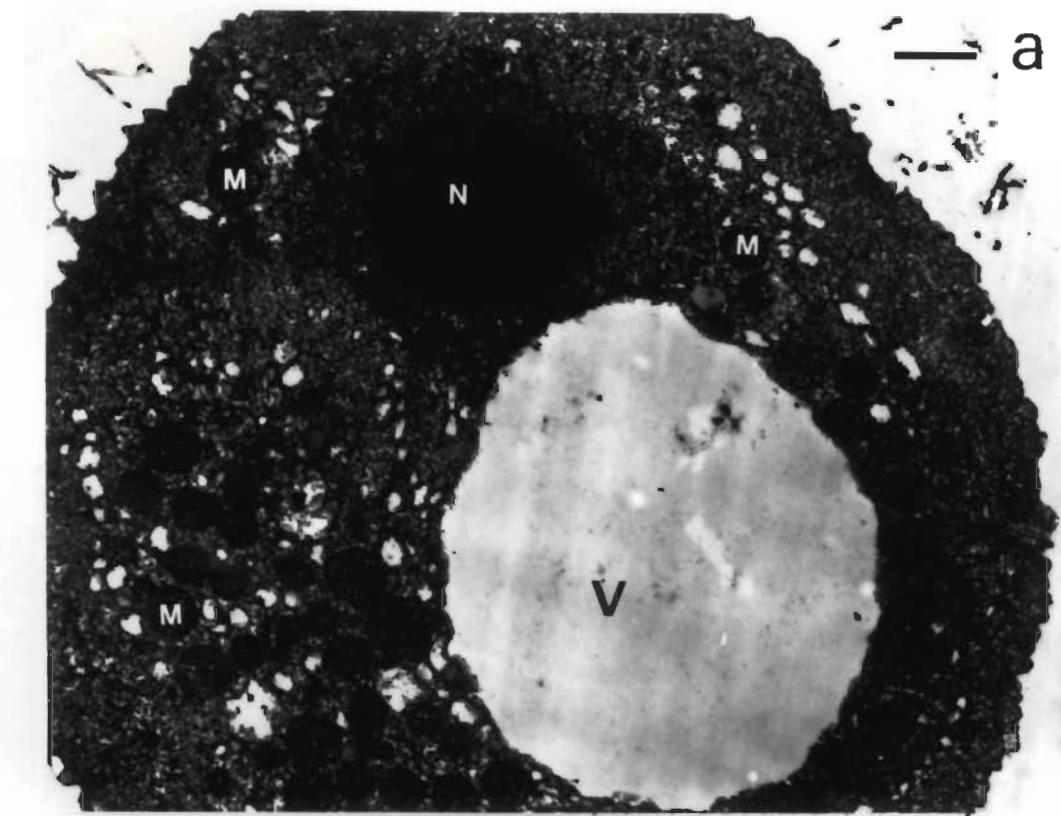


Figure 11. Ultrastructure d'une l'amibe témoin non perméabilisée et non traitée par une toxine. Fixation à la glutaraldéhyde.

a. Ultrastructure générale d'une amibe témoin. On retrouve en microscopie électronique l'organisation observée en microscopie optique: Le noyau (N) au nucléole dense, les mitochondries (M) réparties uniformément dans un cytoplasme granuleux et la vacuole contractile (V). (x 9700. Barre = 1 $\mu$ m.)

b. Détail du cytoplasme. Le fond est granulé finement par du glycogène. Une mitochondrie (M) présente une inclusion sombre (O). Un microtubule organizing center (M.T.O.C.), dans lequel sont insérés des microtubules (mt) rayonnants, est visible. Cette figure peut être interprétée comme une phase de mitose. (x 32.000. Barre = 0,1 $\mu$ m.)



Dans le cytoplasme de certains amibes, on peut mettre en évidence du matériel dense dans lequel sont insérés des microtubules rayonnants. C'est le M.T.O.C. (Microtubule organizing center) apparaissant lors de la mitose.

Chez Acanthamoeba castellanii intacte, non traitée, on n'a jamais observé de structures filamenteuses après fixation par l'un ou l'autre aldéhyde.

### 1.3 Comparaison de l'effet des 2 fixateurs.

Nos résultats montrent qu'il existe une différence de qualité de fixation entre les deux aldéhydes (Fig. 12).

La formaldéhyde est un fixateur qui pénètre très rapidement dans la cellule. L'état général de conservation est assez médiocre et nous avons constaté, au cours de toutes nos expériences utilisant ce fixateur, qu'il se produisait une extraction partielle de la matrice du cytoplasme, et du glycogène en particulier. Nous avons noté aussi la déformation de certaines mitochondries et l'altération occasionnelle des membranes plasmiques et nucléaires.

La glutaraldéhyde, qui nous semble être nettement préférable, possède des qualités de préservation de l'ultrastructure supérieures à celles de la formaldéhyde. Aucune déformation n'a été constatée. Cependant, la préservation intégrale de la masse hétérogène et dense du cytoplasme peut empêcher la visualisation de certaines structures.

En conclusion, il nous semble donc adéquat d'adopter 2 types de fixateurs, afin d'obtenir des résultats complémentaires.

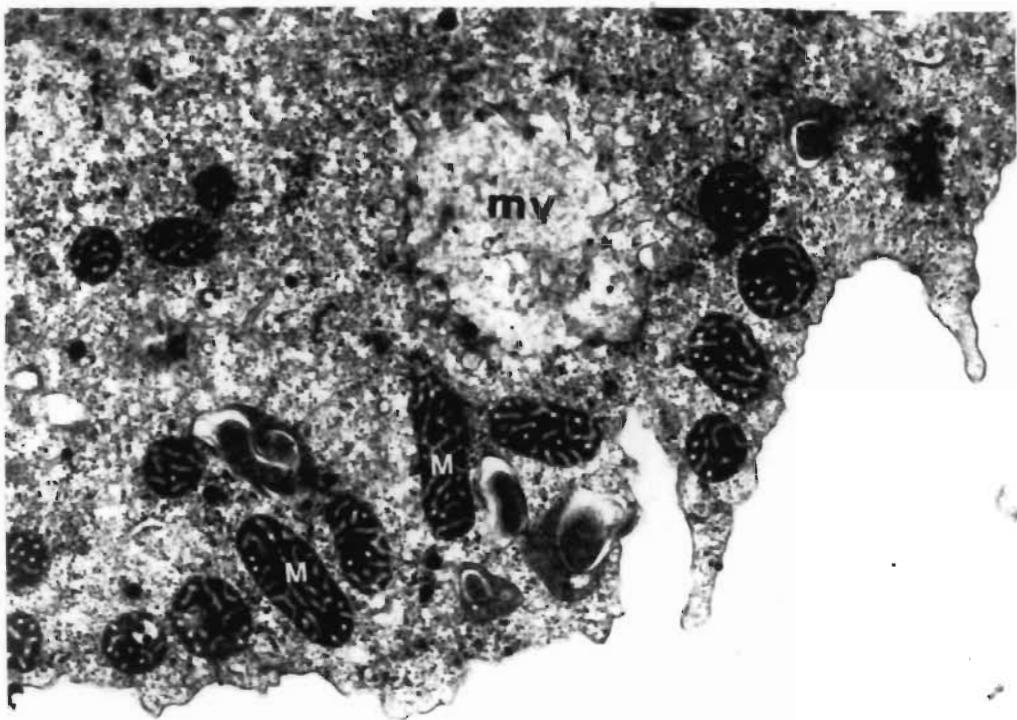
Figure 12. Comparaison de l'effet des deux fixateurs utilisés sur l'ultrastructure d'Acanthamoeba castellanii non perméabilisée et non traitée par une toxine.

a. Cellule fixée à la glutaraldéhyde.

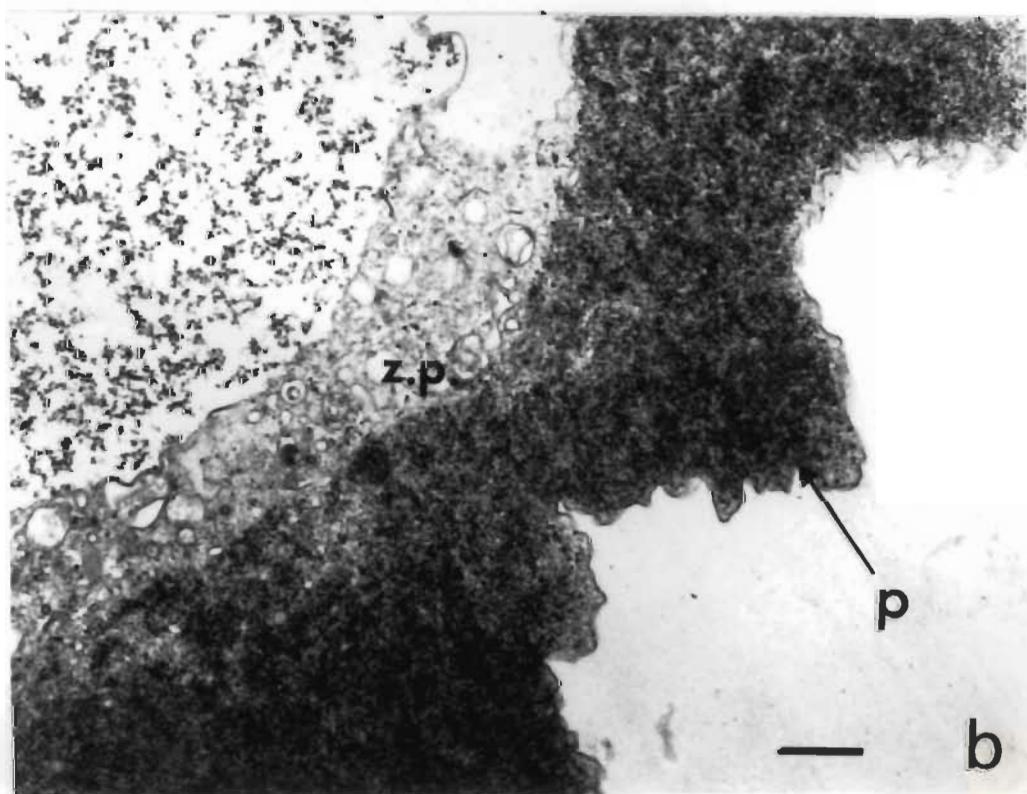
L'ultrastructure est bien conservée. On reconnaît des microvésicules (mv), des mitochondries (M) de formes variables aux crêtes contrastées et un fond cytoplasmique hétérogène. (x 12.500. Barre = 1,2 $\mu$ m).

b. Cellule fixée à la formaldéhyde.

Détail de la figure 10. L'état du cytoplasme est satisfaisant bien que légèrement plus extrait que dans les amibes fixées à la glutaraldéhyde. A la limite de la zone pseudopodiale (z.p.) et dans le pseudopode (p), aucune structure filamenteuse n'est observée. (x 25.000. Barre = 0,3 $\mu$ m.).



a



b

## 2. Mise au point de la perméabilisation des cellules.

### 2.1 Observations au microscope optique.

#### 2.1.1 Action de la digitonine.

La digitonine est un glycosyl stéroïde qui a la propriété d'interagir spécifiquement avec le cholestérol et les autres  $\beta$ .hydroxystérols de la membrane cytoplasmique. Il s'en suit une déstabilisation ponctuelle permettant à de petites molécules de pénétrer dans la cellule (34), ou à des métabolites de s'en échapper (44). Il faut, pour chaque type de cellule utilisée, déterminer une concentration adéquate d'utilisation.

Après avoir effectué des essais avec des concentrations de digitonine allant de 0,01% à 0,2%, nous avons obtenu une perméabilisation vitale de la majorité des cellules en utilisant une solution à 0,05%, dans les conditions de notre protocole expérimental.

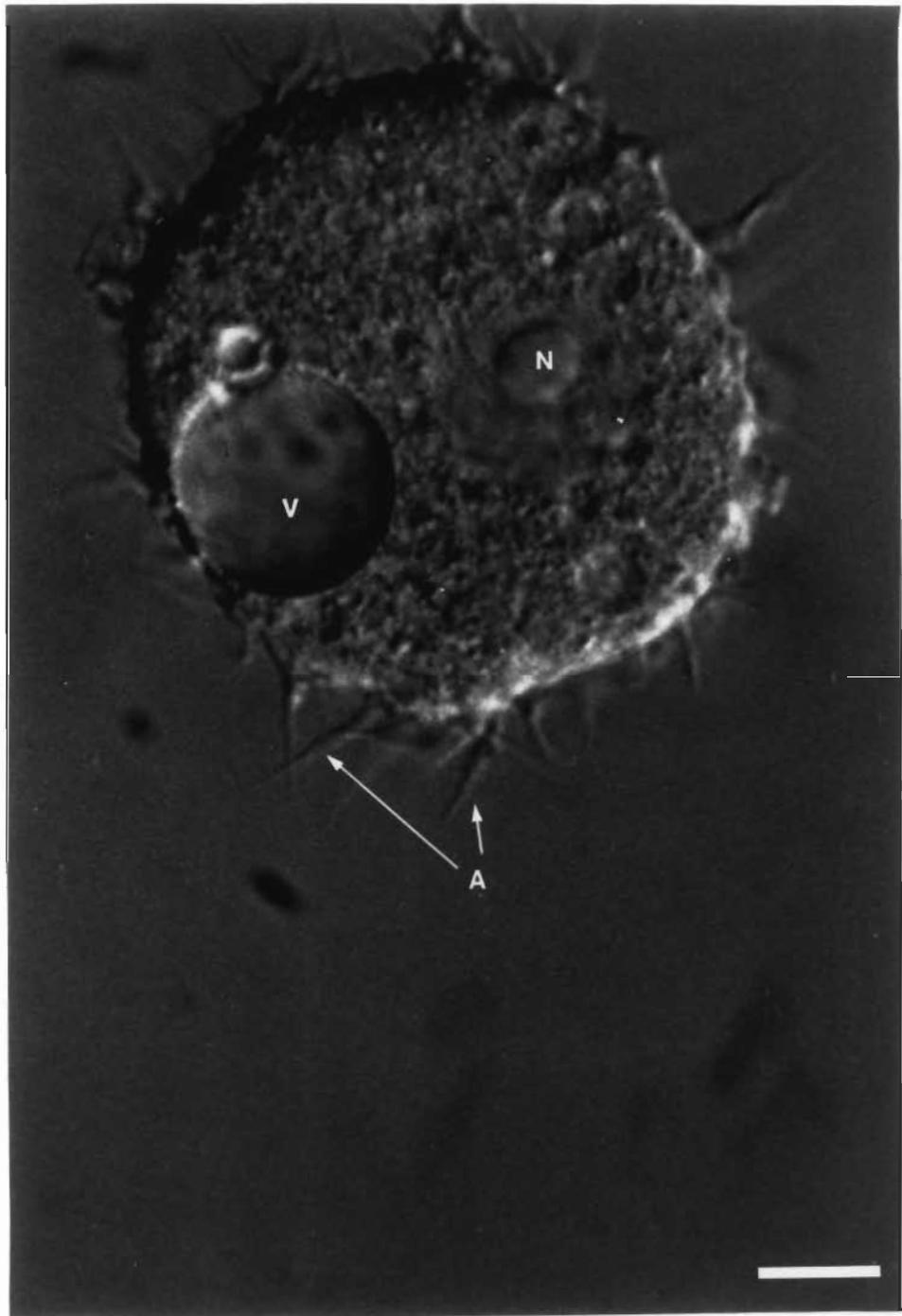
En deçà de cette concentration, toutes les cellules n'étaient pas perméabilisées, et à des concentrations plus fortes( 0,1%), beaucoup d'entre elles éclataient, laissant peu de matériel utilisable après les rinçages effectués. L'agitation, pendant la perméabilisation, permet d'obtenir une plus grande uniformisation de celle-ci.

A la concentration de 0,05%, aucune modification morphologique n'a été observée en microscopie optique par rapport aux cellules témoins non traitées par la digitonine (Fig. 13). *Acanthamoeba castellanii* présente son aspect classique, avec la présence d'acanthopodes et des mouvements cytoplasmiques vifs.

Figure 13. Amibe témoin perméabilisée à la digitonine observée en  
microscopie optique à contraste interférentiel.

Aucune modification morphologique n'a été observée.

On note la présence de nombreux acanthopodes fins (A), une vacuole contractile (V) et un noyau (N) au nucléole très visible. Le cytoplasme est uniformément granuleux. (x 800. Barre = 20 $\mu$ m.).



### 2.1.2 Action du Nonidet P40.

Le Nonidet P40 procède à une solubilisation douce des lipides membranaires (67). Il nous a fallu, ici aussi, expérimenter diverses concentrations de ce détergent non ionique avant de choisir 0,1% comme concentration de travail. À des valeurs inférieures, peu de cellules sont perméabilisées et à des concentrations supérieures (0,2%), les cellules tendent à se fragiliser et à éclater rapidement. Dans les conditions expérimentales que nous avons utilisées et de part la nature très mouillante du Nonidet P40, il n'était pas nécessaire d'agiter les amibes au contact de la solution perméabilisante.

Les observations au microscope optique à contraste de phase (Fig. 14.a.) et à contraste interférentiel (Fig. 14.b.) ne montrent aucune différence morphologique entre les amibes perméabilisées et les amibes témoins n'ayant pas subi cette opération. En effet, dans les deux catégories de cellules, nous avons retrouvé des courants cytoplasmiques très actifs et une activité normale de la vacuole contractile.

La présence d'acanthopodes, chez certaines cellules, témoigne de l'intégrité fonctionnelle des structures contractiles d'*Acanthamoeba castellanii* perméabilisée au Nonidet P40.

Dans les conditions expérimentales que nous avons décrites, les 2 détergents que nous avons utilisés réalisent une perméabilisation d'*Acanthamoeba castellanii* qui lui permet de conserver sa viabilité.

### 2.2 Observations, au microscope électronique, de coupes minces d'amibes perméabilisées à la digitonine ou au Nonidet P40.

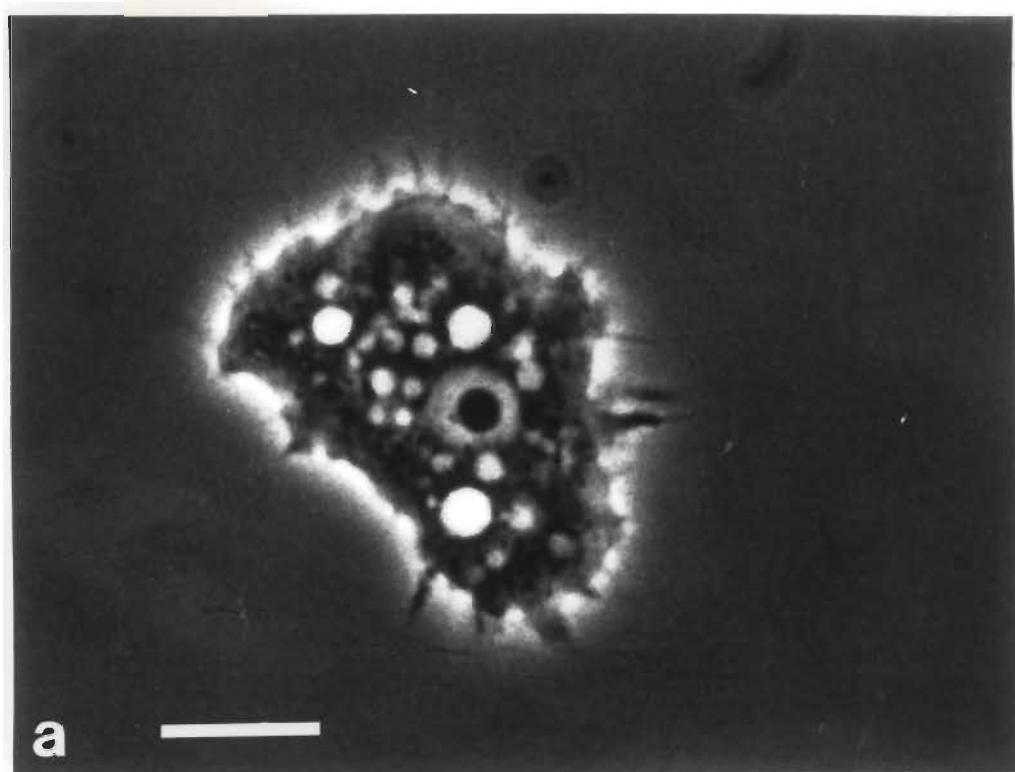
Nous n'avons pas observé de différence dans l'ultrastructure des amibes perméabilisées à la digitonine par rapport à celle des amibes

Figure 14. Observations en microscopie optique d'amibes perméabilisées au Nonidet P40.

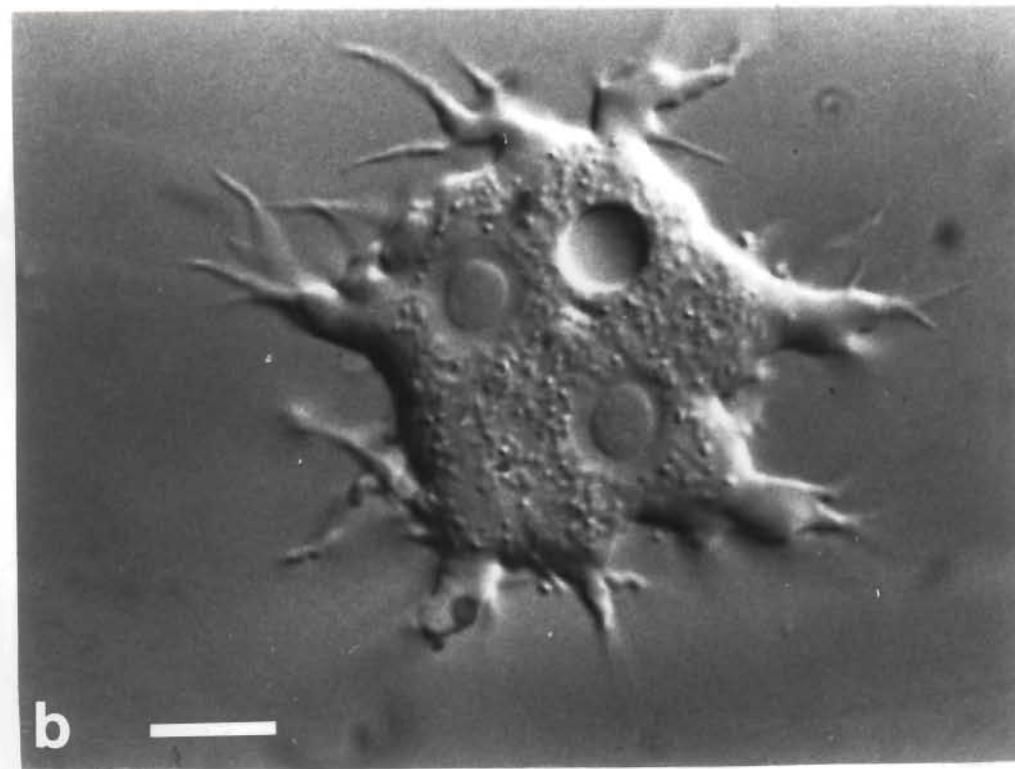
a. Microscopie à contraste de phase. (x 750. Barre = 40 $\mu$ m.)

b. Microscopie à contraste interférentiel. (x 800. Barre = 20 $\mu$ m.)

Le traitement des amibes par le Nonidet P40 n'entraîne pas, chez les amibes témoins, de modifications morphologiques. Les cellules présentent toutes les caractéristiques des amibes non perméabilisées: mouvements intracytoplasmiques, présence d'acanthopodes, émission de pseudopodes, cytoplasme granuleux et de répartition uniforme à l'exception des pseudopodes où on trouve un cytoplasme hyalin.



**a**



**b**



témoins. Le cytoplasme est granuleux et dense (Fig. 15), les mitochondries sont réparties uniformément dans celui-ci, et on note l'absence d'organites dans le hyaloplasme du pseudopode.

Les résultats obtenus avec la perméabilisation au Nonidet P40 sont équivalents à ceux obtenus avec la digitonine. Les cellules présentent une organisation interne comparable à celle des cellules non perméabilisées. On retrouve un cytoplasme hétérogène et des organites répartis dans toute la cellule à l'exception d'un pseudopode où un matériel amorphe est nettement visible (Fig. 16).

La comparaison de l'ultrastructure des cellules non perméabilisées avec celle des cellules traitées soit à la digitonine, soit au Nonidet P40, nous indique que la perméabilisation n'altère pas la morphologie de l'amibe ni son ultrastructure (émission de pseudopode, membrane cytoplasmique intacte, mitochondries réparties uniformément dans le cytoplasme, présence de microvésicules dispersées.).

Sur les coupes fines des cellules perméabilisées, aucune structure filamenteuse n'a été observée.

### 3. Etude de l'effet de toxines sur les cellules perméabilisées.

#### 3.1 Effet de la phalloïdine sur les amibes perméabilisées.

##### 3.1.1 Observations en microscopie optique.

Après perméabilisation, on constate un changement dramatique chez les cellules soumises à l'action de la phalloïdine à une concentration de  $10^{-3} M$ .

Les mouvements cytoplasmiques ralentissent puis finissent par disparaître. L'amibe émet des protusions cytoplasmiques d'aspect hyalin appelés "blebs" (Fig. 17.a.) et, finalement, on observe un regroupement

Figure 15. Ultrastructure d'une amibe perméabilisée à la digitone. Fixation à la glutaraldéhyde.

En microscopie électronique, on ne note pas de modifications de l'ultrastructure de l'amibe témoin perméabilisée. Les mitochondries sont réparties au sein d'un granuloplasme homogène. La région supérieure du pseudopode (p) contient un hyaloplasme finement granulé. (x 9700. Barre = 2 $\mu$ m.)

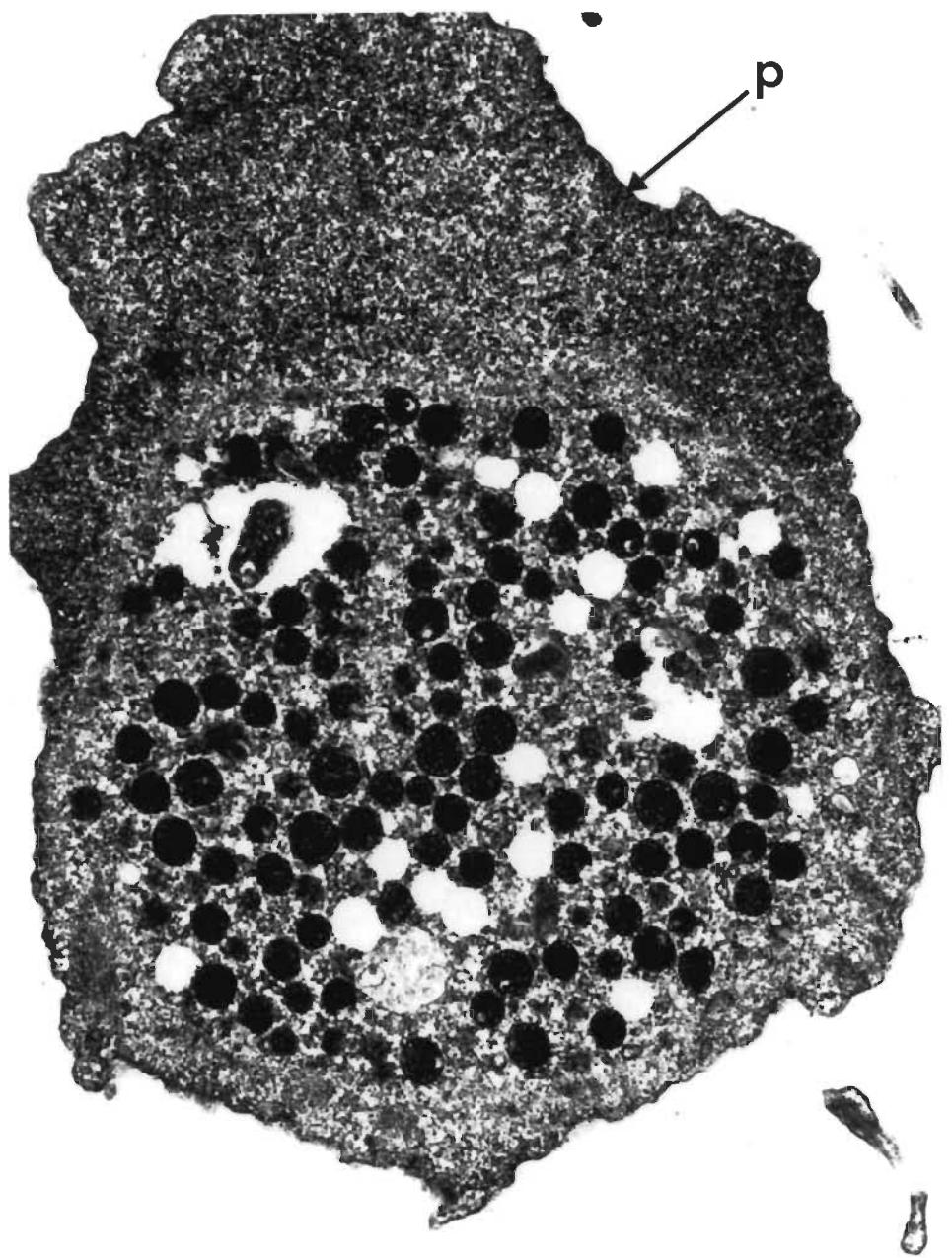


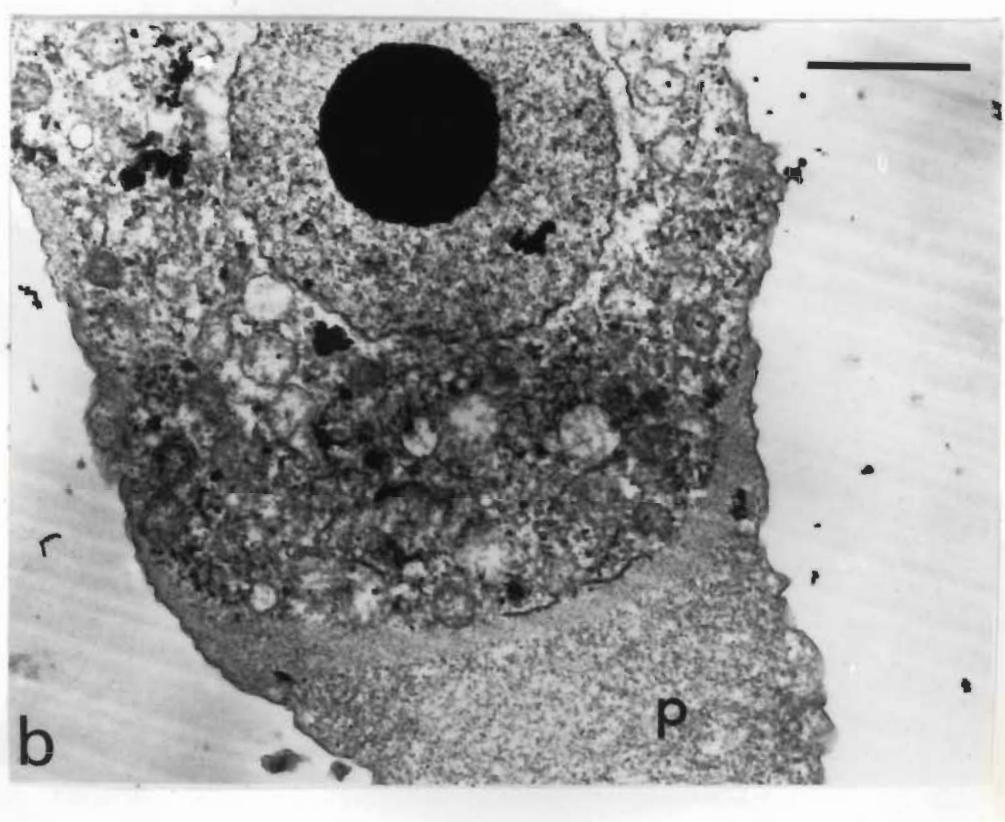
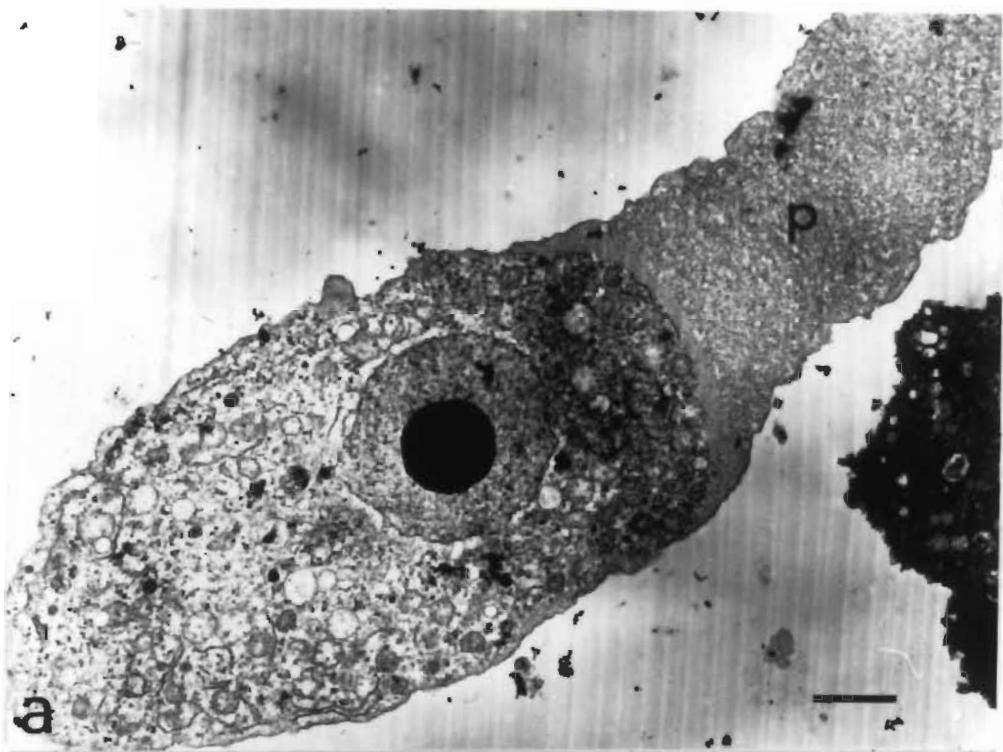
Figure 16. Ultrastructure d'une amibe perméabilisée par le Nonidet P40. Fixation à la glutaraldéhyde.

a. Vue générale d'une amibe perméabilisée.

Le noyau au nucléole très dense est visible au sein d'une substance fondamentale partiellement extraite où des organites (mitochondries, microvésicules) sont répartis uniformément. Un pseudopode (p) contient du hyaloplasme amorphe. (x 4000. Barre = 2,5 $\mu$ m.)

b. Détail de la figure précédente.

A la limite du pseudopode (p) et du cytoplasme plus hétérogène, aucune structure filamenteuse n'est visible. (x 7000. Barre = 3 $\mu$ m.)



de la masse des organites au centre d'une cellule immobile, cette masse étant cernée par une couche hyaloplasmique (Fig. 17.b.). Nous n'avons jamais observé, dans les cellules traitées par la phalloïdine, de mouvement cytoplasmique actif qui aurait pu être associé à une contraction. L'exclusion du cytoplasme hyalin précédait très souvent l'arrêt des courants cytoplasmiques. En général, l'éclatement de la cellule survenait quelques secondes après. Les premiers effets de la toxine apparaissaient environ 5 minutes après le contact et au bout de 20 minutes, pratiquement toutes les cellules étaient "mortes".

En utilisant une concentration de phalloïdine de  $10^{-4} M$ , nous avons obtenu un moins grand nombre de cellules présentant les caractéristiques que nous venons de décrire, pendant toute la durée du contact.

Les comparaisons effectuées entre les cellules perméabilisées, puis traitées à la phalloïdine  $10^{-3} M$ , et celles qui ne l'étaient pas, traitées ou non à cette même toxine, nous permettent de confirmer que la perméabilisation vitale d'*Acanthamoeba castellanii* a été réalisée. En effet, la phalloïdine produit sur la cellule perméabilisée un effet visible déjà en microscopie optique.

### 3.1.2 Coloration négative de cellules traitées à la phalloïdine.

Après coloration négative de broyats de cellules perméabilisées puis traitées à la phalloïdine, nous avons pu mettre en évidence au microscope électronique des filaments assez longs (Fig. 18.b.) pouvant être décorés par la H.M.M. (heavy meromyosin) (Fig. 18.c.). Les homogénats de cellules témoins non perméabilisées ou perméabilisées mais non traitées à la phalloïdine contenaient quelques rares filaments d'actine (Fig. 18.a.). Ceux-ci, individuels, étaient de taille irrégulière, souvent courts et peu nombreux.

Figure 17. Effets de la phalloïdine sur Acanthamoeba castellanii perméabilisée. Observations en microscopie optique à contraste de phase.

- a. Au contact de la toxine, les mouvements internes de la cellule perméabilisée ralentissent. Des protusions hyalines (B = Blebs) apparaissent tandis que les acanthopodes disparaissent et que la cellule s'immobilise. (x 3300. Barre = 3 $\mu$ m.)
- b. Après l'arrêt des mouvements du cytoplasme, celui-ci se différencie en une zone centrale où sont regroupés tous les organites (noyau, vacuoles, microvésicules...) et une zone hyaline périphérique. (Z.H.) (x 3000. Barre = 5 $\mu$ m.)

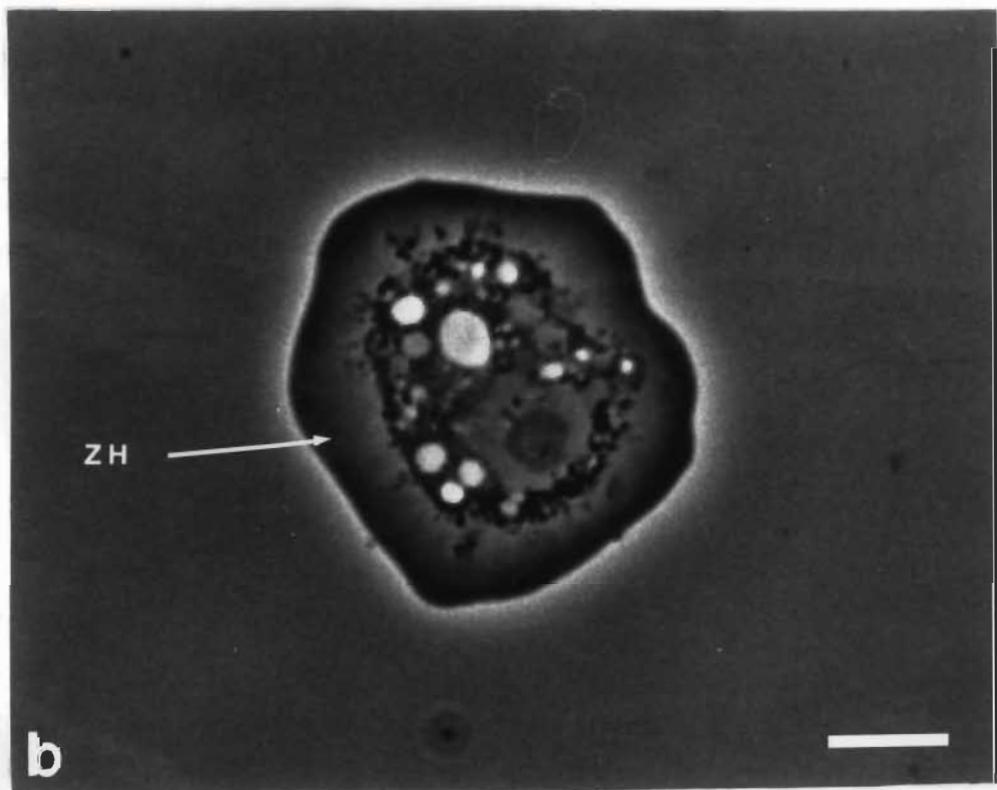
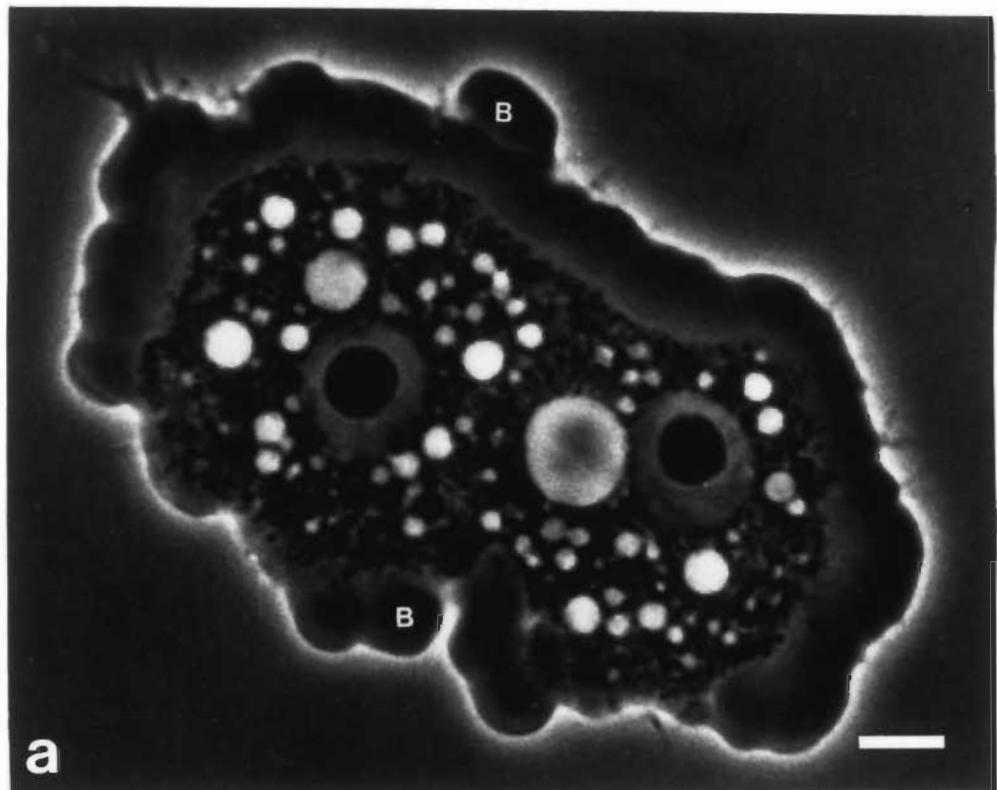


Figure 18. Effets de la phalloïdine sur l'amibe perméabilisée.

Observations en microscopie électronique de broyats cellulaires colorés négativement.

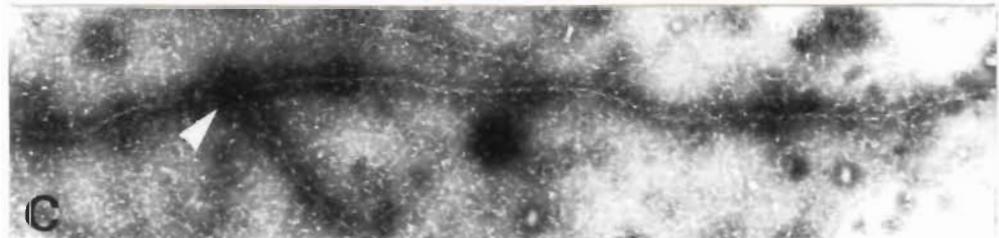
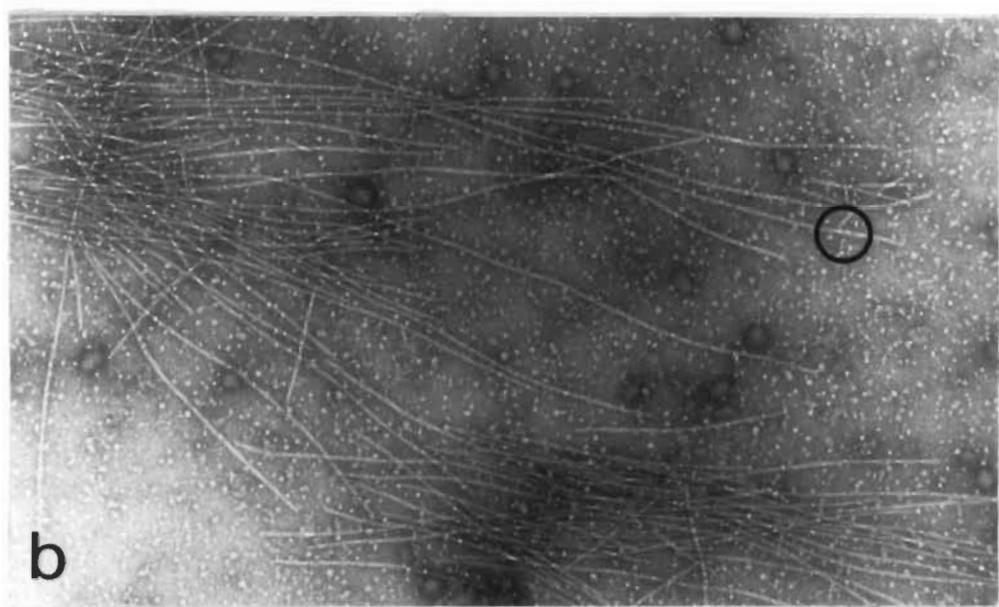
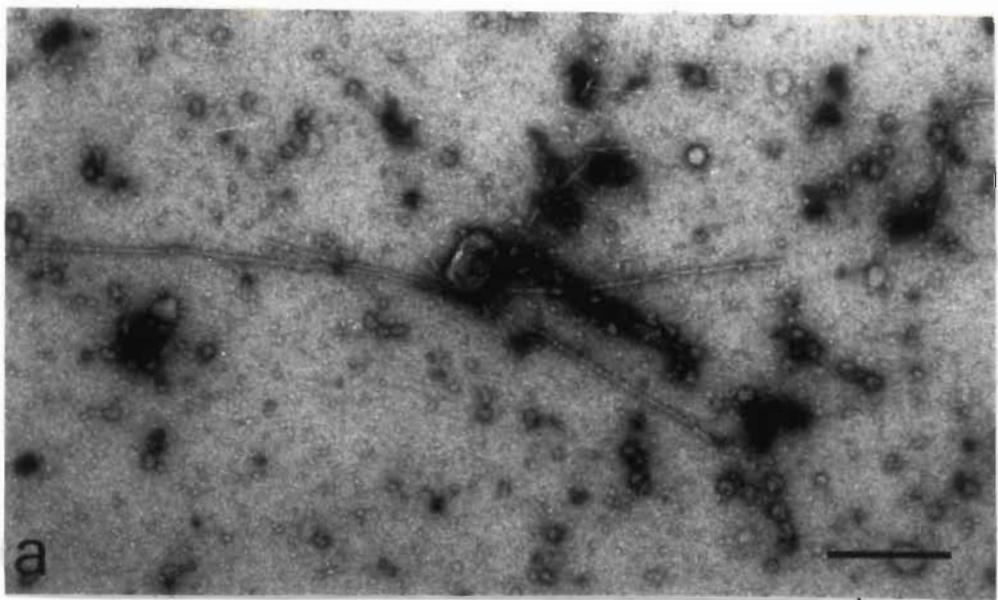
(x 100.000. Barre = 150 $\mu$ m.)

a. Broyat de cellules perméabilisées non traitées par la toxine.

Quelques très rares filaments d'actine sont visibles.

b. Broyat de cellules perméabilisées puis traitées à la phalloïdine. On note une apparition massive de filaments d'actine assez longs, parfois ramifiés. (O)

c. Décoration par le fragment lourd de la myosine (H.M.M.) d'un filament d'actine dans un broyat de cellules perméabilisées et traitées à la phalloïdine. Cette décoration permet de caractériser la nature du filament. On notera l'existence d'une ramification (►).



Après action de la phalloïdine, nous avons noté une prolifération de filaments d'actine dans le cytoplasme des amibes traitées. Les filaments étaient très longs et quelques-uns présentaient des ramifications (Fig.18.b.), celles-ci ayant sans doute pour protéines intermédiaires des "actin-binding proteins" (A.B.P.).

La phalloïdine produit donc un effet marqué au niveau de la polymérisation de l'actine en déplaçant l'équilibre actine G  $\rightleftharpoons$  actine F vers la forme polymérisée. C'est, à notre avis, cette polymérisation qui est à l'origine de la paralysie cellulaire observée au microscope optique.

### 3.1.3 Traitements des cellules à la N.B.D. phallacidine.

En colorant l'actine à la N.B.D. phallacidine, nous avons obtenu une visualisation de câbles d'actine répartis en filet dans la cellule (Fig. 19). Aucune fluorescence n'a été observée sur les cellules non perméabilisées ou sur les amibes perméabilisées et non traitées à la phalloïdine. Cela nous indique que, dans ces cellules témoins, l'actine polymérisée, nécessairement présente, n'est pas en quantité suffisante pour être décelable au microscope à fluorescence par cette coloration. D'autre part, la technique que nous avons utilisée ne permet pas au dérivé fluorescent de la phallacidine d'agir sur l'équilibre dynamique de l'actine *in vivo*.

Par cette coloration, nous avons ainsi pu confirmer l'effet paralysant de la toxine sur *Acanthamoeba castellanii* par l'intermédiaire de son action sur l'actine.

### 3.1.4 Coupes minces d'amibes traitées à la phalloïdine après perméabilisation.

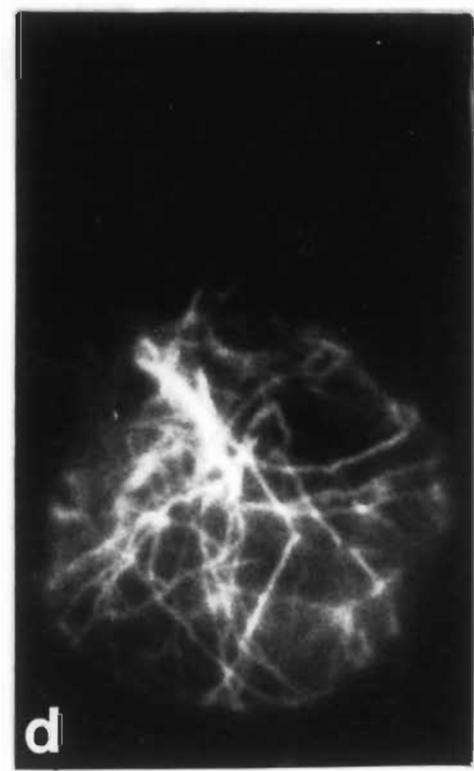
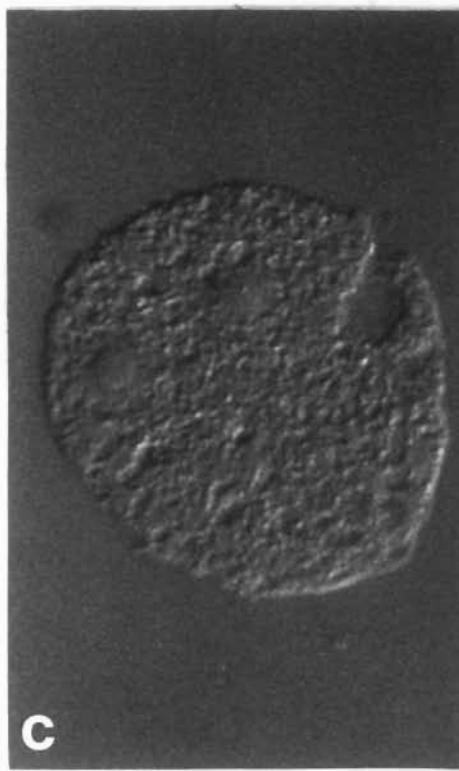
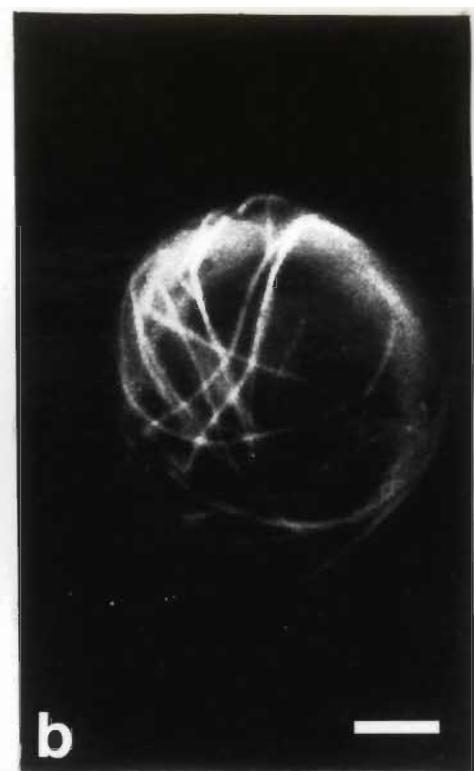
Dans les cellules perméabilisées à la digitonine et au Nonidet

Figure 19. Coloration des amibes perméabilisées et traitées à la phalloïdine par la N.B.D. phallacidine. Observations en microscopie à fluorescence (a,b,d,) et en contraste interférentiel (c). (x 650. Barre = 6,5  $\mu$ m.)

a. Cellule perméabilisée et non traitée par la phalloïdine. Aucune fluorescence n'est visible. On retrouve cette absence de fluorescence chez les cellules non perméabilisées.

b.c.d. Cellules perméabilisées et traitées par la phalloïdine.

- En fluorescence (b.d.) on note la présence de structures en "câbles" réparties dans toute la cellule en un réseau lâche.
- La figure 19-c correspond à une vue au microscope interférentiel de l'amibe observée en fluorescence à la figure 19-d.



P40 puis traitées à la phalloïdine  $10^{-3}M$ , nous avons observé un regroupement des organites au centre de la cellule (Fig. 20). Les mitochondries, le noyau, les gouttelettes lipidiques sont cernés par une bande de hyaloplasme homogène et finement granuleux. On peut observer, dans la zone corticale, des microfilaments (Fig. 21.a.). Cette zone périphérique est parfois limitée structuralement.

Il apparaît, dans certaines cellules, plusieurs structures qui peuvent être localisées à la limite de la zone centrale et de la zone hyaline, ou à la périphérie, immédiatement adjacentes à la membrane cytoplasmique. Ces agrégats de filaments fins peuvent se présenter comme un faisceau serré de microfilaments d'environ 7nm de diamètre (Fig. 21.b.). Des "fagots" de filaments peuvent être localisés à la base d'acanthopodes résiduels (Fig. 22) ou à l'intérieur de microspikes (Fig. 23). Des structures paracristallines d'actine peuvent être observées dans le cytoplasme de certaines cellules (Fig. 23.a.).

L'apparition de structures filamenteuses organisées et alignées dans les microspikes permet de conclure à un effet stabilisateur de la phalloïdine sur l'actine déjà polymérisée dans la cellule avant application de la toxine.

En effet, les microspikes et les acanthopodes sont des indices morphologiques d'une cellule physiologiquement active avant que la phalloïdine n'exerce son effet sur la polymérisation de l'actine, in situ.

Nous avons retrouvé, par observations des coupes fines des cellules perméabilisées et traitées par la phalloïdine, des structures filamenteuses et une organisation interne qui corroborent nos observations au microscope optique.

Nous avons trouvé, comme en coloration négative, une grande

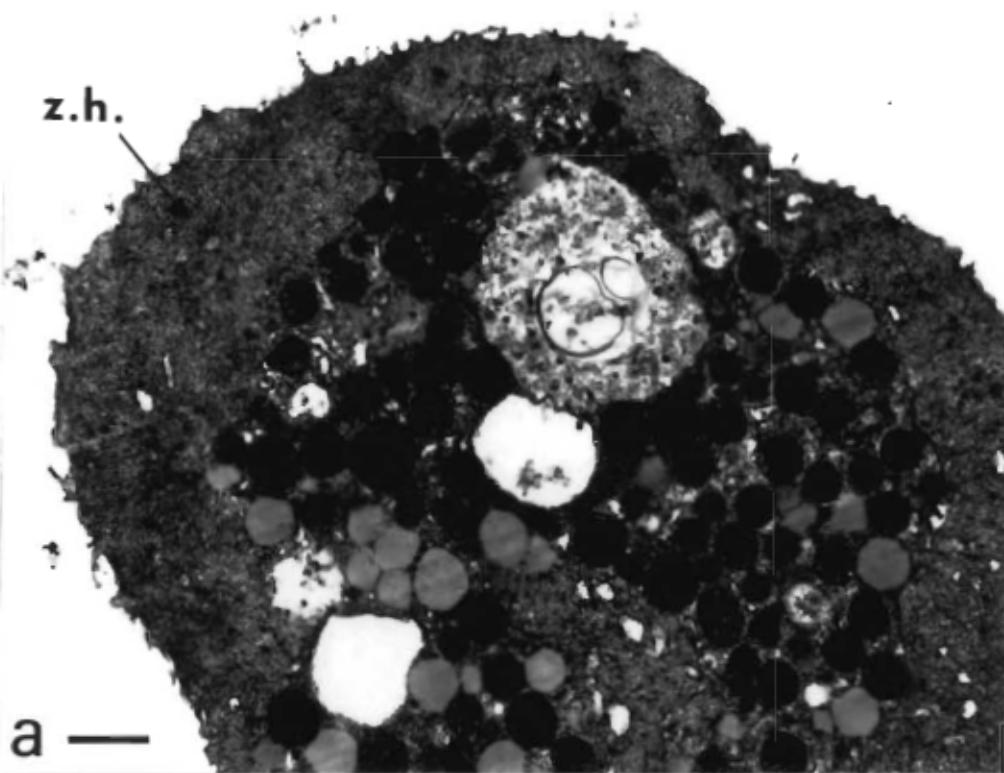
Figure 20. Ultrastructure d'une amibe traitée à la phalloïdine  
après perméabilisation. Fixation à la glutaraldéhyde.

On note un regroupement des organites (mitochondries, vacuoles, microvésicules, gouttelettes lipidiques) dans une zone centrale. A la périphérie, la zone hyaline (z.h) observée en microscopie optique apparaît comme finement granuleuse et homogène.

a. x 10.000. Barre = 10 $\mu$ m.

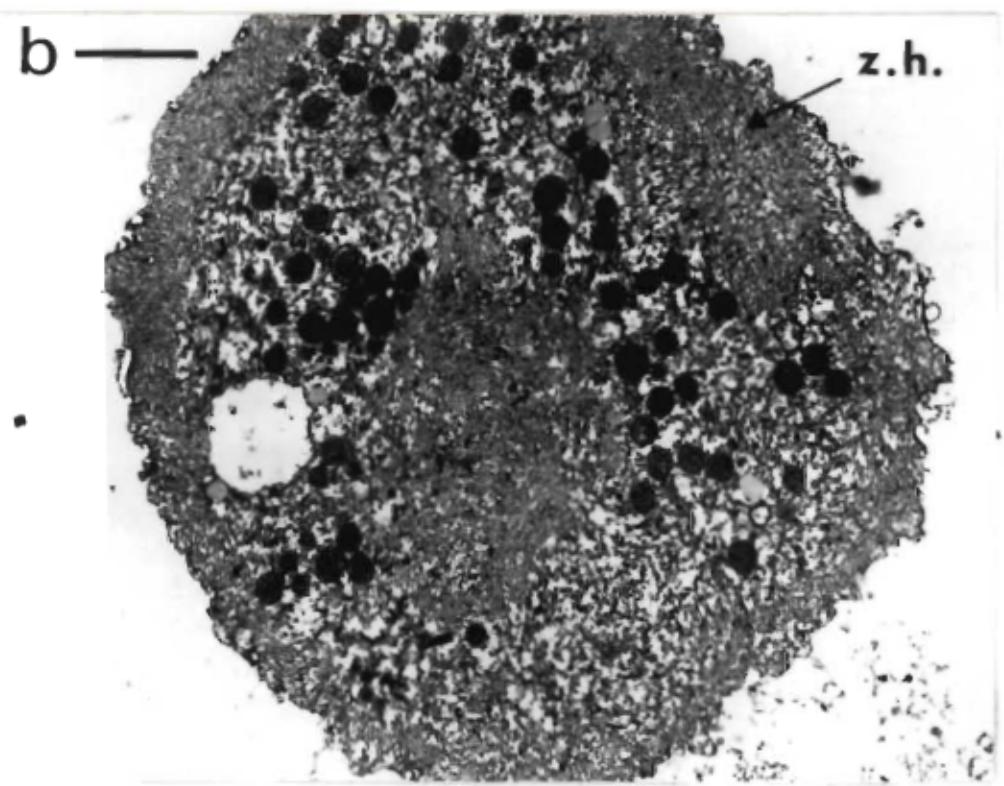
b. x 8.500. Barre = 1,7 $\mu$ m.

**z.h.**



**a —**

**z.h.**



**b —**

Figure 21. Détails périphériques du cytoplasme d'amibes perméabilisées et traitées par la phalloïdine. Observations en microscopie électronique après fixation à la glutaraldéhyde.

- a. Amibe au début du traitement par la toxine. La zone hyaline périphérique apparaît. ( x 32.000. Barre = 0,60nm.)
- b. Faisceau de microfilaments situé juste au dessous de la membrane plasmique. Un microtubule est visible (mt). Les mitochondries sont arrondies. ( x 32.000. Barre = 0,45nm.)

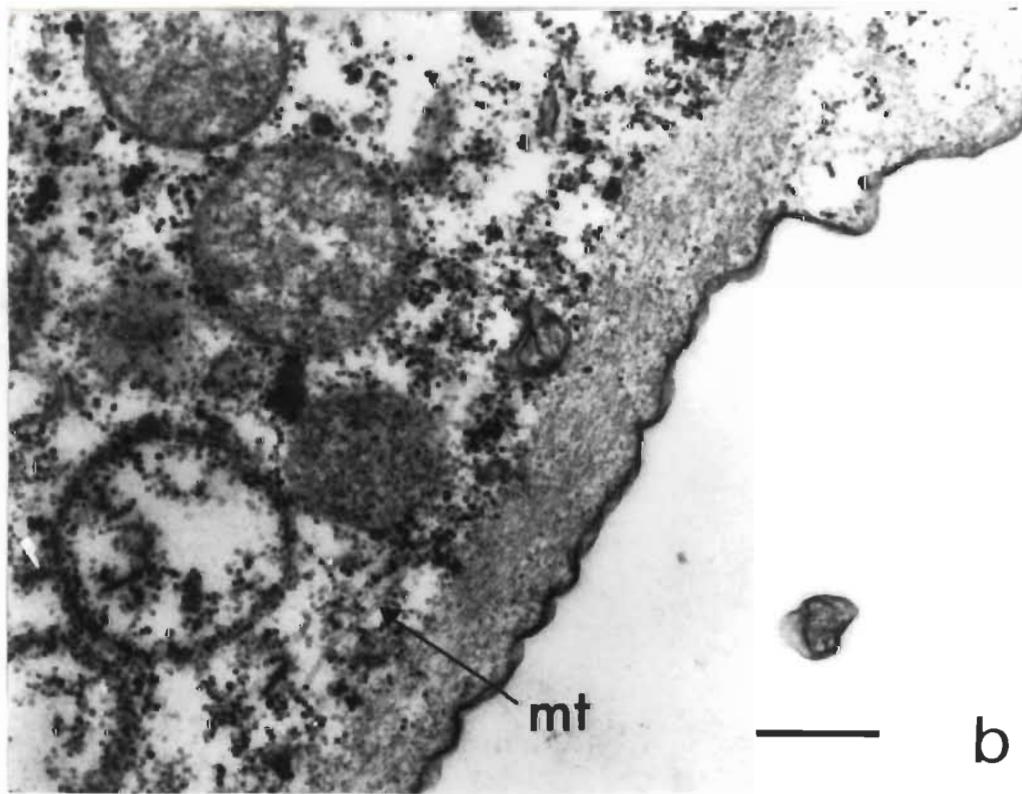
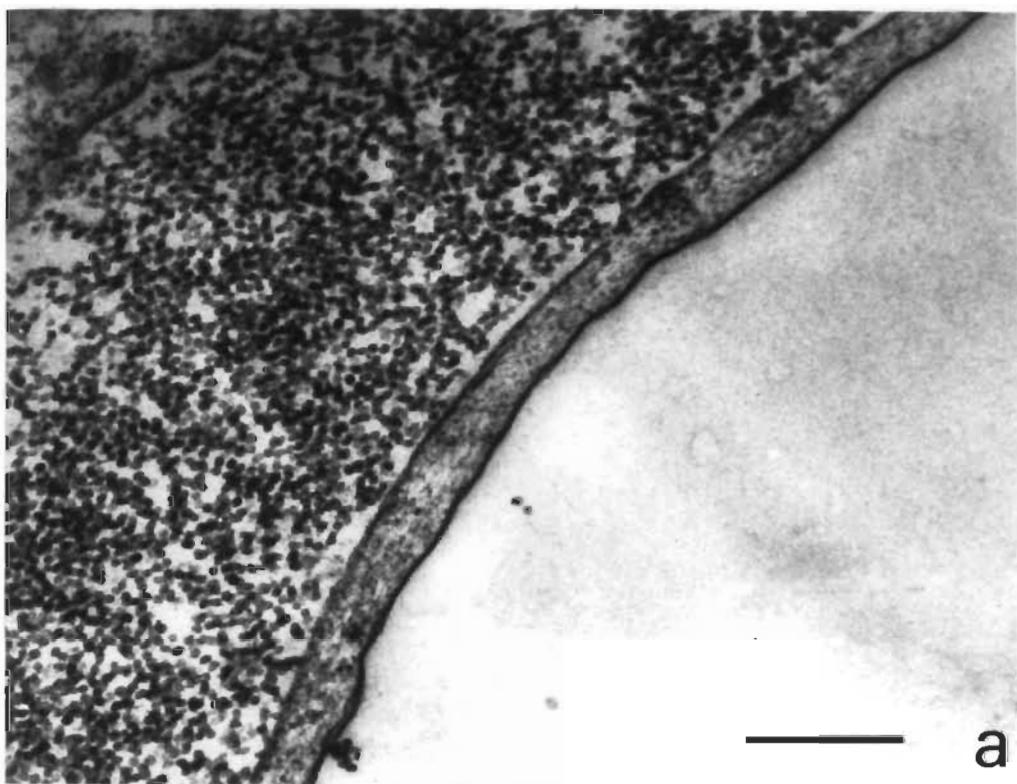


Figure 22. Détails de l'ultrastructure d'amibes traitées à la phalloïdine après perméabilisation. Fixation à la glutaraldéhyde. ( x 50.000. Barre = 0,3µm.)

a. Longeant la membrane, des filaments d'actine sont disposés parallèlement à celle-ci, de manière discontinue.

b. On peut retrouver ces faisceaux de filaments, plus ou moins denses, à la base d'acanthopodes résiduels.

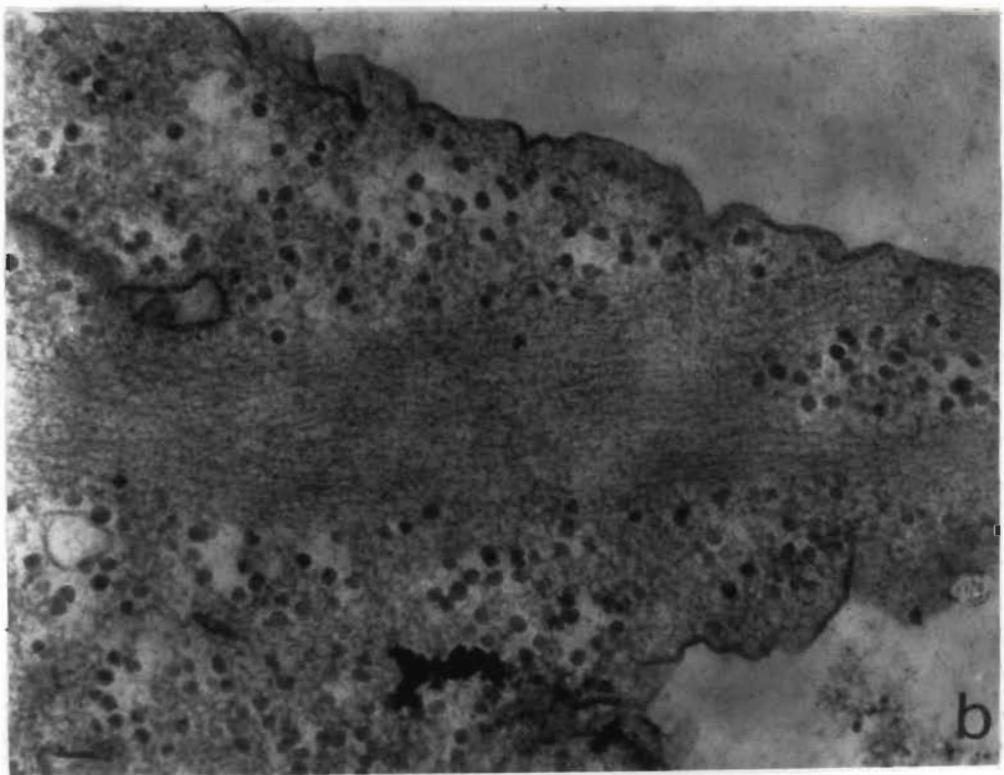
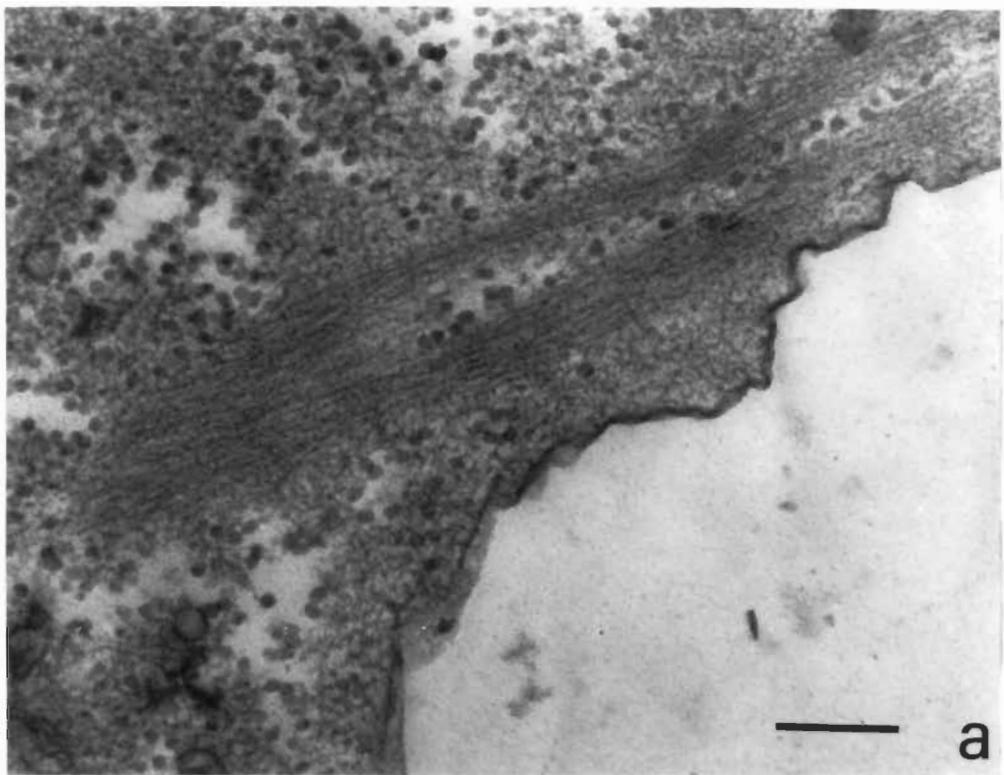
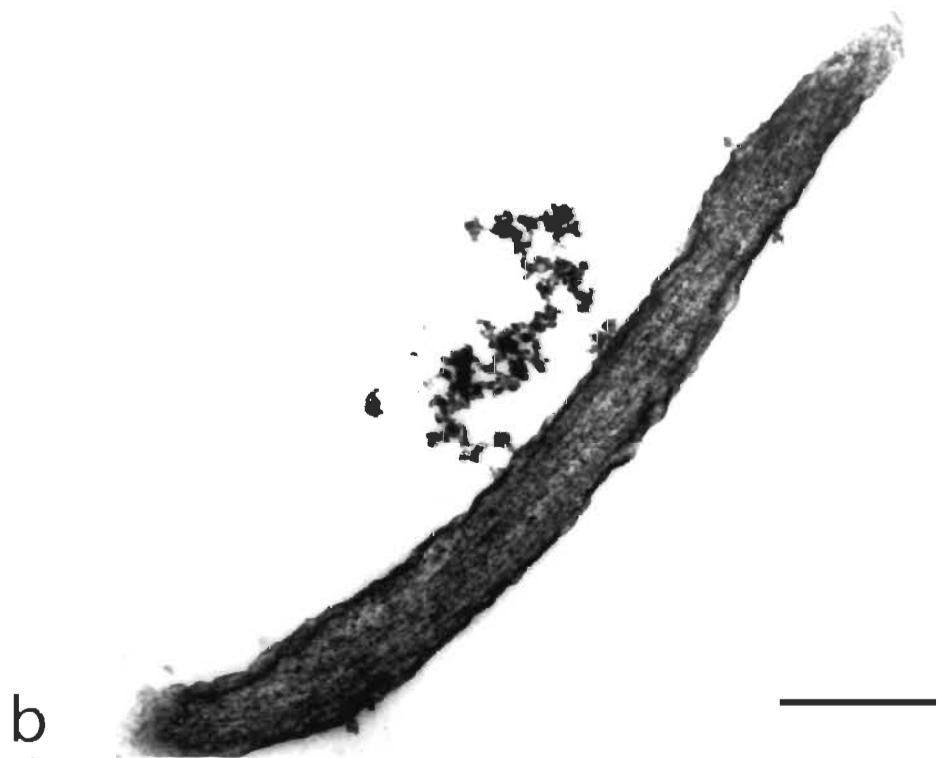
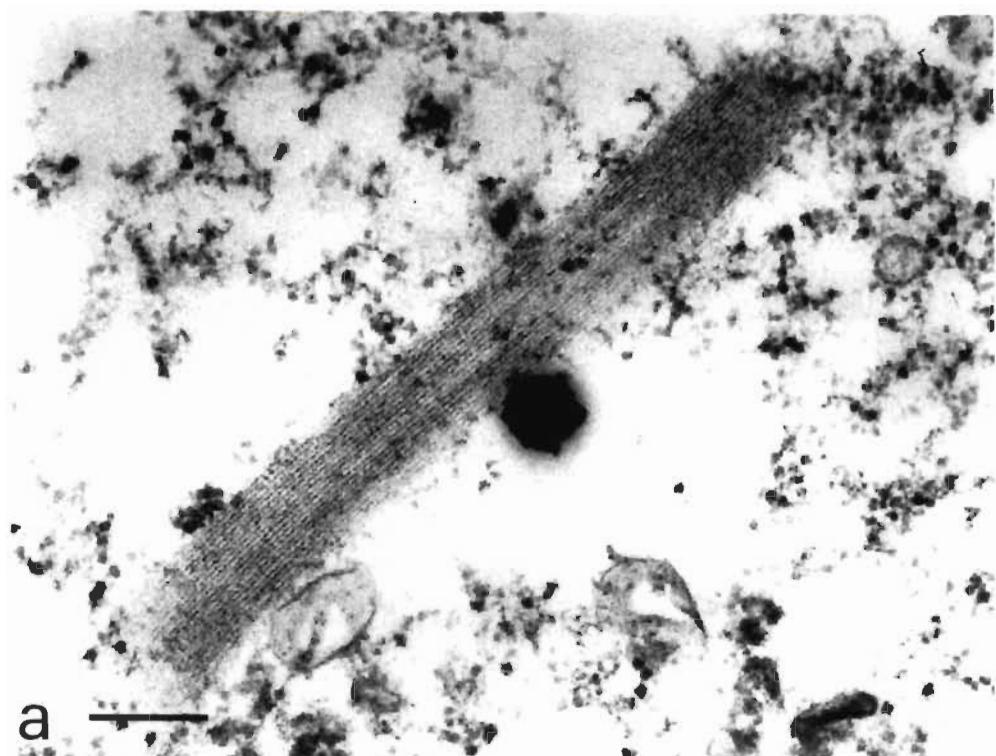


Figure 23. Effets de la phalloïdine sur Acanthamoeba castellanii perméabilisée. Observations sur coupes minces au microscope électronique après fixation par la formaldéhyde.

- a. Faisceau serré de filaments d'actine dans le cytoplasme d'une amibe traitée à la phalloïdine. Ces faisceaux, en structure paracristalline, sont nettement visibles dans une cellule au cytoplasme partiellement extrait. ( $\times 50.000$ . Barre =  $0,3\mu\text{m}$ .)
- b. Microspike résiduel d'une amibe traitée par la phalloïdine après perméabilisation. Dans cette structure, on note l'arrangement parallèle et serré de longs filaments d'actine. ( $\times 40.000$  Barre =  $0,5\mu\text{m}$ .)



quantité d'actine F organisée en structures compactes et individualisées, comme les faisceaux, visualisés d'autre part en fluorescence.

La phalloïdine agit donc au niveau de la polymérisation de l'actine, la bloquant sous sa forme filamenteuse, entraînant ainsi un arrêt de la motilité de la cellule. Les résultats que nous avons obtenus avec une solution  $10^{-4}$  M de phalloïdine sont globalement comparables, bien que la proportion de cellules affectées d'un effet marqué de la phalloïdine soit plus réduite.

Enfin, signalons que l'addition de phalloïdine au fixateur n'a pas amélioré la qualité de la fixation.

### 3.2 Effet de la viroïsine sur les cellules perméabilisées.

#### 3.2.1 Observations au microscope optique.

Après l'action de la virotoxine, en observant les amibes perméabilisées, nous avons constaté que l'effet produit était similaire à celui de la phalloïdine à la même concentration.

Les microspikes et les acanthopodes disparaissaient au bout de 1 à 2 minutes puis les mouvements cytoplasmiques ralentissaient (Fig.25.b.) Une zone hyaline apparaissait à la périphérie de la cellule arrondie, et au bout d'une dizaine de minutes environ, pratiquement toutes les cellules avaient stoppé leurs mouvements cytoplasmiques et présentaient l'aspect caractéristique décrit pour la phalloïdine.

Au cours des expériences effectuées avec la viroïsine, nous n'avons jamais observé de mouvement cytoplasmique qui ressemblait à une contraction chez *Acanthamoeba castellanii*.

La viroïsine présente donc avec la phalloïdine des similarités d'effets sur l'amibe, en particulier au niveau de la motilité puisque l'action de cette toxine résulte aussi, finalement, en une paralysie de

Figure 24. Coupe tangentielle d'une amibe perméabilisée puis traitée par la phalloïdine. Fixation par la formaldéhyde.

a. Vue générale.

Un "câble" de microfilaments d'actine parcourt la cellule d'un bord à l'autre. L'importante extraction du cytoplasme rend aisée l'observation de cette structure. ( x 4000. Barre = 5 $\mu$ m.)

b. Détail de la figure 22-a.

Dans l'enchevêtrement de microfilaments constitutifs du "câble", on trouve quelques microtubules associés aux filaments d'actine. (→). ( x 32.000. Barre = 0,2 $\mu$ m.)

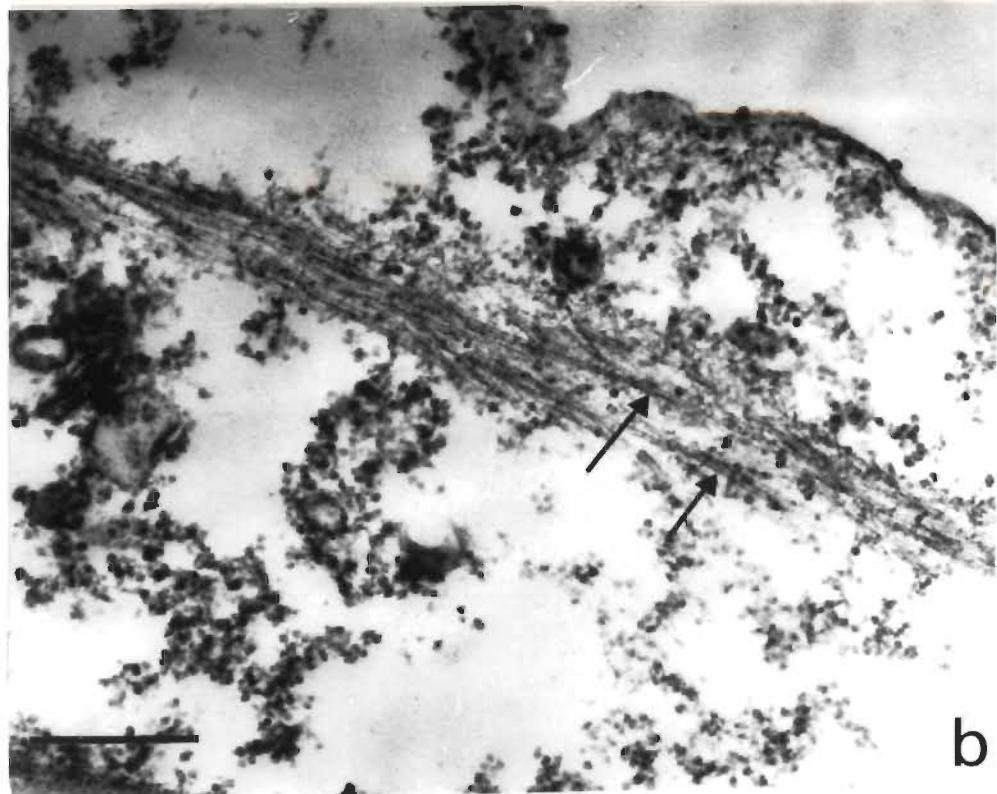
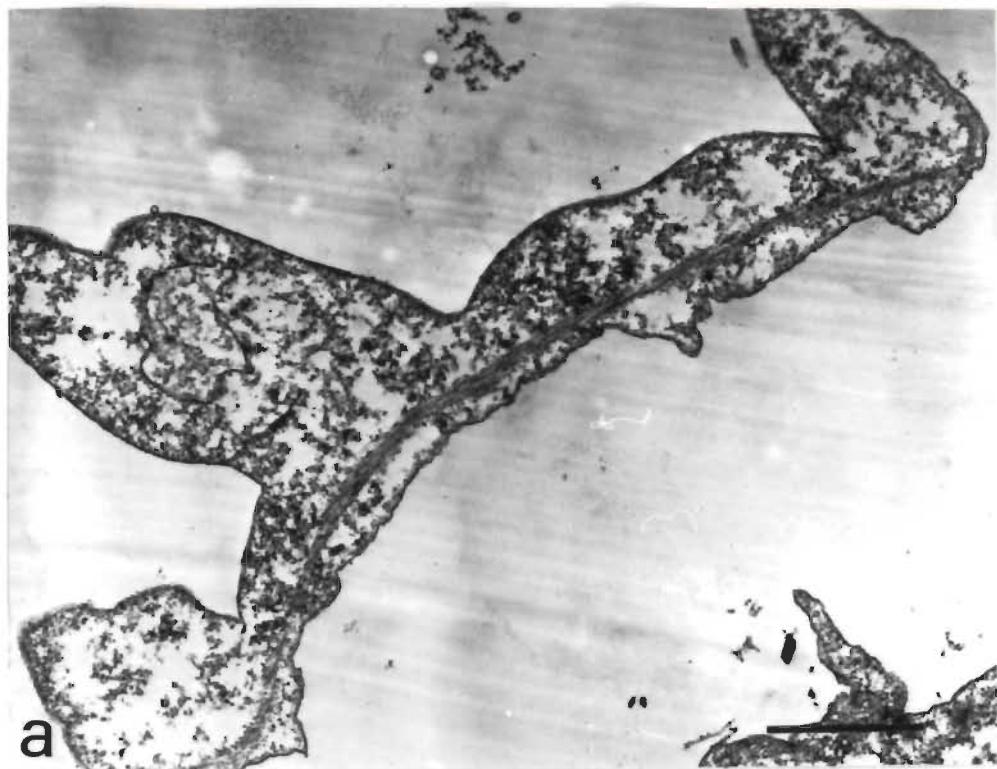
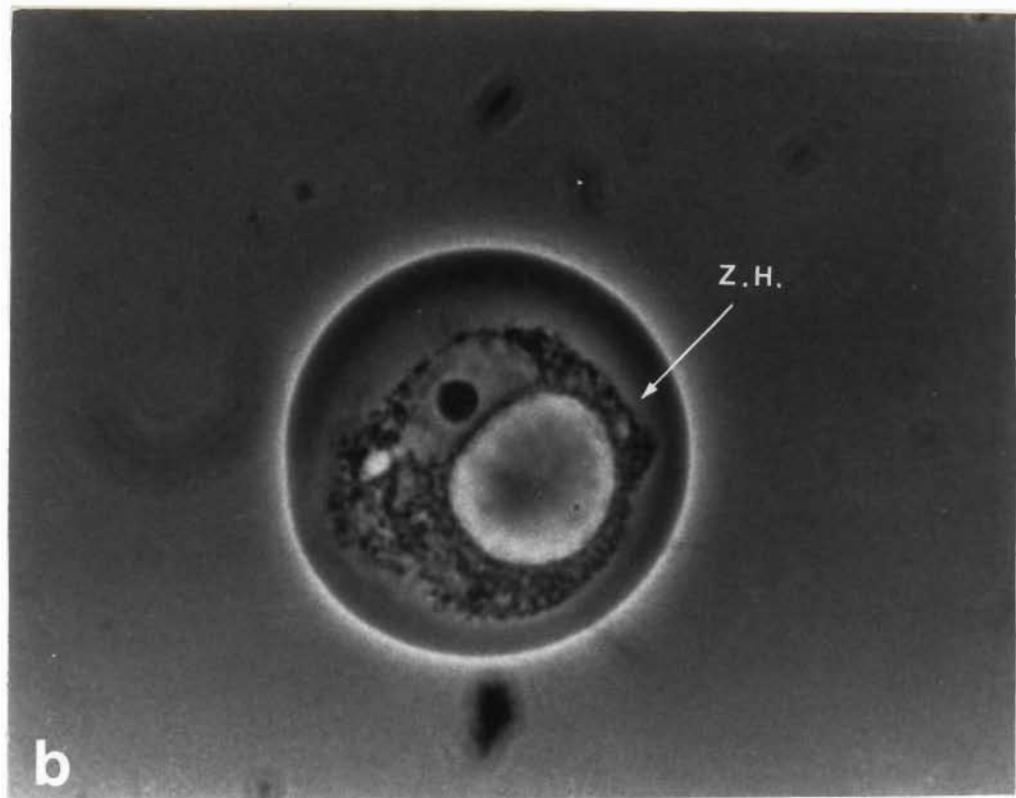
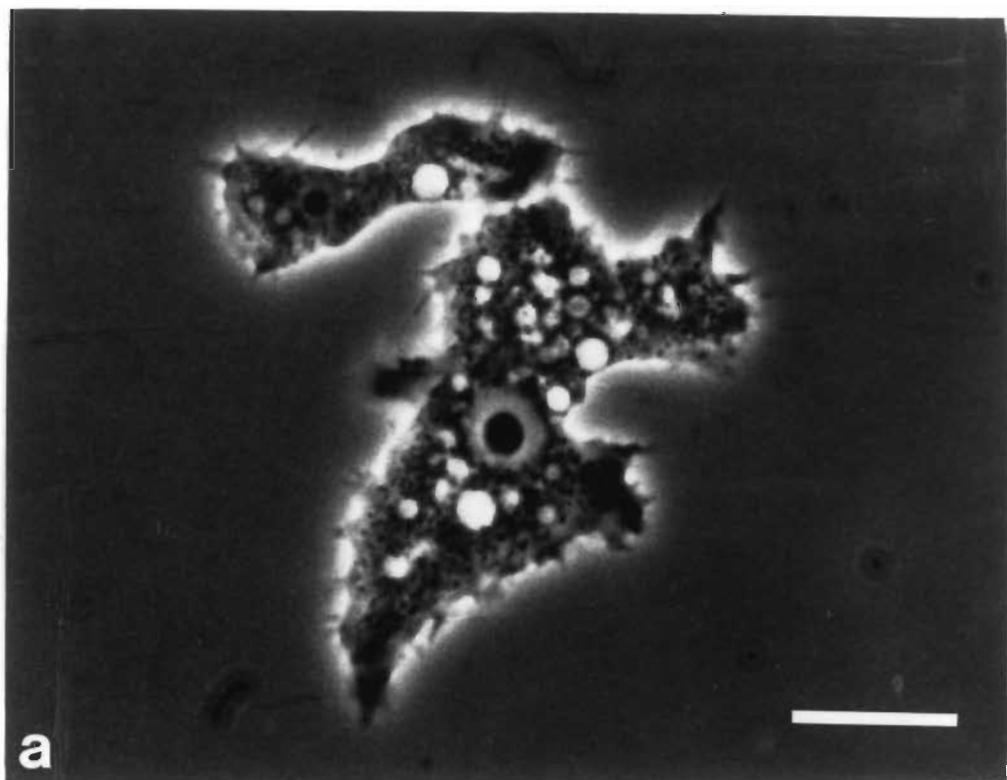


Figure 25. Effets de la viroïsine sur Acanthamoeba castellanii perméabilisée. Observations en microscopie optique à contraste de phase. (x 1650. Barre = 12µm.)

- a. Amibes témoins perméabilisés, non traitées à la viroïsine. Les cellules présentent des mouvements cytoplasmiques très actifs et de nombreux acanthopodes visibles, permettant aux amibes de se déplacer.
- b. Après action de la viroïsine, on observe un ralentissement des mouvements intracytoplasmiques, une disparition des acanthopodes et une immobilisation de l'amibe. Une zone hyaline périphérique apparaît (Z.H.), entourant une zone plus dense où sont regroupés les organites cellulaires.



la cellule entraînant sa mort.

### 3.2.2 Colorations négatives d'amibes traitées à la viroïsine après perméabilisation.

L'examen en microscopie électronique d'homogénats de cellules perméabilisées à la digitonine, ou au Nonidet P40, puis traitées à la viroïsine  $10^{-3}$  M et colorés négativement, nous a permis d'observer de nombreux filaments longs. Ceux-ci peuvent être dispersés (Fig. 26.a.) ou être associés entre eux en réseaux aux mailles plus ou moins serrées (Fig. 26.b.) (Fig. 27.b.). Nous avons décoré ces filaments avec de la H.M.M., les caractérisant ainsi comme composés d'actine.

Le traitement des cellules à la viroïsine après perméabilisation, l'amibe étant imperméable aussi à cette toxine, entraîne donc, comme pour la phalloïdine, un déplacement de l'équilibre de l'actine vers sa forme polymérisée d'une part; d'autre part, la viroïsine possède des propriétés stabilisatrices des filaments d'actine, que ceux-ci soient formés avant ou après contact avec la toxine.

Nous avons pu observer, occasionnellement, dans les broyats d'*Acanthamoeba castellanii* perméabilisées ou non, une structure torsadée (Fig. 27.a.). Il pourrait s'agir de polysomes ou de ribonucléoprotéines.

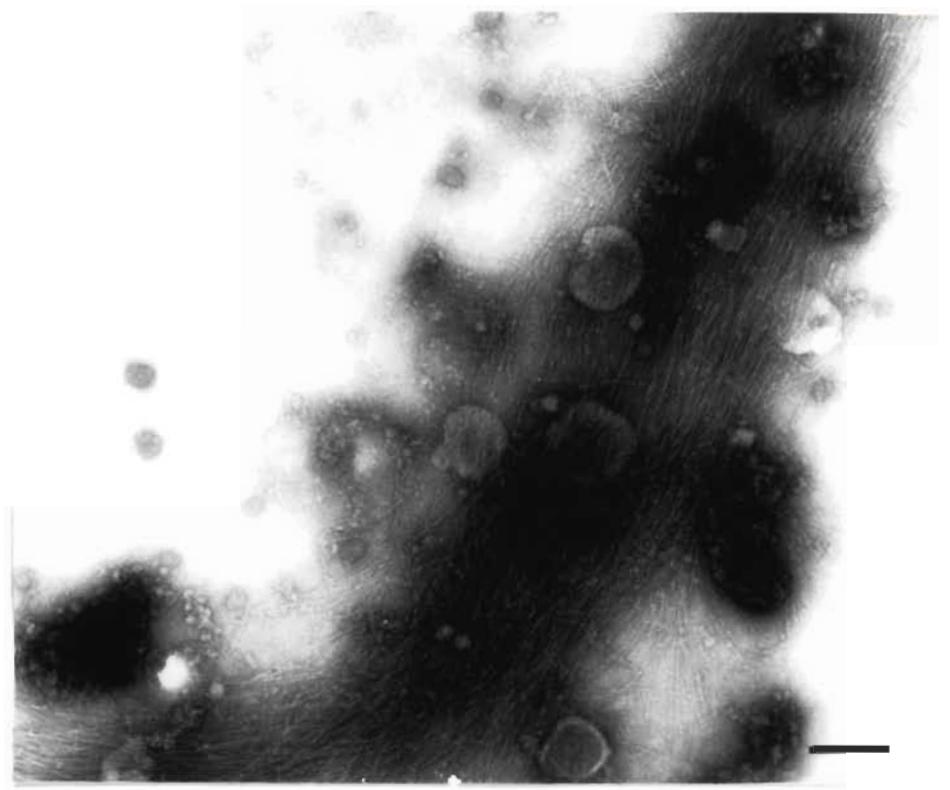
### 3.2.3 Coloration de l'actine à la N.B.D. phallacidine.

L'observation, en microscopie à fluorescence, de cellules perméabilisées à la digitonine ou au Nonidet P40, puis traitées par la viroïsine  $10^{-3}$  M avant coloration, nous a permis de visualiser des "câbles" fluorescents de tailles variables et répartis d'une manière assez homogène (Fig. 28).

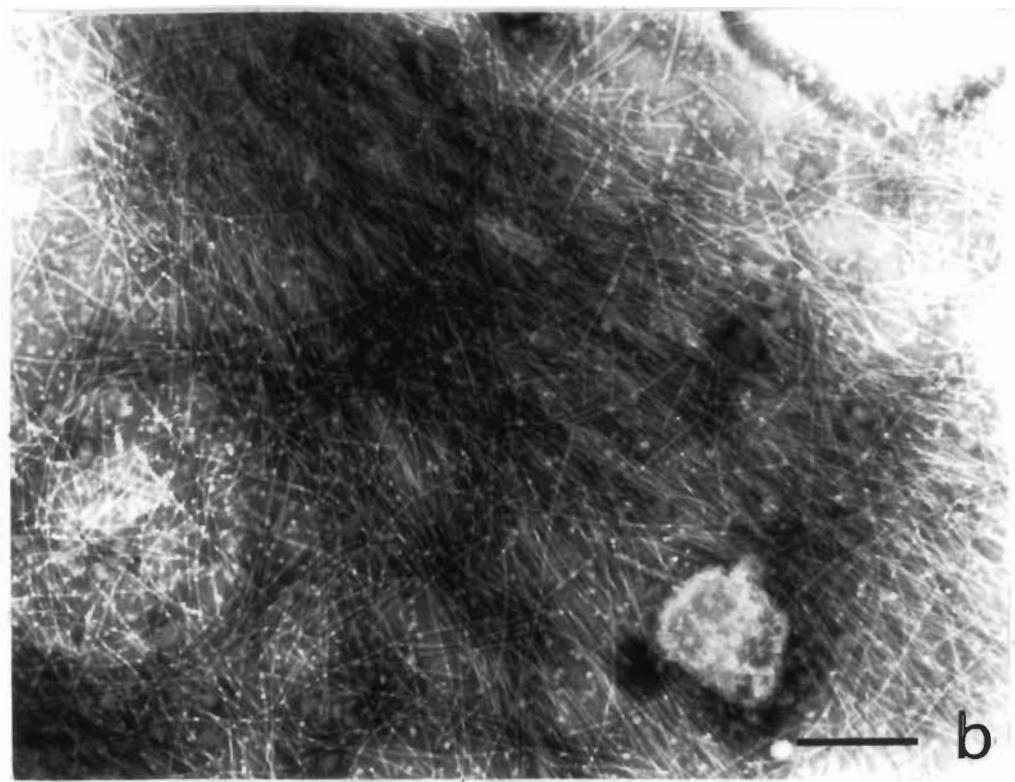
Les cellules perméabilisées dans les mêmes conditions puis colo-

Figure 26. Coloration négative de broyats de cellules traitées par la viroïsine après perméabilisation.

- a. Les filaments d'actine sont nombreux et longs. Ils peuvent parfois être disposés en faisceaux serrés et parallèles. ( X 48.000. Barre = 0,2 $\mu$ m.)
- b. Le plus souvent, les nombreux filaments d'actine qui apparaissent après traitement à la viroïsine sont organisés en réseaux plus ou moins lâches. ( x 50.000. Barre = 0,3 $\mu$ m.)



a



b

Figure 27. Coloration négative de broyats de cellules traitées à la viroïsine après perméabilisation.

a. Amibe perméabilisée mais non traitée par la viroïsine. Dans cette préparation témoin, on ne note pas la présence de filaments d'actine en grande quantité. On peut en observer quelques uns, assez rares et individualisés.

Une structure hélicoïdale est parfois visible. Il s'agit probablement d'un polysome. (x 50.000. Barre = 0,2 $\mu$ m.)

b. Amibe perméabilisée et traitée à la viroïsine. Il apparaît, outre la grande quantité de longs filaments d'actine arrangés en faisceaux parallèles, des structures réticulées composées de filaments d'actine pontés par diverses "actin-binding" protéines(O) (x 50.000. Barre = 0,3 $\mu$ m.)

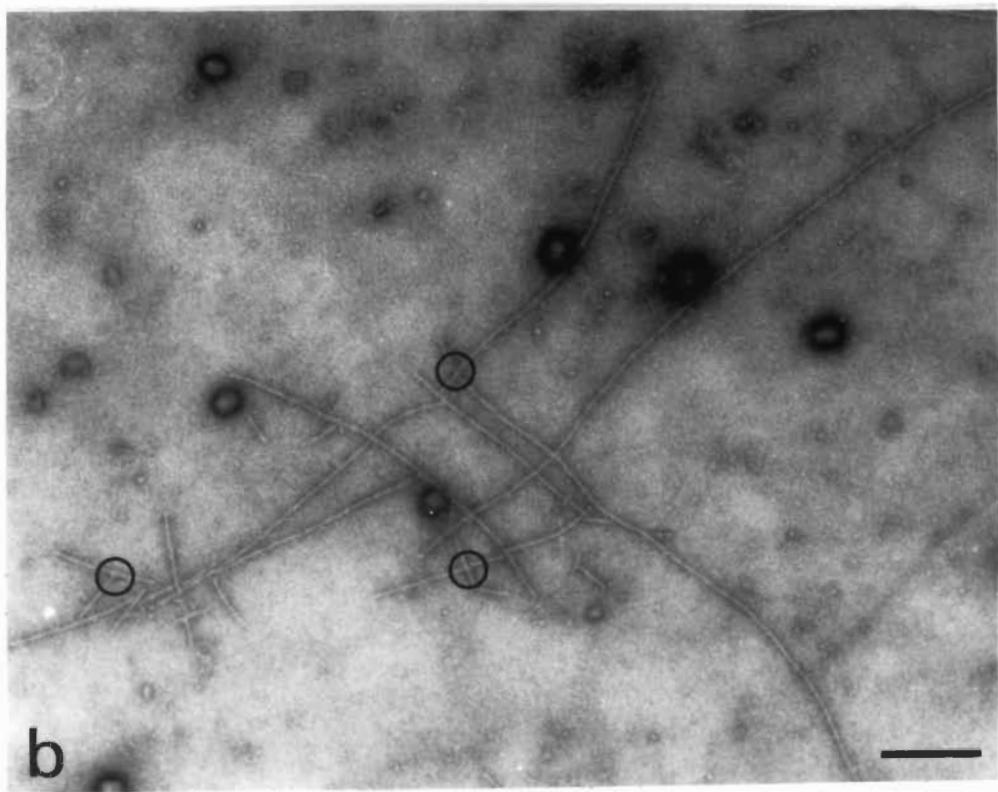
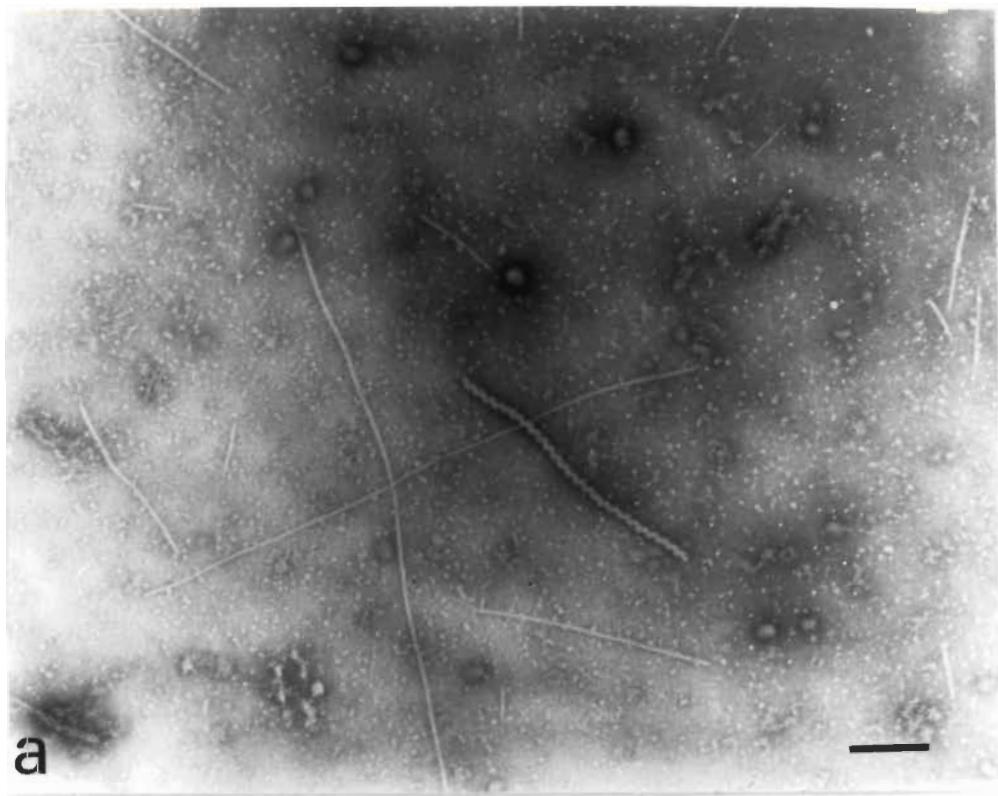


Figure 28. Coloration à la N.B.D. phallacidine d'amibes après perméabilisation et traitement à la viroïsine.

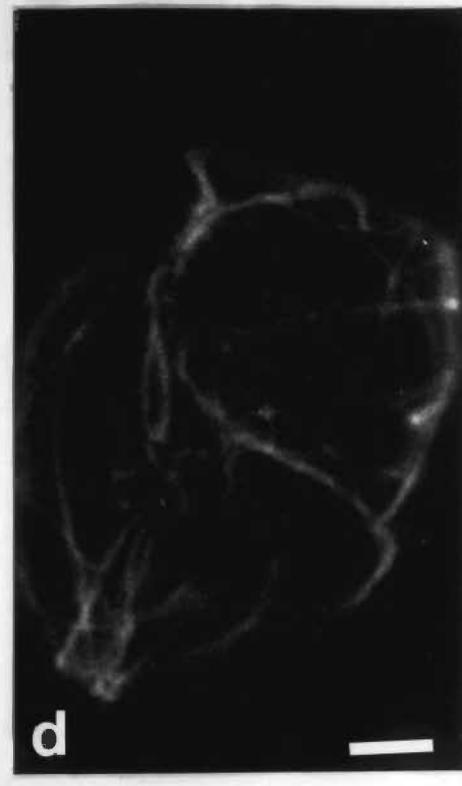
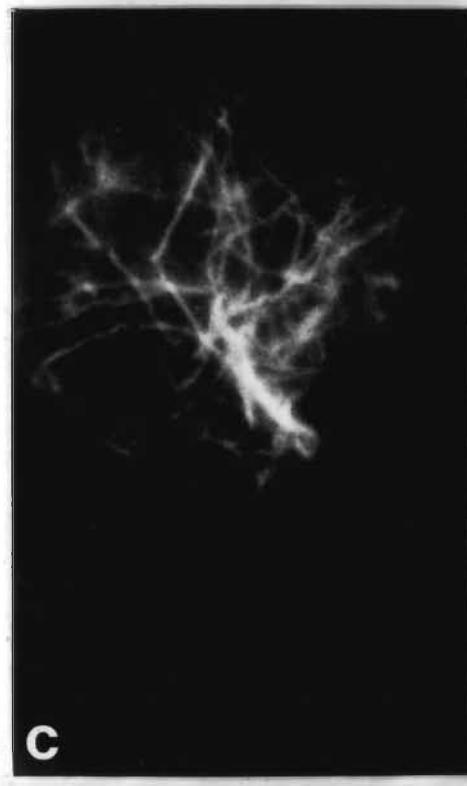
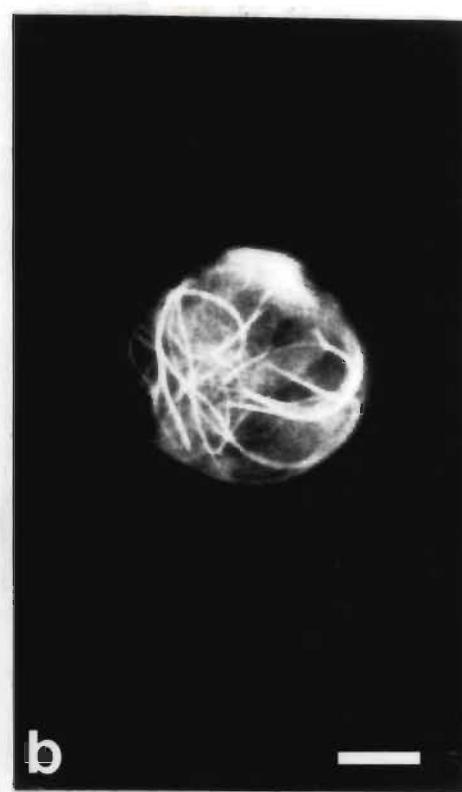
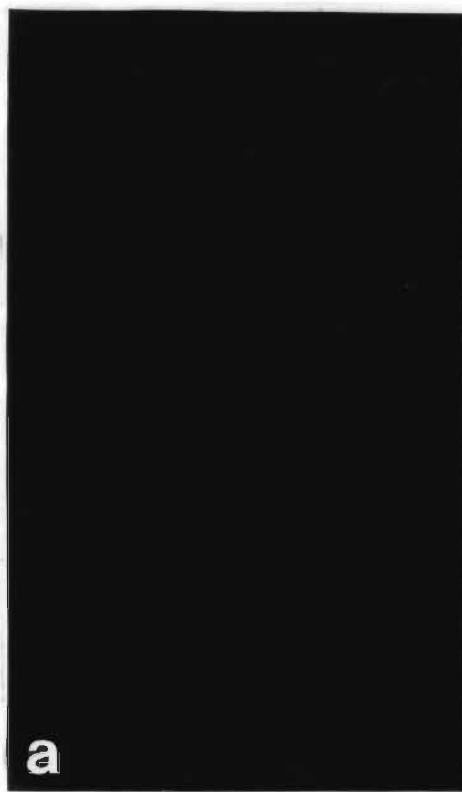
Observations en microscopie à fluorescence.

a. Cellule témoin perméabilisée et traitée au mélange viroïsine-N.B.D. phallacidine (100:1). L'absence de fluorescence caractéristique montre la spécificité de l'action de la viroïsine.

b-c-d. Cellules perméabilisées, traitées par la viroïsine puis colorées par la N.B.D. phallacidine. On note la présence de nombreux "câbles" d'actine répartis dans toute la cellule en un réseau assez lâche.

b. (x 500. Barre = 20 $\mu$ m.)

c-d. (x 900. Barre = 10 $\mu$ m.)



rées à la NBD phallacidine sans être soumises à l'action de la viroïsine ne présentaient aucune fluorescence caractéristique. Ceci nous indique que la quantité d'actine sous forme F dans la cellule est faible et que la fixation employée pour cette coloration n'affecte pas l'état de polymérisation de la protéine.

Pour mettre en évidence une éventuelle compétition entre la viroïsine et la NBD phallacidine, nous avons appliqué à des cellules perméabilisées un mélange viroïsine:NBD phallacidine dans la proportion respective 100:1. L'absence de fluorescence dans ces cellules nous amène à conclure que la viroïsine seule réagit avec l'actine.

Avec une concentration en viroïsine de  $10^{-4} M$ , les effets de la toxine sont semblables que ceux que nous venons de décrire mais beaucoup moins homogènes.

### 3.2.4 Observations en microscopie électronique de coupes fines d'amibes traitées à la viroïsine après perméabilisation.

Nous avons pu mettre en évidence les effets de la viroïsine sur l'ultrastructure d'*Acanthamoeba castellanii* perméabilisée.

La zone hyaline périphérique est formée d'un matériel amorphe finement granuleux, (Fig. 29a), d'aspect plus clair, où quelques filaments sont visibles. Ces filaments sont quelquefois sous-jacents à la membrane (Fig. 29.b.) (Fig. 30).

La région centrale, où sont concentrés les organites, contient souvent des structures filamenteuses organisées en faisceaux parallèles (Fig. 31) particulièrement bien visibles grâce à l'extraction d'une grande partie du matériel environnant.

On trouve aussi, souvent à la limite des deux zones cytoplasmiques décrites, des ensembles buissonnantes de filaments fins (Fig. 32).

Figure 29. Ultrastructure d'Acanthamoeba castellanii  
perméabilisée puis traitée à la virofisine.

a. Vue générale d'une cellule.

On met très facilement en évidence la zone hyaline (z.h.) périphérique où le cytoplasme est granuleux et fin. La zone centrale contient tous les organites et les mitochondries sont arrondies (m). Fixation par la glutaraldéhyde. (x 9500. Barre = 1 $\mu$ m.)

b. Détail d'une cellule.

Dans la zone hyaline (z.h.), on peut noter la présence de filaments longitudinaux et transversaux. Plus au centre de la cellule, les mitochondries arrondies sont regroupées. Fixation à la formaldéhyde. (x 12.500. Barre = 1,2 $\mu$ m.)

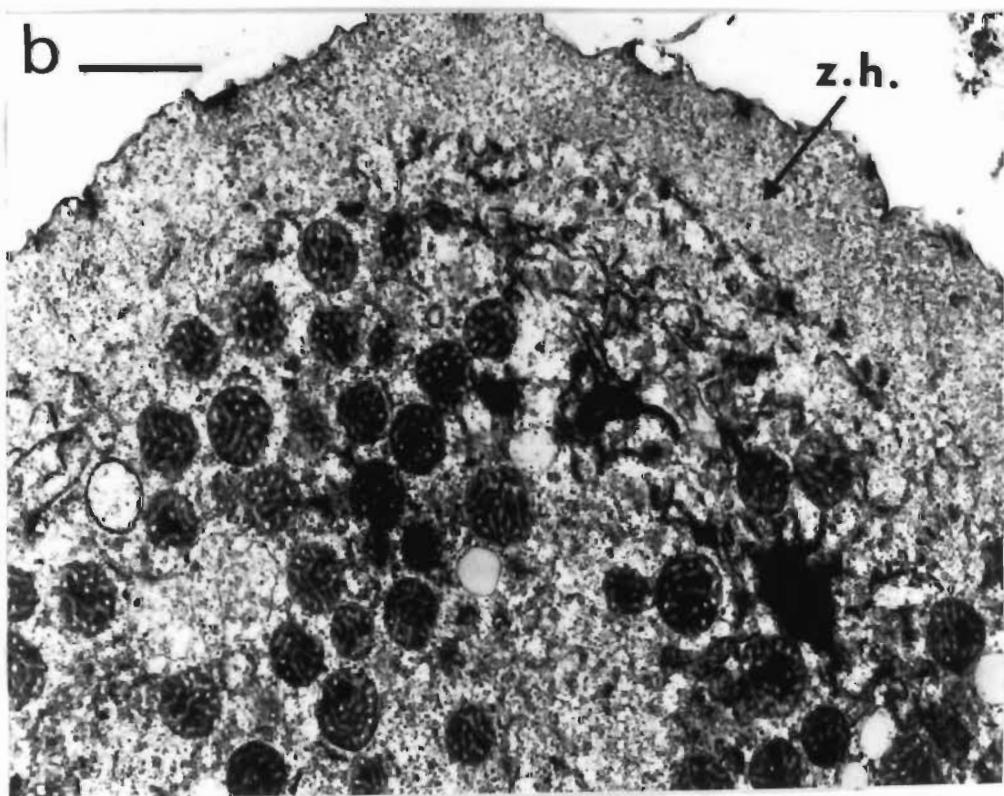
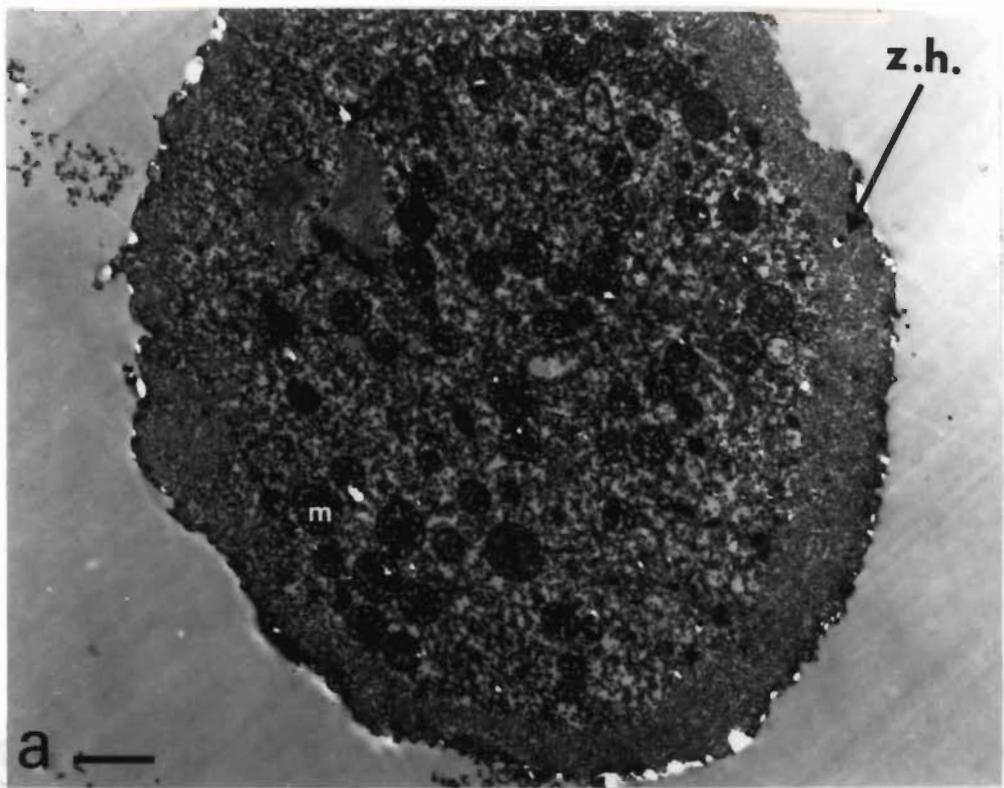
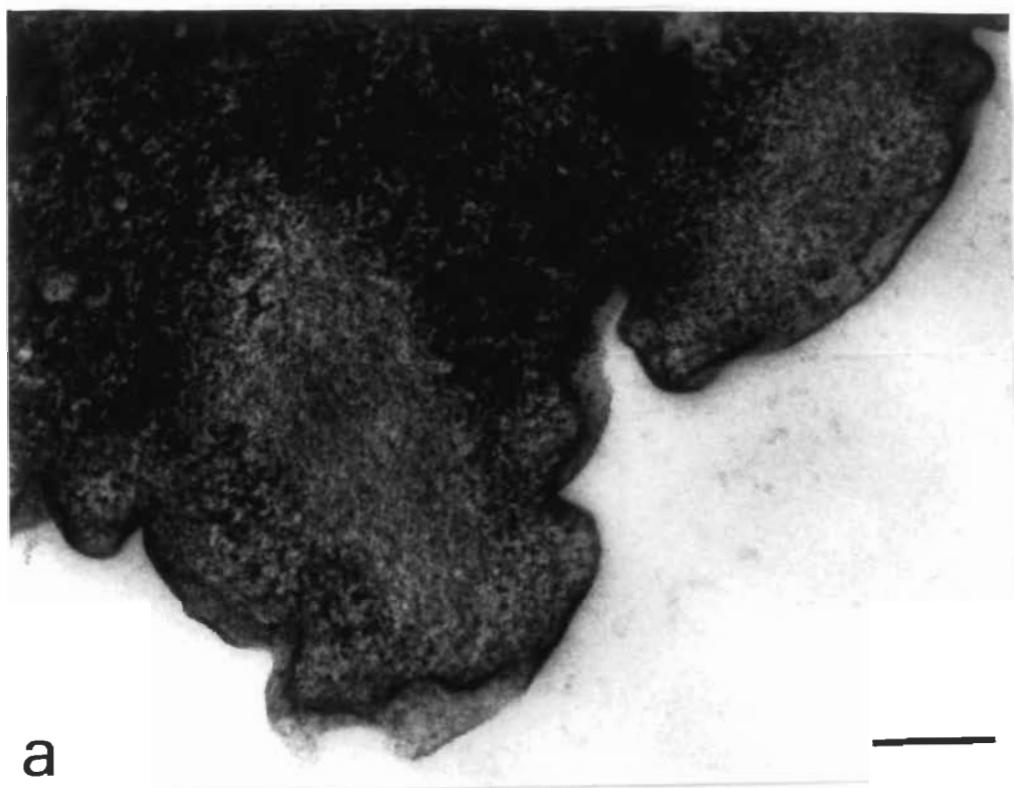


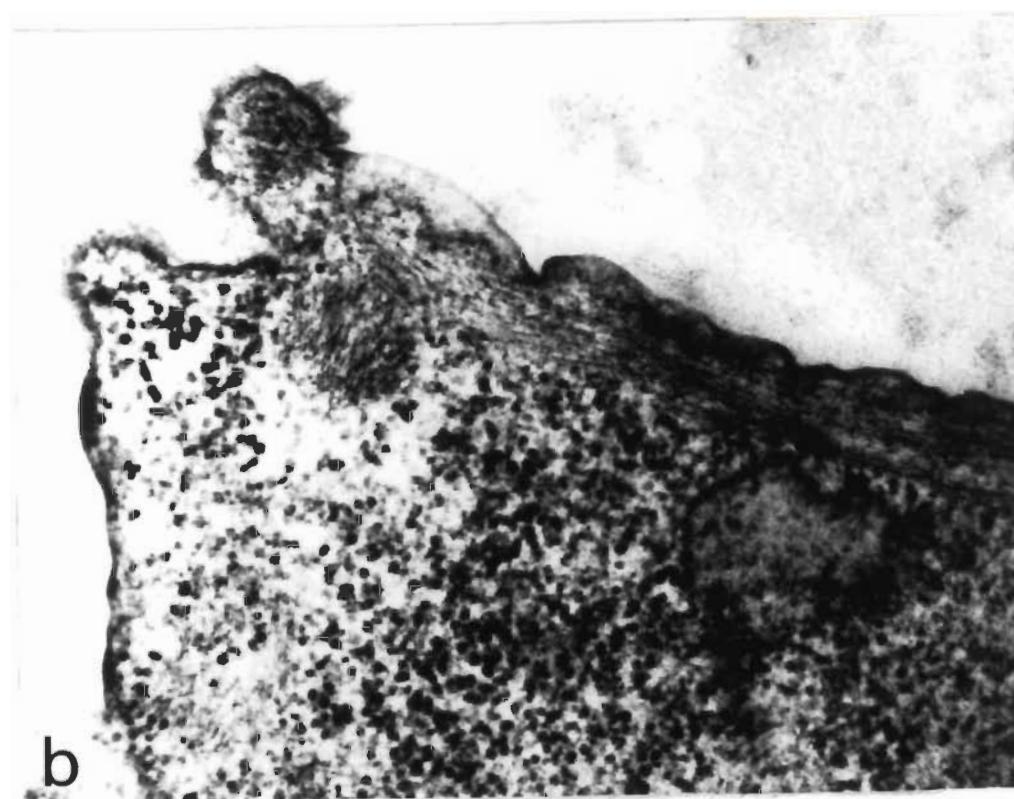
Figure 30. Détails de l'ultrastructure d'amibes perméabilisées puis traitées à la viroisine. ( x 32.000. Barre = 0,5µm.)

a. Des filaments d'actine en paquets sont visibles sur cette coupe. Ces structures peuvent être associées aux "blebs" observés en microscopie optique au commencement du traitement de cellules perméabilisées par la viroisine. Fixation à la glutaraldéhyde.

b. On retrouve ces filaments d'actine en alignements parallèles sous la membrane des amibes traitées à la viroisine. On notera que le cytoplasme est partiellement extrait dans cette cellule fixée à la formaldéhyde.



a



b

Figure 31. Détails de l'ultrastructure du cytoplasme d'amibes traitées à la viroïsine après perméabilisation.  
Cellules fixées à la formaldéhyde. (x 50.000. Barre =  
0,2 $\mu$ m.)

a. Cytoplasme d'une amibe perméabilisée et non traitée à la viroïsine. On notera l'absence de structures filamenteuses. Ce type de figure est observable aussi chez une amibe non perméabilisée.

b-c-d. Filaments d'actine cytoplasmique arrangés en faisceaux parallèles plus ou moins serrés. Le fond cytoplasmique est partiellement extrait lors de la fixation.

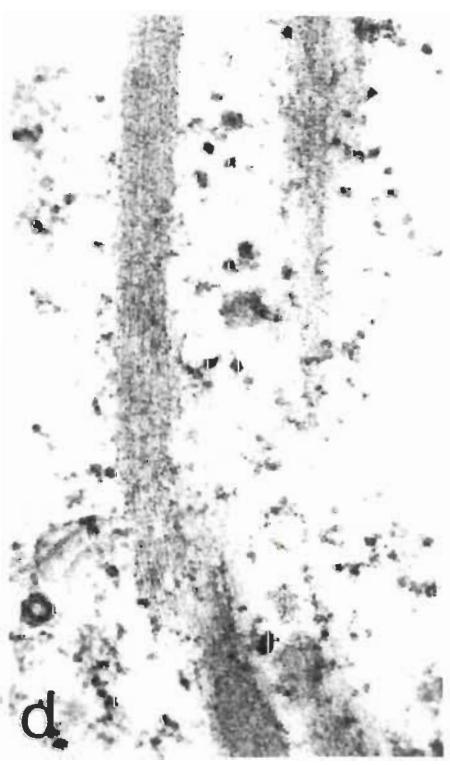
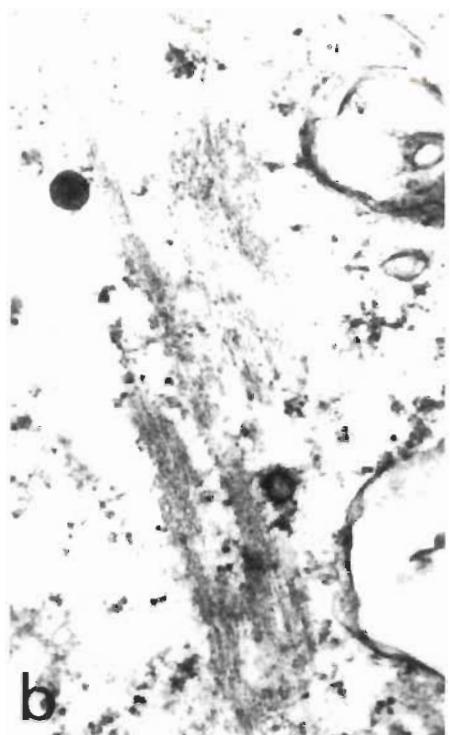
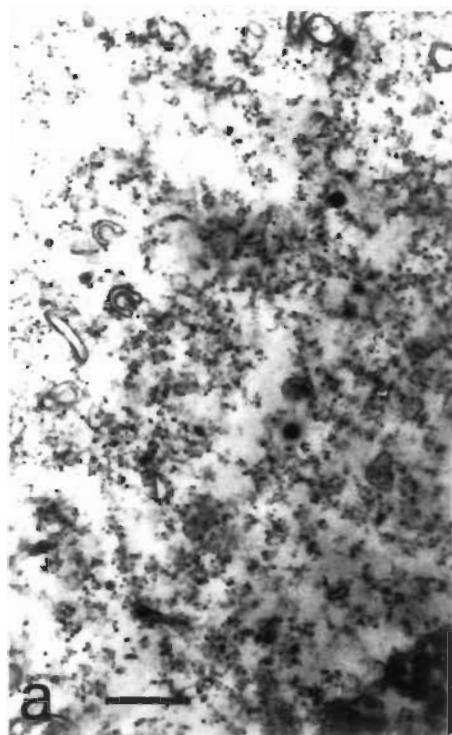
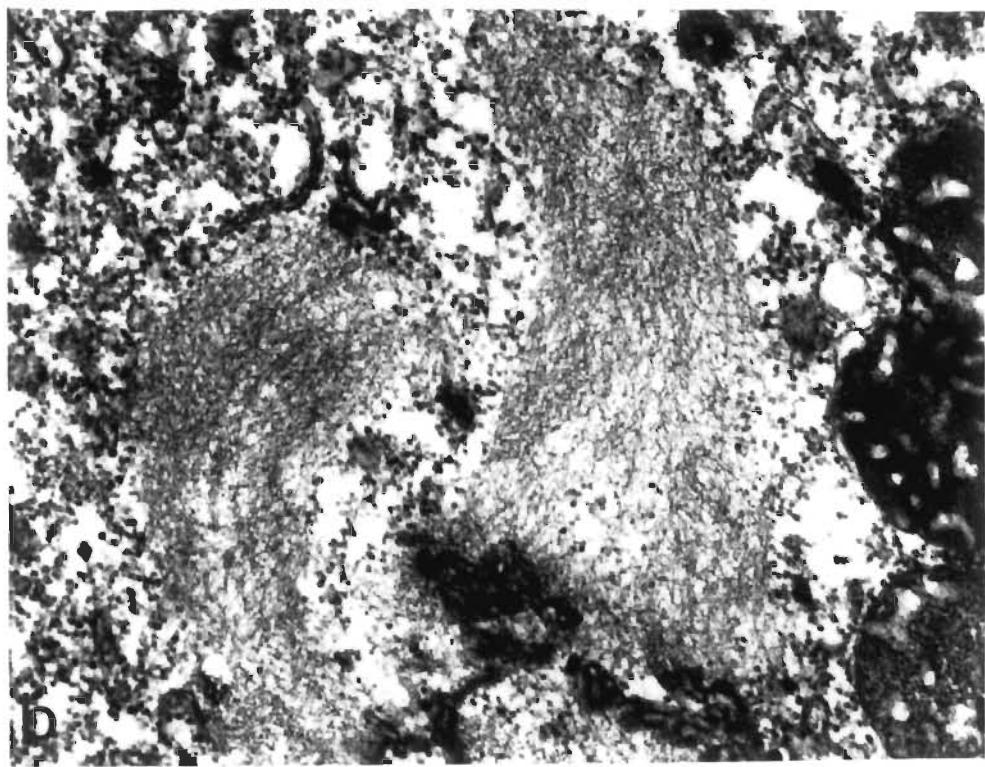
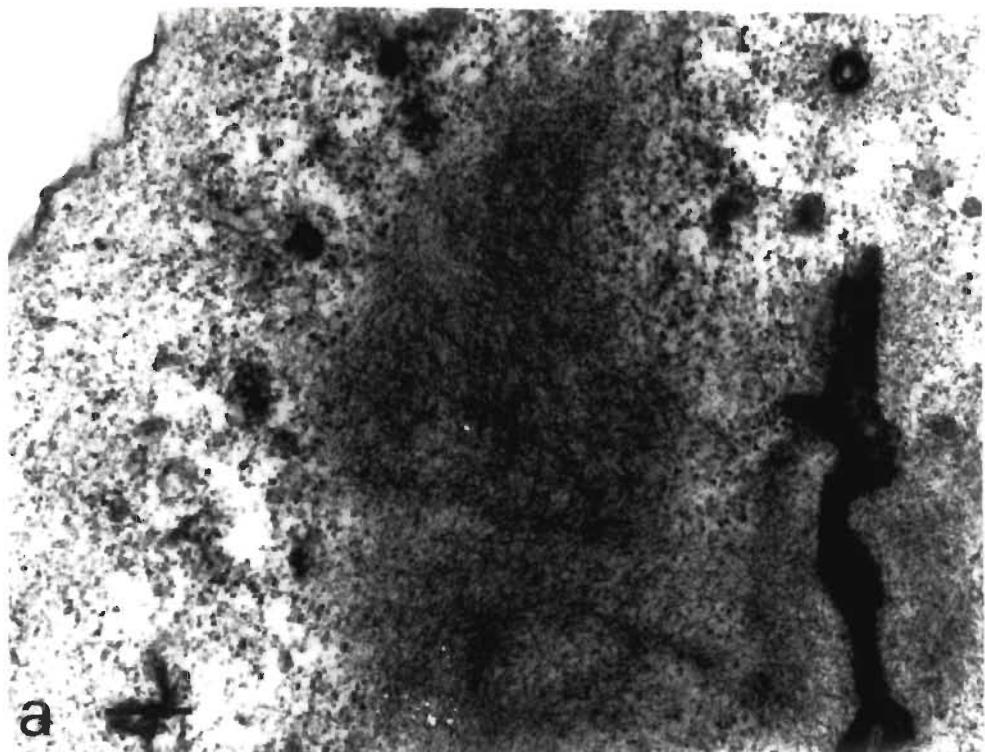


Figure 32. Détails du cytoplasme d'amibes traitées à la viroisine  
après perméabilisation. Fixation à la glutaraldéhyde.  
(x 35.000. Barre = 0,3 $\mu$ m.)

- a. Filaments d'actine organisés en réseaux aux mailles serrées à la limite entre la zone hyaline périphérique et la zone de regroupement des organites cellulaires.
- b. Détail de la figure 29-a. Ces buissons de filaments d'actine peuvent être interprétés comme des "câbles d'actine" coupés transversalement. Ces structures sont, elles aussi, localisées à la limite de la zone hyaline périphérique et de la zone où sont groupés les organites.



Par l'observation des coupes minces d'amibes traitées à la virotoxine, nous avons obtenu une confirmation que la viroisine agissait bien sur l'actine de l'amibe en la polymérisant d'une part et, d'autre part, en préservant l'actine F contre l'action destructrice du fixateur et surtout de l'acide osmique lors de la post-fixation.

Enfin, notons que comme pour la phalloïdine, l'addition de viroisine aux différents fixateurs utilisés n'a apporté aucune amélioration sensible à l'étape de fixation des cellules.

DISCUSSION1. La perméabilisation.

Nous avons utilisé, pour réaliser la perméabilisation d'Acanthamoeba castellanii deux types de détergents: la digitonine et le Nonidet P40.

Les complexants du cholestérol comme la digitonine sont utilisés assez fréquemment pour permettre des études biochimiques de métabolites (38) (43) (70). La digitonine nous a permis, à la concentration de 0,05%, de perméabiliser l'amibe vivante tout en évitant une perte trop importante du cytosol. En effet, à des concentrations supérieures à 0,1%, il se produit une solubilisation des phospholipides et de certaines protéines.

Les techniques d'observation que nous avons utilisées nous ont montré que la perméabilisation a permis à la phalloïdine et à la viroïsine de pénétrer dans la cellule.

Les détergents non ioniques, comme le Nonidet P40, sont surtout employés sur des cellules fixées, donc mortes, pour des études portant sur le cytosquelette en général, faisant appel aux techniques d'immunocytchimie. En effet, par dissolution de la membrane plasmique et extraction de la fraction soluble du cytoplasme, ce cytosquelette est plus accessible. Le Triton X 100 est très souvent choisi (97) (119) (122) (153), le Brej 58 également (89) (150), mais jamais, à notre connaissance, pour réaliser une perméabilisation vitale.

Les résultats décrits par les auteurs utilisant ces détergents n'indiquent pas une réelle différence dans leur efficacité. Aussi, nous avons choisi le Nonidet P40 qui, à une concentration de 0,1%, nous a permis de réaliser une perméabilisation vitale, comme nous l'avons montrée dans nos résultats.

Ceux-ci, obtenus avec 2 types d'agents perméabilisants sont tout à fait comparables. L'emploi préférentiel de l'un d'eux ne présente donc pas, à notre avis, un avantage réel.

Ainsi, nous avons répondu à une des interrogations que nous avions envisagées: La perméabilisation vitale d'*Acanthamoeba castellanii* est réalisable.

## 2. La fixation.

Cette opération est, et restera, l'étape la plus délicate de la préparation des cellules pour la microscopie électronique. En ce qui a trait à la fixation chimique des cellules, il existe une quantité impressionnante de recettes destinées à préserver au mieux l'ultrastructure cellulaire.

Pour notre part, nous avons constaté que les résultats obtenus avec les 2 aldéhydes étaient légèrement différents mais restaient complémentaires.

La formaldéhyde est utilisée en microscopie électronique pour des études sur le cytosquelette de cellules démembranées (9) (92) (122) (134), ou entières (169). Nous avons obtenu une bonne préservation des microfilaments d'actine mais, d'une manière générale, une préservation assez médiocre du cytoplasme. Néanmoins, cette extraction cytoplasmique

nous a permis de mettre en évidence des structures qui auraient pu être "dissimulées" ou mal aisées à distinguer dans un cytoplasme parfaitement conservé.

La glutaraldéhyde, très employée depuis une vingtaine d'années (144), peut exercer une destruction partielle de l'actine polymérisée (50) (95). Cependant, c'est avec cet aldéhyde que nous avons obtenu la meilleure qualité de fixation.

L'addition de phalloïdine ou de viroïsine aux fixateurs n'a pas amélioré la qualité de la préservation de l'actine. Des auteurs ont, semble-t-il, obtenu cette amélioration avec la phalloïdine (157) tandis que d'autres, en utilisant cette même toxine, ne l'obtiennent pas (154).

Il est possible que l'aldéhyde altère la toxine, lui faisant perdre ses propriétés vis-à-vis de l'actine, ou bien que le mélange de toxine et d'aldéhyde ne protège pas suffisamment la F-actine des effets destructeurs de l'acide osmique lors de la postfixation.

Signalons que, dans le but d'améliorer une fixation, les toxines d'Amanita virosa ne sont pas les seules substances utilisées. L'acide tannique (90) (109) (152), la collidine (33) (141) (185), des amines (15) (65) sont employés, et certains auteurs incorporent dans leur fixateur des composés susceptibles d'en accélérer l'efficacité par une pénétration plus rapide, comme la saponine (108) ou le D.M.S.O. (Diméthylsulfoxyde) (146).

### 3. La post-fixation.

L'acide osmique possède, on le sait, une action destructrice de l'actine F in vitro (110).

Nos observations ont révélé que, par l'action de la phalloïdine ou de la viroïsine, in vivo, chez Acanthamoeba castellanii, l'actine F pouvait être mise en évidence sur coupes minces alors qu'il était très difficile d'en observer sur des amibes non soumises à l'action de ces toxines.

La présence de filaments dans les homogénats cellulaires d'amibes témoins nous amène à répondre affirmativement à une autre de nos interrogations: Les toxines stabilisent in vivo le polymère d'actine contre l'action de l'acide osmique ou des protéases.

Ces résultats semblent en accord avec certaines données obtenues précédemment par des chercheurs du laboratoire où nous avons travaillé (49) (50) (52).

Il nous paraît important de signaler la corrélation entre ces résultats, obtenus in vitro avec une actine musculaire purifiée, et les nôtres, obtenus in vivo sur une amibe.

De plus, ces données globales in vitro et in vivo montrent qu'un effet comparable est exercé par des molécules de structures dissemblables, sur des actines d'origine fort différente.

L'addition de toxines à la solution de post-fixation nous a fourni des résultats peu reproductibles et trop hétérogènes pour être exposés et interprétés, mais il nous semblerait intéressant que les conditions de ces expériences fussent mises au point.

#### 4. Effets des toxines.

Lorsque les cellules ont subi les traitements destinés à rendre perméable leur membrane plasmatische, les toxines qui ont été appliquées

ont entraîné, nous l'avons vu, un changement très net de la morphologie et des modifications de l'ultrastructure d'Acanthamoeba castellanii. Les effets observés nous permettent donc de répondre, ici aussi, par l'affirmative à la 3<sup>e</sup> interrogation de notre problématique.

#### 4.1 Modifications morphologiques.

En comparant les observations effectuées sur les amibes témoins et sur les amibes perméabilisées avec celles provenant des cellules traitées aux toxines, il ne fait aucun doute qu'un effet de ces toxines est à l'origine des modifications observées en microscopie optique.

En ce qui concerne la phalloïdine, nous avons obtenu des résultats comparables à ceux publiés par l'équipe de WEILAND (176) qui micro-injecte de la phalloïdine dans Amoeba proteus. Ces auteurs montrent que la phalloïdine microinjectée inhibe les courants cytoplasmiques de l'amibe. L'effet de cette toxine se manifeste par un ralentissement progressif de ces courants avec la contraction d'une couche filamentuse submembranaire qui migre vers le centre de la cellule, séparant une zone hyaline périphérique d'une zone granuleuse où sont regroupés les organites (161).

Nous avons mis en évidence sur Acanthamoeba castellanii, avec de la phalloïdine ou de la viroïsine à une concentration de  $10^{-3} M$ , ces mêmes impacts sur la motilité cellulaire. Cependant, nous n'avons jamais observé de spasmes contractiles au cours du traitement de nos amibes par les toxines.

Avec une concentration de  $10^{-4} M$  en phalloïdine ou en viroïsine, nos observations nous amènent à penser que l'effet de ces substances dépend de la concentration. Comme chez toute cellule, l'état physiologique et l'hétérogénéité intraspécifique naturelle entraînent des varia-

tions autour d'une valeur "seuil" que l'on peut estimer à  $10^{-4}$  M pour les 2 toxines; l'effet paralysant observé à une concentration de  $10^{-3}$  M étant irréversible.

#### 4.2 Modifications ultrastructurales.

Contrairement à Amoeba proteus dont l'ultrastructure est bien connue grâce aux expériences nombreuses et variées dont cette amibe a été, et continue d'être l'objet (67) (157) (161), Acanthamoeba castellanii a surtout été utilisée pour des recherches biochimiques.

Certaines de nos observations confirment la structure fine de cette amibe, décrite dans une étude déjà ancienne (14). En particulier, nous avons retrouvé les caractéristiques d'un cytoplasme riche en granules de glycogène, en gouttelettes lipidiques et en ribosomes, libres ou associés en polysomes; la présence d'une vacuole contractile, de vacuoles digestives; l'importance du volume nucléolaire au sein d'un nucléoplasme dense; et les mitochondries de formes variées et de répartition uniforme dans une cellule limitée par une membrane, classiquement trilaminaire, ne comprenant pas de glycocalyx externe.

Au sein de certaines mitochondries, nous avons pu mettre en évidence des "corpuscules sombres" qui pourraient être en relation avec des mécanismes de contrôle de la respiration cellulaire (117) (119). Ce granule, opaque aux électrons, n'a jamais été observé chez Acanthamoeba castellanii. Il a cependant été décrit chez Acanthamoeba palestinensis, une espèce voisine(91).

En ce qui concerne les éléments cytosquelettiques, nous avons pu observer des microtubules, libres ou associés à un matériel dense qui peut être assimilé à un centrosome.

Comme les auteurs de l'étude ultrastructurale d'Acanthamoeba

castellanii, précédemment citée, nous n'avons pas pu mettre en évidence des filaments épais de type myosine, aussi bien dans les homogénats cellulaires que sur les coupes minces. Les myosines de cette amibe représentent environ 1,5% des protéines totales de la cellule. La myosine II n'y participe que pour un quart et elle est, rappelons-le, la seule susceptible de former des filaments dans les conditions physiologiques de force ionique (139). Ces filaments sont cependant plus courts que les filaments de myosine généralement rencontrés dans les cellules motiles non musculaires, qui ont une taille d'environ 300nm. De plus, ces filaments possèdent une largeur de 6 à 7nm équivalente à celle des filaments d'actine, ce qui rend extrêmement difficile toute reconnaissance en coupe mince ou en coloration négative. Il faut ici préciser que POLLARD (132) fait une distinction entre des filaments "fins" de myosine II et des filaments "épais" de cette même myosine. Ces derniers sont en fait des associations de filaments "fins" de myosine II, mais ils n'ont été obtenus qu'in vitro. In situ, aucun filament de myosine n'a jamais été, jusqu'à aujourd'hui, mis en évidence sur coupes minces, ou en coloration négative d'homogénats bruts d'Acanthamoeba castellanii.

Par coloration négative d'homogénats d'amibes non traitées par les toxines, on décèle la présence de F-actine, alors qu'aucune structure filamenteuse n'est visible sur les coupes minces de ces mêmes amibes. Cette quantité d'actine filamenteuse est faible car on sait que l'équilibre G actine  $\rightleftharpoons$  F actine est très dynamique. Sur coupes minces, les filaments peuvent souvent être coupés transversalement et donc n'être "visibles" que sous la forme des points.

Par contre, chez les amibes traitées aux toxines, on peut visualiser des faisceaux de filaments parallèles à la base d'acanthopodes ou

dans quelques microspikes résiduels; ces excroissances étant, rappelons-le, des signes de vitalité cellulaire même si chez ces cellules, ils sont transitoires. Ceci amène deux conclusions:

- On admet généralement que les microspikes et les acanthopodes sont ultrastructurallement constitués de faisceaux de filaments parallèles d'actine qui conduisent la force motrice nécessaire à leurs émissions. Nos observations apportent une confirmation de cette hypothèse.
- Grâce aux toxines que nous avons utilisées, il a été possible de visualiser ces structures nécessaires au mouvement amiboidé. On peut donc considérer que la phalloïdine et la viroïsine exercent un effet stabilisateur sur le polymère d'actine, en empêchant sa destruction par les traitements chimiques que subissent les amibes lors de la fixation et de la post-fixation.

Antérieurement nous avons précisé que l'action des toxines entraînait, finalement, un arrondissement des cellules après la disparition des acanthopodes et des microspikes, puis l'arrêt des mouvements cytoplasmiques, l'amibe s'étant immobilisée.

Sur coupes minces, on observe une très nette différenciation entre l'ectoplasme, périphérique et granuleux, ne contenant aucun organite, et l'endoplasme, plus dense et plus complexe, regroupé au centre de la cellule. Ces résultats ultrastructuraux sont comparables à ceux obtenus par l'équipe de STOCKEM (161).

Nous avons observé, en microscopie électronique, de l'actine filamenteuse sous divers aspects, après traitement d'*Acanthamoeba castellani* par les 2 toxines.

\* Des microfilaments associés en faisceaux serrés qui se présentent comme des paracristaux d'actine intracytoplasmiques mentionnés

dernièrement par certains auteurs (123). Ces structures n'ont jamais été décrites chez une amibe après action d'une toxine d'Amanita virosa.

- \* Des microfilaments d'actine alignés parallèlement le long de la membrane plasmique, parfois associés à des microtubules.
- \* Des "bundles" d'actine et de microtubules, localement adhérents à la membrane cytoplasmique .
- \* Des réseaux aux mailles plus ou moins lâches d'actine filamentueuse, localisés dans le cytoplasme.

Les différents états de l'actine F que nous venons de décrire chez Acanthamoeba castellanii nous permettent d'être en accord avec certaines des observations que STOCKEM a effectué sur Amoeba proteus.

Il existe dans la cellule de l'actine G, donc non polymérisée, qui, sous l'influence de la phalloïdine ou de la viroïsine, polymériserait en réseaux ou en "bundles". Ces 2 types de structures se forment dans la partie corticale, ou zone hyaline, de la cellule, ce qui entraîne un déplacement et une "séquestration" des organites vers le centre de la cellule. Cependant, chez Acanthamoeba castellanii, cette séquestration ne semble pas être le résultat d'une contraction.

Les toxines d'Amanita virosa entraînent des effets sur la polymérisation de l'actine mais aussi, semble-t-il, sur une interaction latérale des filaments. On ne peut, dans l'état actuel de nos connaissances, établir si l'effet porte directement sur des "actin-binding" protéines ou indirectement sur des métabolites dont on sait qu'ils peuvent induire l'apparition de paracristaux, comme l'AMP cyclique par exemple (123).

Enfin, il se peut que la phalloïdine ou la viroïsine induise di-

rectement la polymérisation de l'actine sous forme de filaments qui se structureraient en paracristaux selon un mécanisme jusqu'ici inconnu.

La coloration à la N.B.D. phallacidine nous a permis d'observer des câbles d'actine qui correspondent aux "stress fibers" caractérisées sur coupes minces. Ces structures sont révélées par les toxines puisqu'elles ne sont visibles que sur les amibes soumises à leur action.

Les amibes témoins doivent cependant posséder, outre la fraction soluble d'actine, une certaine quantité de cette protéine sous forme polymérisée. Nous avons vu que les acanthopodes et les microspikes possédaient ces structures constitutives. Nous pensons qu'il est envisageable que les "stress fibers" observées soient constitutives de la cellule et que cette "charpente" puisse être mise en évidence par la combinaison des effets polymérisant et protecteur des toxines. D'ailleurs, les amibes subissent, avant leur coloration à la N.B.D. phallacidine, une fixation chimique et thermique et il est intéressant de constater que les toxines, ici aussi, stabilisent le polymère, qu'elles en induisent ou pas la formation.

L'absence de fluorescence chez les amibes témoins, non soumises à l'action de la toxine, confirme la labilité physiologiquement nécessaire des "câbles" et indique, d'autre part, que le fluorochrome que nous avons utilisé peut colorer les filaments d'actine stabilisés par une des toxines, ainsi que ceux dont elles ont provoqué la formation.

Comme nous l'avons déjà mentionné, la pénétration de la phalloïdine ou de la viroïsine provoque, chez *Acanthamoeba castellanii*, l'apparition de protusions cytoplasmiques hyalines (blebs) qui est concomitante de la disparition des microspikes et des acanthopodes répartis généralement sur toute la cellule. Les "câbles" observés en fluorescence pour-

raient être constitués par l'association des faisceaux de filaments parallèles observés à la base des acanthopodes et dans les microspikes, "rigidifiés" par la toxine employée.

A notre avis, il serait souhaitable d'entreprendre des études utilisant des cellules perméabilisées et viables pour y déceler l'effet de molécules marquées comme celle que nous avons utilisée (8) (159), ou comme la rhodaminyl phalloïdine (73) (111), puis de comparer les résultats obtenus avec ceux des coupes minces réalisées sur ces mêmes cellules.

### 5. Mode d'action des toxines.

Des études portant sur l'action de la phalloïdine et de la viroïsine sur l'actine F in vitro, ou in vivo sur des hépatocytes (40) (51), montrent que les effets des 2 toxines sont globalement équivalents.

Cependant, FAULSTICH et ses collaborateurs ont montré que la phalloïdine, rigide de par sa structure bicyclique, présente une plus grande affinité pour l'actine F par rapport à la viroïsine; cette dernière est plus flexible car monocyclique. La présence de groupements hydroxyles supplémentaires chez la virotoxine suggère que son mode d'interaction est différent de celui de la phalloïdine, bien que l'effet final soit équivalent sur l'actine.

A l'heure actuelle, aucune étude n'a porté sur l'action de toxines extraites d'Amanita virosa sur des cellules amiboides entières.

Pour notre part, nous supposons que la phalloïdine et la viroïsine interagissent avec l'actine d'Acanthamoeba castellanii de 2 manières simultanées:

1- Les toxines stabilisent l'actine filamenteuse cytoplasmique, provoquant ainsi la conservation de structures très organisées comme les filaments acanthopodiaux, les "stress fibers" ou les réseaux. On sait, en effet, que la phalloïdine évite la dépolymérisation des filaments d'actine (31) (96) (181), ayant un effet marqué à la fois sur la vitesse d'elongation et sur la concentration critique à l'extrémité de nette dépolymérisation du filament (24) (39). La coloration négative de broyats d'Acanthamoeba castellanii nous a montré, comme chez Amoeba proteus (125) (126), une faible quantité d'actine F, chez des cellules non soumises à l'action protectrice de la toxine; pourtant, l'actine de l'amibe que nous avons choisie représente environ 14% des protéines totales de la cellule, ce qui en fait une des cellules non musculaires les plus riches en actine (130). Une activité protéasique est peut-être à l'origine de cette faible quantité de filaments. On ne peut déterminer les proportions respectives de l'équilibre de l'actine  $G \rightleftharpoons F$  qui est en perpétuel déplacement en fonction de l'activité de cette cellule extrêmement motile. De plus, chaque fois que les amibes sont manipulées, et à plus forte raison lorsqu'elles subissent les divers traitements que nous avons décrits, cet équilibre est modifié, rendant impossible toute étude quantitative.

2. La phalloïdine et la viroïsine sont capables d'induire, in vitro, la polymérisation de l'actine G (31) (173). On est donc en droit de penser que cette polymérisation peut se produire in vivo, entraînant ainsi l'apparition de filaments d'actine, organisés en faisceaux parallèles serrés ou non et en réseaux plus ou moins

lâches, du même type que ceux observés lors de la microinjection de phalloïdine.

Il est difficile d'être catégorique dans la répartition de ces structures de générations différentes; cependant nous pensons que les paracristaux sont le résultat d'un effet de la toxine car physiologiquement, on a du mal à concevoir le rôle de ces structures très rigides dans une cellule très motile.

Enfin, il est probable que, comme toute substance interférente avec l'actine, il y ait une relation dose-effet qu'il serait intéressant de déterminer chez Acanthamoeba castellanii.

#### 6. Influence des toxines sur la motilité cellulaire.

Les courants cytoplasmiques de la cellule vivante impliquent une participation effective de l'équilibre G-actine  $\rightleftharpoons$  F-actine. On comprend donc que l'introduction d'une drogue le déplaçant complètement et de façon irréversible entraîne, pour la cellule, une immobilisation qui est mortelle à court terme.

Nous avons jusqu'ici évoqué les effets de la phalloïdine et de la viroïsine sur l'actine ainsi que leur éventuelle action sur des "actin binding" protéines. L'étude biochimique d'hépatocytes traités à la phalloïdine montre que cette molécule entraîne une inhibition de la phosphorylation oxydative dans les mitochondries (69), un dérèglement de la fonction de ces organites (112) et un appauvrissement de la cellule en ATP (148) (180). Nous avons, rappelons-le, observé chez Acanthamoeba castellanii une modification de la forme de mitochondries après traitement des cellules avec une toxine. D'autre part, une étude récente réa-

lisée sur le cytoplasme démembrané d'Amoeba proteus (125) démontre l'influence du pH et de la concentration d'ATP sur la motilité du cytoplasme et sur l'état de polymérisation de l'actine. Il ressort de cette étude que le cytoplasme motile contient de l'actine peu polymérisée en filaments courts, libres ou pontés en réseaux, tandis que le cytoplasme non motile révèle la présence de nombreux filaments d'actine, longs, arrangés en faisceaux parallèles.

D'autres résultats biochimiques obtenus à partir d'hépatocytes soumis à l'action de la phalloïdine révèlent que cette toxine entraîne un appauvrissement cellulaire en ions calcium (41). On connaît l'importance quantitative de cet ion dans la régulation de la motilité (21) et la théorie de TAYLOR, élaborée à partir d'expériences menées sur Dictyostelium discoideum et Chaos carolinensis, implique de manière fondamentale ce cation et/ou les protons dans l'hypothèse de la contraction couplée à la solation du gel d'actine (166). La présence d'une certaine concentration seuil de calcium ou l'élévation de cette concentration ainsi que les variations de pH seraient nécessaires à la solation partielle du gel d'actine. Les réseaux que nous avons observés pourraient être une illustration de ce gel partiellement relâché. De plus, la contraction qui est à l'origine de tout mouvement cellulaire pourrait alors se produire et les faisceaux de filaments d'actine serviraient à transmettre la tension contractile mais ne pourraient être, en aucun cas, le siège d'une contraction. Les "stress fibers" que nous avons mis en évidence joueraient ce rôle dans l'amibe, qu'elles soient localisées dans les acanthopodes, dans les microspikes ou réparties dans tout le volume cellulaire. Nos résultats sont donc en accord avec cette théorie puisque la polymérisation définitive de l'actine par l'action, directe ou non, d'une toxine

entraîne, finalement, un arrêt de la motilité cellulaire chez Acanthamoeba castellanii, après ralentissement des mouvements intracytoplasmiques provoqués par une polymérisation progressive de l'actine.

Nos observations, réalisées à l'aide de techniques complémentaires confirment qu'il existe une relation très étroite entre l'état de polymérisation de l'actine et la motilité du cytoplasme et, par conséquence, de la cellule. Si on excepte dans la cellule la proportion de l'actine mobilisée dans le cytosquelette, on peut considérer que la majorité de l'actine est impliquée dans la motilité cellulaire, et le mouvement amiboidé plus particulièrement.

Nous avons, dans l'introduction, exposé un certain nombre de théories du mouvement amiboidé. Ces théories ont surtout été élaborées à partir d'observations sur Amoeba proteus ou Chaos carolinensis.

Les résultats que nous avons exposés peuvent être partiellement intégrés dans la théorie de la contraction corticale de STOCKE!. En effet, nous retrouvons chez Acanthamoeba castellanii certaines figures obtenues par le groupe allemand chez Amoeba proteus après action de la phalloïdine:

- Un ralentissement progressif des mouvements intracytoplasmiques après immobilisation de la cellule.
- L'apparition de protusions cytoplasmiques hyalines ou blebs, subseqüemment aux modifications de la motilité et précédant l'arrondissement de l'amibe.
- La différenciation d'une zone hyaline périphérique et un regroupement des organites en une zone centrale.
- La présence, en microscopie électronique, de longs et nombreux fila-

ments d'actine organisés en faisceaux parallèles ou en réseaux, et localisés à la limite des 2 zones évoquées.

Mais l'amibe que nous avons utilisée présente, par rapport à Amoeba proteus, un certain nombre de différences tant par sa morphologie et son organisation ultrastructurale, que par les résultats que nous avons obtenus après application des toxines.

- Acanthamoeba castellanii ne possède pas d'uroïde différenciée.
- Cette amibe du sol émet un grand nombre de microspikes et d'acanthopodes qui sont répartis uniformément sur le pourtour de la cellule, destinés à faciliter ses déplacements et son alimentation.
- In situ, aucune observation n'a été faite sur la myosine ni sur une couche filamenteuse corticale continue.
- Aucun spasme contractile n'a été observé lors de l'action de la phalloïdine ou de la viroïsine.
- Après action des toxines, des câbles répartis dans toute la cellule ont été mis en évidence par coloration spécifique de l'actine F à la N.B.D. phallacidine puis retrouvés en coloration négative et sur coupes minces, après action des toxines.
- Des paracristaux d'actine ont pu être visualisés en microscopie électronique après traitement des amibes aux toxines.

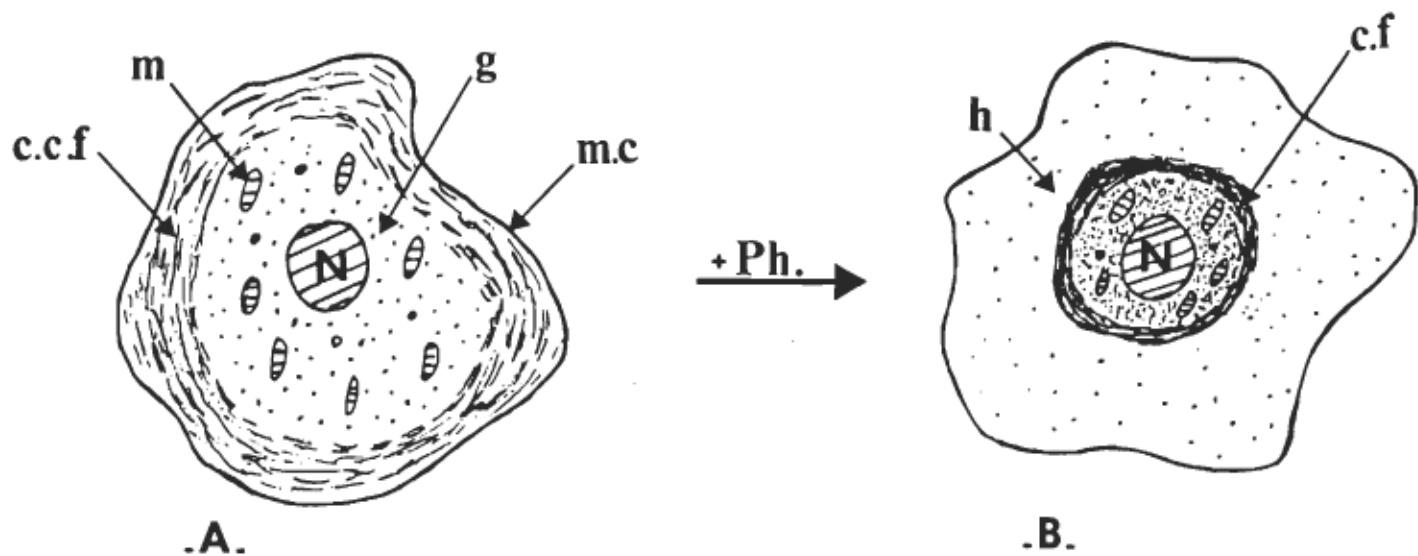
C'est en considérant ces différences que nous sommes amenés à proposer 2 modèles afin d'intégrer les résultats que nous avons obtenus.

#### 7. Modèles de l'organisation protoplasmique d'amibes.

Afin de faciliter la comparaison, nous allons exposer brièvement

le modèle de STOCKEM (161).

7.1 Modèle d'Amoeba proteus.

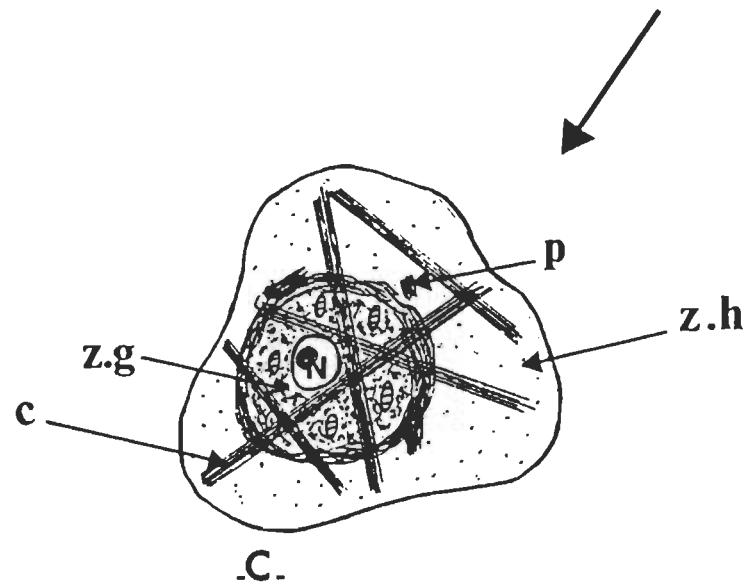
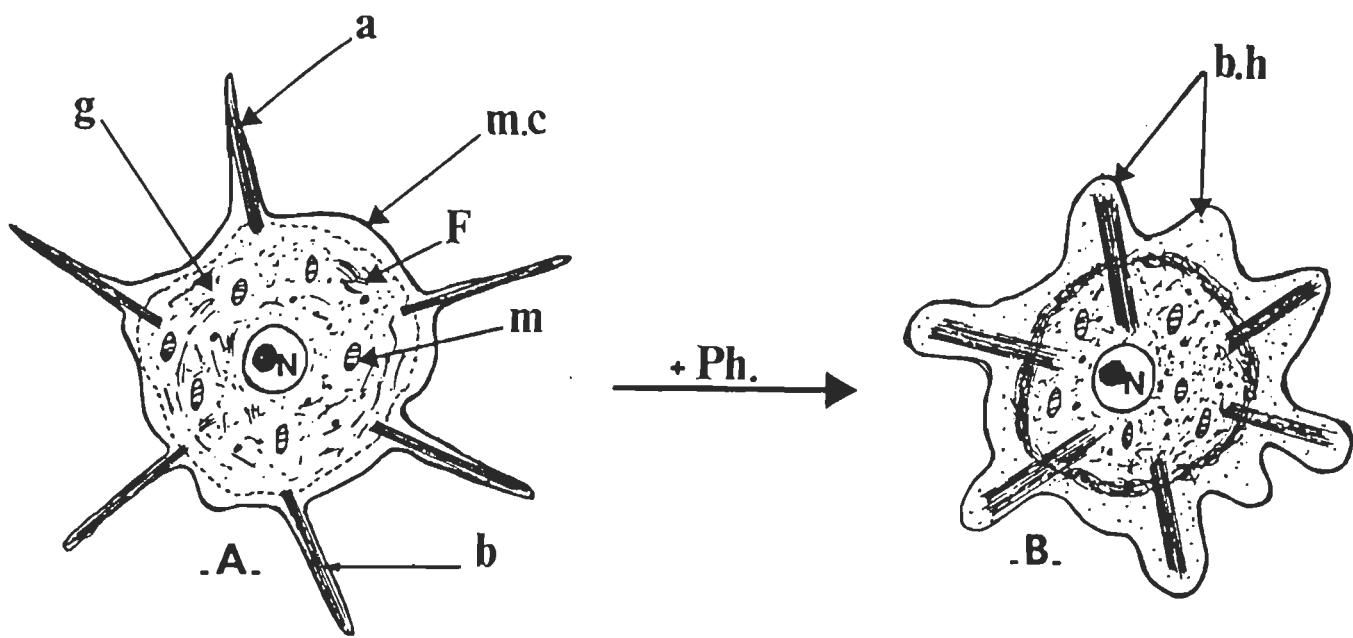


A: La couche corticale filamenteuse (c.c.f.) induite par la phalloïdine est accolée à la membrane cytoplasmique (m.c.). Le granuloplasme (g) uniformément réparti dans toute la cellule contient le noyau (N), les mitochondries (M) ainsi que les autres organites.

B: La couche filamenteuse (c.f.), composée de filaments d'actine et de myosine migre vers le centre de la cellule après s'être décollée de la membrane cytoplasmique. Elle forme un "filet" aux mailles serrées qui concentre les organites en une zone centrale très granuleuse ; cette concentration entraîne l'apparition d'une zone hyaloplasmique périphérique (h).

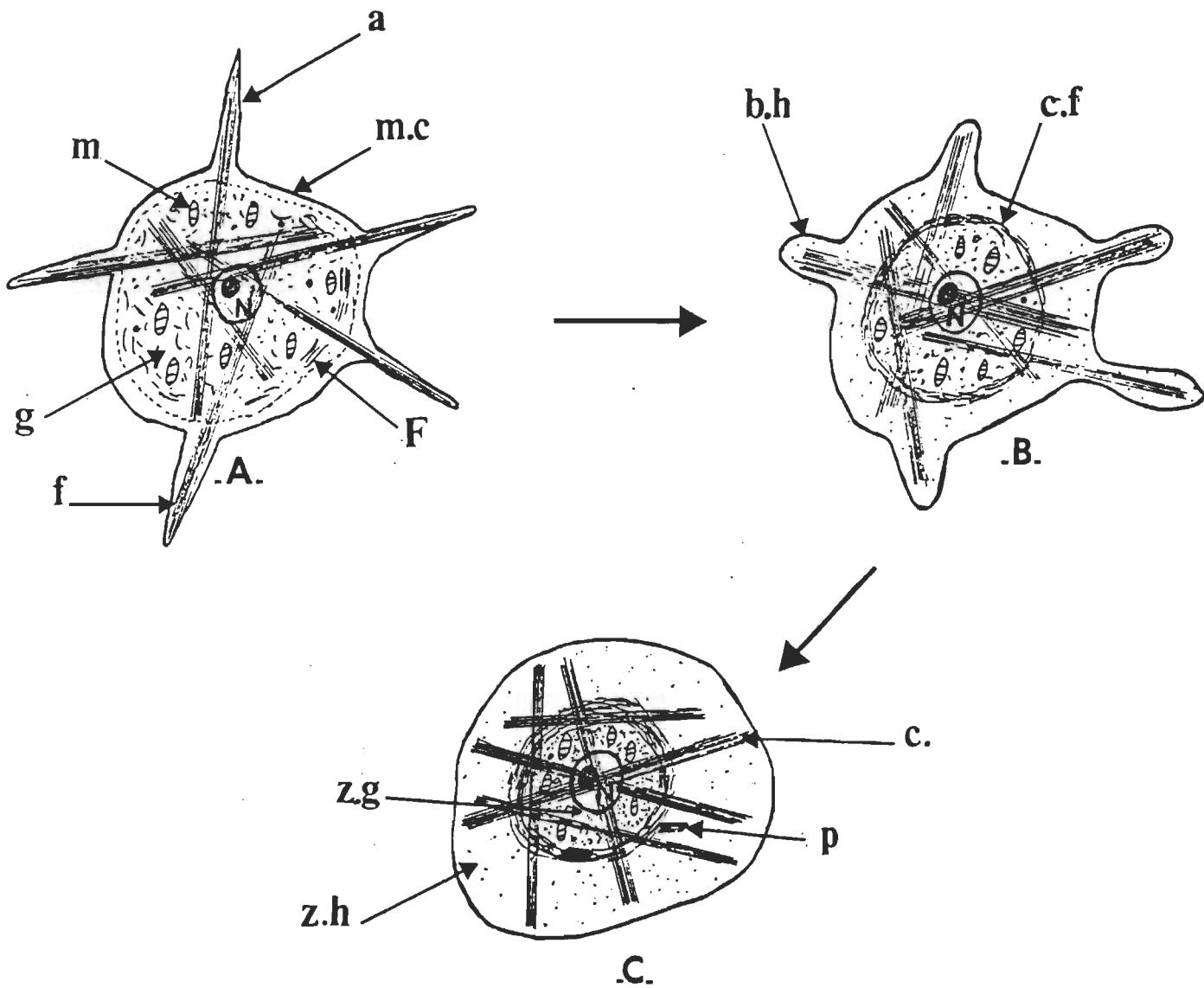
7.2 1<sup>er</sup> Modèle d'Acanthamoeba castellanii soumise à l'action de la phalloïdine (48).

- A. Les acanthopodes (a) sont formés de "bundles" (b) de microfilaments d'actine alignés parallèlement qui sont labiles pour permettre à la cellule de se mouvoir. Le cytoplasme, limité par la membrane cellulaire (m.c.) contient les organites, dont les mitochondries (m) et le noyau (N). Le granuloplasme (g) comporte aussi de l'actine sous forme G et de l'actine F (F), impliquées dans l'équilibre dynamique de cette protéine contractile.
- B. Sous l'effet de la phalloïdine (Ph.), l'équilibre G-actine ↔ F-actine est déplacé vers la forme polymérisée. Les mouvements cytoplasmiques vitaux ne s'interrompent pas immédiatement, des tensions sont créées et la membrane forme des protusions qui se remplissent de hyaloplasme. Il apparaît ainsi des blebs hyalins (b.h.).
- C. Les blebs fusionnent et il apparaît une zone hyaline périphérique (z.h.). La polymérisation de l'actine cytoplasmique produit des paracristaux (p.) et des faisceaux de filaments d'actine alignés. Ces derniers seraient, avec les bundles rigidifiés des acanthopodes à l'origine des "câbles" (c) répartis dans toute la cellule. Une couche filamenteuse séquestre les organites en une zone granuleuse centrale (z.g.).
- A. Amibe non traitée à la phalloïdine
- B.C. Amibes traitées à la phalloïdine.



7.3 2<sup>e</sup> modèle d'Acanthamoeba castellanii soumise à l'action de la phalloïdine.

- A. L'amibe possède une charpente intracellulaire constituée de filaments d'actine organisés en faisceaux parallèles (f) répartis dans toute la cellule et dont certaines terminaisons forment des acanthopodes (a) ou des microspikes. Le cytoplasme contient de l'actine sous forme monomérique G et polymérique (F) en équilibre, et des organites comme les mitochondries (m) ou le noyau (N). Ceux-ci sont répartis dans tout le granuloplasme (g) limité par la membrane cellulaire (n.c.).
- B. La phalloïdine (Ph) entraîne une polymérisation de l'actine cytoplasmique, (en particulier au niveau de la couche corticale) filamentuse (c.f.), et une rigidification des bundles cytosquelettiques. Les tensions intracellulaires provoquées par les mouvements vitaux de la cellule en cours de "paralysie" entraînent l'apparition de blebs hyalins (b.h.).
- C. Les blebs fusionnent pour former la zone hyaline périphérique (z.h.) tandis que la couche filamentuse corticale emprisonne au centre de la cellule, dans la zone granuloplasmique (z.g.) les organites. Les paracristaux (p) sont visibles à ce stade de l'action de la toxine. Les bundles, d'origine acanthopodiale ou néoformés sont répartis dans toute la cellule et rigidifiés par la toxine et forment des câbles (c).
- A. Amibe non traitée à la phalloïdine
- B.C. Amibes traitées à la phalloïdine.



## CONCLUSION

L'étude que nous avons réalisée nous a permis, dans un premier temps, de mettre au point une technique de perméabilisation vitale d'Acanthamoeba castellanii. Celle-ci peut être menée aussi bien avec la digitonine qu'avec le Nonidet P40.

A notre connaissance, c'est la première fois que ce type de technique est appliquée, avec succès, à une amibe.

Nous avons montré par la suite que la phalloïdine et la viroïsine pouvaient pénétrer dans les cellules perméabilisées et y stabiliser l'actine filamentuse.

Cette stabilisation s'opère, in situ, sur l'actine F qui est présente, déjà, dans la cellule et sur les filaments dont la formation a été induite par l'effet des toxines. Cet effet peut être direct par polymérisation de l'actine G et indirect par l'intermédiaire de métabolites ou d'"actin-binding" protéines dont on sait qu'elles sont nombreuses chez cette amibe.

La stabilisation des filaments d'actine par les toxines, en particulier contre l'effet destructeur de l'acide osmique, avait été mise en évidence in vitro mais jamais in vivo sur des cellules entières.

Il est, néanmoins, assez difficile de séparer l'action stabilisatrice des toxines d'Amanita virosa de leurs effets propres sur le degré de polymérisation de l'actine. Les effets des toxines entraînent, chez Acanthamoeba castellanii perméabilisée, des transformations de l'ultra-structure qui sont tout à fait comparables à celles obtenues par micro-injection de phalloïdine dans Amoeba proteus, comme l'apparition de nom-

breux microfilaments d'actine organisés en réseaux ou en faisceaux. La conséquence de ces transformations se retrouve au niveau de la morphologie des amibes traitées avec ces toxines chez lesquelles des modifications physiologiques et morphologiques peuvent être mises en évidence, comme la disparition des acanthopodes, l'arrêt des mouvements cellulaires et la séparation du cytoplasme en 2 zones différenciées.

Cependant, la formation de paracristaux n'a jamais été rapportée chez une amibe.

D'autre part, après application des toxines, nous avons pu mettre en évidence des câbles d'actine répartis dans toute la cellule. Ces observations apportent de nouveaux éléments pour tenter de mieux comprendre l'organisation interne de l'amibe que nous avons utilisée, dont la biochimie des protéines impliquées dans la motilité est bien connue.

A la quatrième question que nous avions envisagée, nous répondrons positivement: Les observations réalisées traduisent un effet réel des toxines sur l'amibe. Peu d'études sont entreprises pour établir les liens entre les données biochimiques concernant cette amibe et sa motilité. Tous nos résultats, corroborés par l'utilisation de techniques complémentaires, apportent des preuves additionnelles à l'existence de la relation entre l'état de polymérisation de l'actine et la motilité du cytoplasme, et donc de la cellule.

Mes résultats ne sont pas en contradiction avec la théorie de la contraction corticale de STOCKEM ni avec l'hypothèse du groupe de TAYLOR, généralement admise aujourd'hui, de la contraction liée à la sola-

tion du cytoplasme.

Néanmoins, l'absence de données sur la présence et la localisation in situ de la myosine chez Acanthamoeba castellanii reste un handicap à une compréhension plus avancée du mécanisme moléculaire du mouvement amiboidé chez cette cellule.

À notre avis, celle-ci pourrait être envisagée par l'utilisation de molécules marquées (74) (86) (147) (158) et surtout par l'emploi de techniques immunocytochimiques (94) (133) (160) (175).

BIBLIOGRAPHIE

1. ALBANESI, J.P.; HAMMER III, J.A.; KORN, E.D. (1983). "The interaction of F-actin with phosphorylated and unphosphorylated Myosin IA and IB from Acanthamoeba castellanii". *J. Biol. Chem.* 258: 10176-10181.
2. ALLEN, R.D. (1961). "A new theory of ameboid movement and protoplasmic streaming". *Exp. Cell Res.* 8: 17-31.
3. ALLEN, R.D. (1961). in "The Cell" J. Brachet et A.E. Mirsky Ed. Vol. II, p. 135. Academic Press. N.Y.
4. ALLEN, R.D. (1980). "Cytoskeletal ultrastructure and motility of cells". *Can. J. Botany* 58: 745-749.
5. ALLEN, R.D.; COOLEDGE, J.W.; HALL, P.J. (1960). "Streaming in cytoplasm dissociated from the giant amoeba Chaos chaos". *Nature* 187: 896-899.
6. ALLEN, R.D.; TAYLOR, D.L. (1975). in "Molecules and Movements". S. Inoue; R.E. Stephens Ed. pp. 239-257. Raven Press (450p.) N.Y.
7. ALTMANN, R. (1890). "Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen". Veit and Co. Leipzig.
8. BARAK, L.; YOCUM, R.R.; NOTHNAGEL, E.A.; WEBB, W.W. (1980). "Fluorescence staining of the actin cytoskeleton in living cells with 7-nitrobenz-2-oxa-1,3 diazole phallacidin". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 980-984.
9. BARAK, L.S.; YOCUM, R.R.; WEBB, W.W. (1981). "In vivo staining of cytoskeletal actin by auto internalization of non toxic concentrations of Nitrobenzoxadiazole-phallacidin". *J. Cell Biol.* 89: 368-372.

10. BASABE, J.R.; LEE, C.A.; WEISS, R.L. (1979). "Enzyme assays using permeabilized cells of Neurospora" Anal. Biochem. 92: 356.
11. BEERS, C.D. (1924). "Observations of Amoeba feeding on ciliate Frontonia". Brit. J. Exp. Biol. 1: 335-341.
12. BERGER, N.A.; JOHNSON, E.S. (1976). "DNA synthesis in permeabilized mouse L cells". Biochim. Biophys. Acta 425: 1-17.
13. BILLEN, D.; OLSON, A.C. (1976). "DNA replication in Chinese hamster ovary cells made permeable to nucleotide by Tween 80 treatment". J. Cell Biol. 69: 732.
14. BOWERS, B.; KORN, E.D. (1968). "The fine structure of Acanthamoeba castellanii. I. The trophozoite". J. Cell Biol. 39: 95-111.
15. BOYLES, J.K. (1982). "A modified fixation for the preservation of microfilaments in cells and isolated F actin". J. Cell Biol. 95: 287.a.
16. BROWN, S.; LEVINSON, W.; SPUDICH, A. (1976). "Cytoskeletal elements of chick embryo fibroblasts revealed by detergent extraction". J. Supramol. Struct. 5: 119-130.
17. BURGESS, G.M.; MCKINNEY, J.S.; FABIATO, A.; LESLIE, B.A.; PUTNEY, J.W. (1983). "Calcium pools in saponin-permeabilized guinea pig hepatocytes". J. Biol. Chem. 258: 15336-15345.
18. BURGESS-CASSLER, A.; ORDAL, G.W. (1983). "Permeabilization of Bacillus subtilis to chemotaxis methyltransferase II". J. Bact. 155: 907-909.
19. BUTSCHLI, O. (1892). "Untersuchungen über mikroskopische Schallme und das Protoplasma". W. Engelmann. Leipzig.
20. CLARKE, M.; SPUDICH, J.A. (1974). "Biochemical and structural studies of actomyosin-like proteins from non-muscle cells. Isolation

- and characterization of myosin from amoeba Dictyostelium discoideum". J. Mol. Biol. 85: 209-222.
21. COBBOLD, P.H. (1980). "Cytoplasmic free calcium and ameboid movement". Nature (London) 285: 441-446.
  22. COLLINS, J.H.; KORN, E.D. (1980). "Actin activation of  $Ca^{++}$  sensitive  $Mg^{++}$  ATPase activity of Acanthamoeba myosin II is enhanced by dephosphorylation of its heavy chain". J. Biol. Chem. 255: 8011-8014.
  23. COLLINS, J.H.; KORN, E.D. (1981). "Purification and characterization of actin-activatable  $Ca^{+2}$  sensitive myosin II from Acanthamoeba". J. Biol. Chem. 256: 2586-2595.
  24. COLLUCIO, L.M.; TILNEY, L.G. (1983). "Actin assembly and disassembly on isolated acrosomal bundles of Limulus sperm: Treadmilling and the action of phalloidin". J. Cell Biol. 97: 289a-1089.
  25. COMLY, L.T. (1973). "Microfilaments in Chaos carolinensis. Membrane association, distribution and heavy meromyosin binding in the glycerinated cells". J. Cell Biol. 58: 230-237.
  26. CONDEELIS, J.S. (1977). "The self-assembly of synthetic filaments of myosin isolated from Chaos carolinensis and Amoeba proteus". J. Cell Sci. 25: 387-402.
  27. CONDEELIS, J.S. (1981). "Reciprocal interactions between the actin lattice and cell membrane". Neurosci. Res. Prog. Bull. 19: 83-89.
  28. CONDEELIS, J.S.; TAYLOR, D.L. (1977). "The contractile basis of ameboid movement.V. The control of gelation, solation and contraction in extracts from Dictyostelium discoideum". J. Cell Biol. 74: 901-927.
  29. CONDEELIS, J.S.; SALISBURY, J.; FUJIWARA, K. (1981). "A new pro-

- tein that gels F-actin in the cell cortex of Dictyostelium discoideum". Nature (London) 292: 161-163.
30. CRAIG, S.W.; POLLARD, T.D. (1982). "Actin-binding proteins". Trends Biochem. Sci. 7: 88-92.
31. DANCKER, P.; LOW, I.; HASSELBACH, W.; WIELAND, T. (1975). "Interaction of actin with phalloidin: polymerization and stabilization of F-actin". Biochim. Biophys. Acta 400: 407-414.
32. DE VRIES, I.; SHAFFER, A.; FAULSTICH, H.; WIELAND, T. (1976). "Protection of actin from heat denaturation by various phallotoxins". Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357: 1139-1143.
33. DIONNE, S. (1984). Communication personnelle.
34. DUBINSKY, W.P.; COCKRELL, R.S. (1975). " $Ca^{+2}$  transport across plasma and mitochondrial membranes of isolated hepatocytes". FEBS Letters 59: 39-43.
35. DUJARDIN, F. (1835). "Recherches sur les organismes inférieurs". Ann. Sci. Nat. Zool. 4: 343.
36. ECKER, A. (1849). "Zur Lehre von Bau und Leben der kontraktilen Substanz der niedesten Thiere". Zeit. Wiss. Zool. Abst. A. 1: 218-245.
37. ELZINGA, M.; LU, R.C. (1976). "Comparative amino-acid sequence studies on actin" in "Contractile Systems in non muscle tissues". S.V. Perry Ed. Elsevier-North Holland. Biomedical pp. 29-37.
38. ENDO, M.; IINO, M. (1980). "Specific perforation of muscle cell membranes with preserved S.R. functions by saponin treatment". J. Muscle Res. Cell Mot. 1: 89-100.
39. ESTES, J.E.; SELDEN, L.A.; GERSHMAN, L.C. (1981). "Mechanism of action of phalloidin on the polymerization of muscle actin". Bio-

- chem. 20: 708-712.
40. FAULSTICH, H.; BUKU, A.; BODENMULLER, H.; WIELAND, T. (1980). "Vi-rotoxins: Actin-binding cyclic peptides of Amanita virosa mushrooms". Biochem. 19: 3334-3343.
41. FAULSTICH, H.; MUNTER, K.; MAYER, D. (1984). "Phalloidin depletes the mitochondrial  $Ca^{+2}$  compartment of hepatocytes". FEBS Letters 167: 241-244.
42. FECHHEIMER, M.; BRIER, J.; ROCKWELL, M.; LUNA, E.J.; TAYLOR, D.L. (1982). "A calcium and pH regulated actin binding protein from Dictyostelium discoideum". Cell Motility 2: 287-308.
43. FIFKOVA. (1982). "Cytoplasmic actin in neuronal processes as a possible mediator of synaptic plasticity". J. Cell Biol. 95: 345-350.
44. FISKUM, G.; CRAIG, S.; DECKER, G.; LEHNINGER, A. (1980). "The cytoskeleton of digitonin-treated rat hepatocyte". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77: 3430-3434.
45. FORMAN, D.S.; BROWN, K.J.; LIVENGOOD, D.R. (1983). "Fast axonal transport in permeabilized lobster giant axons is inhibited by vanadate". J. Neuroscience 3: 1279-1288.
46. FURTH, O. (1922). "Zur Theorie von der Struktur der Zellen". Jena Zeit, Naturw 14: 458-465.
47. GENDREAU, M.; TURCOTTE, A.; GICQUAUD, C.; St. PIERRE, S. (1981). "Séparation des peptides toxiques d'Amanita virosa par chromatographie liquide à haute performance". Annales de l'A.C.F.A.S. 48: 35.
48. GICQUAUD, C. (1984). Communication personnelle.
49. GICQUAUD, C.; GRUDA, J.; POLLENDER, J.M. (1980). "La phalloïdine protège la F actine contre les effets destructeurs de l'acide osmique et du permanganate". Eur. J. Cell Biol. 20: 234-239.

50. GICQUAUD, C.; LORANGER, A. (1981). "La phalloïdine protège la F-actine contre les effets destructeurs de l'acide osmique II. Protection par la phalloïdine de la F actine traitée aux aldéhydes". *Eur. J. Cell Biol.* 24: 320-323.
51. GICQUAUD, C.; TURCOTTE, A.; GRUDA, J.; TUCHWEBER, B. (1982). "Effets in vivo et in vitro de peptides extraits d'Amanita virosa". *Rev. Can. Biol. Exp.* 4: 23-34.
52. GICQUAUD, C.; TURCOTTE, A.; St. PIERRE, S. (1983). "Des peptides d'Amanita virosa, viroïsine et viroïdine sont plus efficaces que la phalloïdine pour protéger l'actine in vitro contre les effets de l'acide osmique". *Eur. J. Cell Biol.* 32: 171-173.
53. GOLDACRE, R.J.; LORCH, I.J. (1950). "Folding and unfolding of protein molecules in relation to cytoplasmic streaming, ameboid movement and osmotic work". *Nature* 166: 497-500.
54. GORDON, D.J.; BOYER, J.L.; KORN, E.D. (1977). "Comparative biochemistry of non-muscle actins". *J. Biol. Chem.* 252: 8300-8309.
55. GORDON, D.J.; EISENBERG, E.; KORN, E.D. (1976). "Characterization of cytoplasmic actin isolated from Acanthamoeba castellanii by a new method". *J. Biol. Chem.* 251: 4778-4786.
56. GORDON, D.J.; YANG, Y.Z.; KORN, E.D. (1976). "Polymerization of Acanthamoeba actin: kinetics, thermodynamics and copolymerization with muscle actin". *J. Biol. Chem.* 251: 7474-7479.
57. GOTZ von OLENHUSEN, K.; WOHLFARTH-BOTTERMANN, K.E. (1979). "Evidence for actin transformations during the contraction - relaxation cycle of cytoplasmic actomyosin: cycle blockage by phalloidin injection" in "Cell Motility: Molecules and organization". Ed. by S. HATANO, H. ISHIKAWA, H. SATO pp. 379-397. University Park Press.

Baltimore.

58. GRANDMONT-LEBLANC, A. (1979). "Isolement et purification de la myosine par chromatographie d'affinité." Mémoire de Maîtrise en Biochimie, 172 p. Université Laval.
59. GREBECKA, L.; HIREBENDA, B. (1979). "Topography of cortical layer in Amoeba proteus as related to the dynamic morphology of moving cell". *Acta Protozool.* 18: 481-490.
60. GREBECKI, A. (1981). "Effects of localized photic stimulation on ameboid movement and their theoretical implications". *Eur. J. Cell Biol.* 24: 163-175.
61. GREBECKI, A. (1982). "Supramolecular aspects of ameboid movement". *Progr. in Protozool; Proc. VI Internat. Congr. Protozool.* 1: 117-130.
62. GRIFFIN, J.L. (1964). in "Primitive Motile Systems in Cell Biology". R.D. Allen and N. Kamiya Ed. 237: 303. Academic Press, N.Y.
63. HABEREY, M.; STOCKEM, W. (1971). "Amoeba proteus: Morphologie, Zucht und verhalten". *Mikroksmos* 60: 33-42.
64. HAMMER III, J.A.; SELLERS, J.R.; KORN, E.D. (1984). "Phosphorylation and activation of smooth muscle myosin by Acanthamoeba Myosin I heavy chain kinase". *J. Biol. Chem.* 259: 3224-3229.
65. HAUSER, M. (1978). "Demonstration of membrane-associated and oriented microfilaments in Amoeba proteus by means of a Schiff base/glutaraldehyde fixative". *Cytobiologie* 18: 95-106.
66. HEITZMAN, C. (1873). "Untersuchungen über das Protoplasma. I. Bau des Protoplasmas" *Sitzber. Kaiserl. Akad. Wiss. Math. Natururss. Cl.*, 67 (III. Abth): 100-115.
67. HELENIUS, A.; SIMONS, K. (1975). "Solubilization of membranes by

- detoxin". *Biochim. Biophys. Acta* 415: 29-79.
68. HELLEWELL, S.B.; TAYLOR, D.L. (1979). "The contractile basis of amoeboid movement VI. The solation-contraction coupling hypothesis". *J. Cell Biol.* 83: 633-648.
69. HESS, B. (1956). in *Biochem.Z.* 328: 325-327.
70. HEUSER, J.E. (1981). "Comparing several detergents commonly used to visualize the cytoskeleton". *J. Cell Biol.* 91: 302a.
71. HEUSER, J.E.; KIRSHNER, M.W. (1980). "Filament organization revealed in platinum replicas of freeze-dried cytoskeletons". *J. Cell Biol.* 86: 212-234.
72. HITCHCOCK, S. (1977). "Regulation of motility in non-muscle cells" *J. Cell Biol.* 74: 1-15.
73. HOCH, H.C.; STAPLES, R.C. (1983). "Visualization of actin in situ by rhodamine-conjugated phalloin in the fungus Uromyces phaseoli". *Eur. J. Cell Biol.* 32: 52-58.
74. HOFFMANN, H.V.; STOCKEM, W.; GRUBER, B. (1984). "Dynamics of cytoskeleton in Amoeba proteus: II. Influence of different agents on the spatial organization of microinjected fluorescein-labeled actin". *Protoplasma* 119: 79-92.
75. HUXLEY, H. (1969). "The mechanism of muscle contraction". *Science* (Wash. D.C.) 164: 1356-1366.
76. HUXLEY, H.; HANSON, J. (1954). "Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation". *Nature* 179: 973-976.
77. HYMAN, L. (1917). "Metabolic gradients in Amoeba and their relationship to the mechanism of amoeboid movement". *J. Exp. Zool.* 24:

55-99.

78. ISENBERG, G.; AEBI, U.; POLLARD, T.D. (1980). "An actin-binding protein from Acanthamoeba regulates actin filament polymerization and interactions". Nature (London) 288: 455-459.
79. JENSEN, P. (1901). "Die Protoplasmabewegung". Ergebn. Physiol. (Part 2): 1.42.
80. KAMIYA, N. (1964) in "Primitive Motile Systems in Cell Biology". Ed. R.D. Allen, N. Kamiya. pp. 257-278. N.Y. Acad. Press (642 p.).
81. KIAIRA, J.K.; NJOGU, R.M. (1983). "Comparison of glycolysis in intact and digitonin-permeabilized bloodstream trypomastigotes of Trypanosoma brucei". Int. J. Biochem. 15: 1379-1383.
82. KOMNICK, H.; STOCKEM, W.; WOHLFARTH-BOTTERMAN, K.E. (1973). "Cell motility: Mechanisms in protoplasmic streaming and amoeboid movement". Int. Rev. Cytol. 34: 169-249.
83. KORN, E.D. (1963). "Fatty acids of Acanthamoeba sp." J. Biol. Chem. 238: 3584.
84. KORN, E.D. (1976). "Biochemistry of motility in Acanthamoeba castellanii" in "Contractile Systems in non-muscle tissues". Eds. S.V. Perry and al. Elsevier. North-Holland. Biomedical Press. pp. 285-296.
85. KORN, E.D. (1982). "Actin polymerization and its regulation by proteins from non-muscle cells". Physiol. Rev. 62: 672-737.
86. KREIS, T.E.; BIRCHMEIER, W. (1982). "Microinjection of fluorescently labeled proteins into living cells with emphasis on cytoskeletal proteins". Int. Rev. Cytol. 75: 209-227.
87. KRISZAT, G. (1950). "Die Wirkung Von Adenosintriphosphate und calcium auf Amoben (Chaos chaos)". Ark. für Zool. 1: 477-485.

88. KUCZMARSKI, E.R.; SPUDICH, J.A. (1980). "Regulation of myosin self assembly: Phosphorylation of Dictyostelium heavy chain inhibits formation of thick filaments". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 7292-7296.
89. KUO, C.L.; HUANG, N.H.; CAMPBELL, J.L. (1983). "Isolation of yeast DNA replication mutants in permeabilized cells". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Biol. Sci.* 8a: 64.
90. LAFOUNTAIN, J.R. Jr; ZOBEL, C.R.; THOMAS, H.R.; GALBREATH, C. (1977). "Fixation and staining F-actin and microfilament using tannic acid". *J. Ultrastruc. Res.* 58: 78-86.
91. LASMAN, M.; FEINSTEIN, N. (1983). "Further observations on the fine structure of Acanthamoeba palestinensis (Reich, 1933)". *J. Protozool.* 30: 460-466.
92. LAURILA, L.; VIRTANEN, I.; WARTIOVAARA, J.; STENMAN, S. (1978). "Fluorescent antibodies and lectins stain intracellular structures in fixed cells treated with non ionic detergent". *J. Histochem. Cytochem.* 26: 251-257.
93. LAZARIDES, E. (1980). "Intermediate filaments as mechanical integrations of cellular space". *Nature (London)* 283: 249-256.
94. LAZARIDES, E.; WEBER, K. (1974). "Actin antibody: The specific visualization of actin filaments in non muscle cells". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71: 2268.
95. LEHRER, S.S. (1981). "Damage to actin filaments by glutaraldehyde: Protection by tropomyosin". *J. Cell Biol.* 90: 459-466.
96. LENGSFELD, A.; LOW, I.; WIELAND, T.H.; DANCKER, P.; HASSELBACH, W. (1974). "Interaction of phalloidin with actin". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71: 2803-2807.

97. LENK, R.; RANSON, L.; KAUFMANN, Y.; PENMAN, S. (1977). "A cytoskeletal structure with associated polyribosomes obtained from HeLa cells". Cell 10: 67-78.
98. LOW, I.; WIELAND, T. (1974). "The interaction of phalloidin, some of its derivatives and of other cyclic peptides with muscle actin as studied by viscometry". FEBS Letters 44: 340-343.
99. LOW, R.B.; LOW, E.S.; CHAPONNIER, C.; MITCHELL, J.W.; GABBANI, G. (1982). "Effect of phalloidin on liver actin distribution, content and turnover". J. Cell Biochem. 20: 393-407.
100. LOWEY, S.; COHEN, C. (1962). "Studies on the structure of myosin". J. Mol. Biol. 4: 293-308.
101. McCLURE, J.A.; KORN, E.D. (1983). "Purification of a protein phosphatase from Acanthamoeba that dephosphorylates and activates Myosin II". J. Biol. Chem. 258: 14570-14573.
102. MCLEAN-FLETCHER, S.; POLLARD, T.D. (1980). "Identification of a factor in conventional muscle actin preparation which inhibits actin-filaments self-association". Biochem. Biophys. Res. Comm. 96: 18-27.
103. MARSLAND, D.A.; BROWN, D.E.S. (1936). "Ameboid movement at high hydrostatic pressure". J. Cell Comp. Physiol. 8: 167-178.
104. MARUTA, H.; GADASI, H.; COLLINS, J.H.; KORN, E.D. (1979). "Multiple forms of Acanthamoeba myosin I". J. Biol. Chem. 254: 3624-3630.
105. MARUTA, H.; KORN, E.D. (1977). "Acanthamoeba myosin II". J. Biol. Chem. 252: 6501-6509.
106. MAST, S.O. (1926). "Structure, movement, stimulation and locomotion on Amoeba". J. Morph. 41: 347-425.

107. MAST, S.O.; PROSSER, C.L. (1932). *J. Cell Comp. Physiol.* 1: 333.
108. MASUDA, M.; HIRANO, K. (1983). "Saponin aldehyde fixation well preserves microtubules in sea urchin embryo". *Dev. Growth and Differ.* 25: 414.
109. MAUPIN, P.; POLLARD, T.D. (1983). "Improved preservation and staining of HeLa cell actin filaments, clathrin-coated membrane and other cytoplasmic structures by tannic-glutaraldehyde saponin fixation". *J. Cell Biol.* 96: 51-62.
110. MAUPIN-SZAMIER, P.; POLLARD, T.D. (1978). "Actin filament destruction by osmium tetroxyde". *J. Cell Biol.* 77: 837-852.
111. MAYER, D.; FAULSTICH, H. (1983). "Two sites of intracellular localization of rhodaminyl-phalloidin in hepatocytes". *Biol. Cell* 48: 143-150.
112. MITSCHINSKY, F.; WIELAND, O. (1960). *Biochem. Z.* 333: 37-47.
113. MOORE, P.L.; CONDEELIS, J.S.; TAYLOR, D.L.; ALLEN, R.D. (1973). "A method for the morphological identification of contractile filaments in single cells". *Exp. Cell Res.* 80: 493-495.
114. NACHMIAS, V.T. (1964). "Fibrillar structure in the cytoplasm of Chaos chaos". *J. Cell Biol.* 23: 183-188.
115. NACHMIAS, V.T. (1968). "Further electron microscopy of fibrillar organization of the ground cytoplasm of Chaos chaos". *J. Cell Biol.* 38: 40-50.
116. NACHMIAS, V.T. (1969). "Studies on streaming.I. Inhibition of protoplasmic streaming and cytokinesis of Chaos chaos by ATP and reversal by  $Mg^{+2}$  and  $Ca^{+2}$ ". *J. Cell Biol.* 40: 160-166.
117. NATHANIEL, D.R. (1976). "Helical inclusions and atypical cristae in the mitochondria of rabbit thyroid gland". *J. Ultrastruc. Res.*

- 57: 194-203.
118. NEFF, R.J. (1957). "Purification axenic cultivation and description of a soil amoeba, Acanthamoeba castellanii, sp". *J. Protozool.* 4: 176-182.
119. NEWCOMB, E.H.; STEER, W.; HEPLER, P.K.; WERGIN, W.P. (1968). "An atypical crista resembling a "tight junction" in bean root mitochondria". *J. Cell Biol.* 39: 35-42.
120. OHTSUKI, I.; MANZI, R.; PALADE, G.; JAMIESON, J. (1978). "Entry of macromolecular tracers in cell fixed with low concentrations of aldehydes". *Biol. Cell* 31: 119-126.
121. OPAS, M.; KALNINS, V.I. (1984). "Microfilaments distribution and adhesion patterns in cultured cells after glutaraldehyde-formaldehyde fixation". *Eur. J. Cell Biol.* 33: 60-65.
122. OSBORN, M.; WEBER, K. (1977). "The detergent-resistant cytoskeleton of tissue cultured cells includes the nucleus and the microfilaments bundles". *Exp. Cell Res.* 106: 339-349.
123. OSBORN, M.; WEBER, K. (1984). "Actin paracrystal induction by forksolin and by db-c.AMP in CHO cells". *Exp. Cell Res.* 150: 408-418.
124. PANTIN, C.F.A. (1923). "On the physiology of ameboid movement". *J. Marine Biol. Assoc.* 13: 26-49.
125. PAULIN-LEVASSEUR, M. (1982). "Observations des structures contractiles dans le cytoplasme d'Amoeba proteus". Mémoire de Maîtrise en Sciences de l'Environnement, 200 p. U.Q.T.R.
126. PAULIN-LEVASSEUR, M.; GICQUAUD, C. (1981). "Observations des structures contractiles dans le cytoplasme démembrané d'Amoeba proteus après traitement à la phalloïdine". *Eur. J. Cell Biol.* 26:

144-149.

127. PERRY, S.V. (1955) in "Methods in Enzymology". N.O. Kaplan and S.P. Colowick Eds. Acad. Press. N.Y. 2: 582-588.
128. POLLARD, T.D. (1976). "The role of actin in the temperature dependent gelation and contraction of extracts of Acanthamoeba". J. Cell Biol. 68: 579-601.
129. POLLARD, T.D. (1977). "Cytoskeletal functions of cytoplasmic contractile proteins". J. Supramol Struct. 5: 317-334.
130. POLLARD, T.D. (1977). "Actin, myosin and cofactor from non motile cells". J. Mecanochem. Cell Motil. 4: 15-29.
131. POLLARD, T.D. (1981). "Purification of a calcium-sensitive actin gelation protein from Acanthamoeba". J. Biol. Chem. 256: 7666-7670.
132. POLLARD, T.D. (1982). "Structure and polymerization of Acanthamoeba Myosin II filaments". J. Cell Biol. 95: 816-825.
133. POLLARD, T.D.; AEBI, U.; COOPER, J.A.; FOWLER, W.E.; KIEHART, D.P.; SMITH, P.R.; TSENG, P.C. (1982). "Actin and myosin function in Acanthamoeba". Phil. Trans. R. Soc. Lond. B299: 237-245.
134. POLLARD, T.D.; ALDERSTEIN, S.; KORN, E.D. (1972). "Identification of myosin in Acanthamoeba castellanii and human platelets". Acta Protozool.11: 59-66.
135. POLLARD, T.D.; ITO, S. (1970). "Cytoplasmic filaments of Amoeba proteus I. The role of filaments in consistency changes and movements". J. Cell Biol. 46: 267-289.
136. POLLARD, T.D.; KORN, E.D. (1973). "Acanthamoeba myosin I. Isolation from Acanthamoeba castellanii of an enzyme similar to muscle myosin". J. Biol. Chem. 248: 4682-4690.

137. POLLARD, T.D.; KORN, E.D. (1973). "Acanthamoeba myosin II. Interaction with actin and with a new cofactor protein required for actin activation of Mg<sup>+2</sup> ATPase activity". *J. Biol. Chem.* 248: 4691-4697.
138. POLLARD, T.D.; SHELTON, E.; WEHNING, R.R.; KORN, E.D. (1970). "Ultrastructural characterization of F-actin isolated from Acanthamoeba castellanii and identification of cytoplasmic filaments as F-actin by reaction with rabbit heavy meromyosin". *J. Mol. Biol.* 50: 91-97.
139. POLLARD, T.D.; STAFFORD III, W.F.; PORTER, M.E. (1978). "Characterization of a second myosin from Acanthamoeba castellanii". *J. Biol. Chem.* 253: 4798-4808.
140. PRIVALLE, L.S.; BURRIS, R.H. (1983). "Permeabilization of isolated heterocysts of Anabaena sp strain 7120 with detergent". *J. Bact.* 155: 940-942.
141. PUDNEY, J.; SINGER, R.H. (1979). "Electron microscopic visualisation of the filamentous reticulum in whole cultured presumptive chick myoblasts". *Am. J. Anat.* 156: 321-336.
142. REYNOLDS, E.S. (1963). "The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy". *J. Cell Biol.* 17: 208-212.
143. RINALDI, R.A.; BAKER, W.R. (1969). "A sliding filament of ameboid motion". *J. Theoret. Biol.* 23: 463-474.
144. SABATINI, D.D.; BENSCH, K.; BARNETT, R.J. (1963). "Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzyme activity by aldehyde fixation". *J. Cell Biol.* 17: 19-58.

145. SALMON, J.M. (1984). "Application of the technique of cellular permeabilization to the study of the enzymatic activities of Saccharomyces cerevisiae in continuous alcoholic fermentation". *Bio-tech. Lett.* 6: 43-48.
146. SANDBORN, E.B.; STEPHENS, H.; BENDAYAN, M. (1975). "The influence of dimethylsulfoxide on cellular ultrastructure and cytochemistry". *Ann. New York. Acad. Sci.* 243: 122-138.
147. SANGER, J. (1975). "Intracellular localization of actin with fluorescently labeled heavy meromyosin". *Cell Tissue Res.* 161: 431-444.
148. SANGER, J.W.; SANGER, J.M.; JOCKUSCH, B.M. (1983). "Differential response of three types of actin filament bundles to depletion of cellular ATP levels". *Eur. J. Cell Biol.* 39: 197-204.
149. SCHAFFER, A.; DE VRIES, I.; FAULSTICH, H.; WIELAND, T. (1975). "Phalloidin counteracts the inhibitory effect of actin DNase I". *FEBS Lett.* 57: 51-54.
150. SCHLIWA, M.; VANBLERKOM, J.; PORTER, K.R. (1981). "Stabilization of the cytoplasmic ground substance in detergent opened cells and a structural and biochemical analysis of its composition". *J. Cell Biol.* 90: 222-235.
151. SCHROEDER, T.E.; CHRISTEN, R. (1982). "Polymerization of actin without acrosomal exocytosis in starfish sperm". *Exp. Cell Res.* 140: 363-371.
152. SIMIONESCU, N.; SIMIONESCU, M. (1976). "Gallyoyglucoses of low molecular weight as mordant in electron microscopy I. Procedure and evidence for mordanting effect". *J. Cell Biol.* 70: 608-621.
153. SMALL, J.V.; CELIS, J.E. (1978). "Filament arrangements in negati-

- vely stained cultured cells: The organization of actin". *Cytobiol.* 16: 308-325.
154. SMALL, J.V.; LANGANGER, G. (1981). "Organization of actin in the leading edge of cultured cells". *J. Cell Biol.* 91: 695-705.
155. SPURR, A.R. (1969). "A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy". *J. Ultrastruc. Res.* 26: 31-43.
156. STOCKEM, W. (1979). "Cell surface morphology and activity in Amoeba proteus and Physarum polycephalum". *Acta Protozool.* 18: 33-41.
157. STOCKEM, W.; HOFFMANN, H.; GAWLITTA, W. (1982). "Spatial organization and fine structure of the cortical filament layer in normal locomoting Amoeba proteus". *Cell Tissue Res.* 221: 505-519.
158. STOCKEM, W.; HOFFMANN, H.U.; GRUBER, B. (1983). "Dynamics of the cytoskeleton in Amoeba proteus I. Redistribution of microinjected fluorescein labeled actin during locomotion, immobilization and phagocytosis". *Cell Tissue Res.* 232: 79-96.
159. STOCKEM, W.; NAIB-MAJANI, W.; WOHLFARTH-BOTTERMANN, K.E. (1984). "Preservation and phallotoxin-staining of the microfilament system in Amoeba proteus". *Cell Biol. Int. Rep.* 8: 207-213.
160. STOCKEM, W.; NAIB-MAJANI, W.; WOHLFARTH-BOTTERMANN, K.E.; OSBORN, M.; WEBER, K. (1983). "Pinocytosis and locomotion of amoeba. XIX. Immunocytochemical demonstration of actin and myosin in Amoeba proteus". *Eur. J. Cell Biol.* 29: 171-178.
161. STOCKEM, W.; WEBER, K.; WEHLAND, J. (1978). "The influence of microinjected phalloidin on locomotion, protoplasmic streaming and cytoplasmic organization in Amoeba proteus and Physarum polycephalum". *Cytobiologie* 18: 114-131.
162. TAYLOR, D.L. (1977). "The contractile basis of ameboid movement.

- IV. The viscoelasticity and contractility of amoeba cytoplasm in vivo". *Exp. Cell Res.* 105: 413-426.
163. TAYLOR, D.L.; CONDEELIS, J.S. (1979). "Cytoplasmic structure and contractility in ameboid cells". *Int. Rev. Cytol.* 56: 57-144.
164. TAYLOR, D.L.; CONDEELIS, J.S.; MOORE, P.L.; ALLEN, R.D. (1973). "The contractile basis of ameboid movement.I: The chemical control of motility in isolated cytoplasm". *J. Cell Biol.* 59: 378-394.
165. TAYLOR, D.L.; CONDEELIS, J.S.; RHODES, J.A. (1977). "The contractile basis of ameboid movement.III. Structure and dynamics of motile extracts and membrane fragments from Dictyostelium discoideum and Amoeba proteus". in "Proceedings of the Conference on the Cell Shape and Surface Architect". pp. 581-603. Alan Liss. New York.
166. TAYLOR, D.L.; FECHHEIMER, M. (1982). "Cytoplasmic structure and contractility: The solation-contraction coupling hypothesis". *Phil. Trans. R. Soc. London* B299: 185-197.
167. TAYLOR, D.L.; HELLEWELL, S.B.; VIRGIN, H.W.; HEIPLE, J. (1979). "The solation-contraction coupling hypothesis of cell movements" in "Cell Motility: Molecules organization". Ed. by S. Hatano, H. Ishikawa and H. Sato. University Park Press. pp. 363-377. Baltimore.
168. THOMPSON, C.M.; WOLPERT, L. (1963). "Isolation of motile cytoplasm from Amoeba proteus". *Exp. Cell Res.* 32: 156-160.
169. TILNEY, L.G.; DEROISIER, D.J.; MULROY, M.J. (1980). "The organization of actin filaments in the stereocilia of cochlear hair cells". *J. Cell Biol.* 86: 244-259.
170. TILNEY, L.G.; HATANO, S.; ISHIKAWA, H.; MOOSEKER, M.S. (1973). "The polymerization of actin: Its role in the generation of the

- acrosomal process of certain echinoderm sperm". *J. Cell Biol.* 59: 109.
171. TOMINAGA, Y.; SHIMMEN, T.; TAZAWA, M. (1983). "Control in cytoplasmic streaming by extracellular  $\text{Ca}^{++}$  in permeabilized Nitella cells". *Protoplasma* 116: 75-77.
172. TSENG, P.; POLLARD, T.D. (1982). "Mechanism of action of Acanthamoeba profilin: Demonstration of actin species specificity and regulation by micromolar concentrations of  $\text{MgCl}_2$ ". *J. Cell Biol.* 94: 213-218.
173. TURCOTTE, A. (1982). "Séparation des virotoxines du champignon Amanita virosa et étude de leurs interactions sur l'actine in vitro". Mémoire de Maîtrise en Biophysique, 107 p. U.Q.T.R.
174. UYEMURA, D.G.; BROWN, S.S.; SPUDICH, J.A. (1978). "Biochemical and structural characterization of actin from Dictyostelium discoideum". *J. Biol. Chem.* 253: 9088-9096.
175. WEBER, K.; GROESCHEL-STEWART, U. (1974). "Antibody to myosin: The specific visualization of myosin-containing filaments in non muscle cells". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71: 4651.
176. WEHLAND, J.; STOCKEM, W.; WEBER, K. (1978). "Cytoplasmic streaming in Amoeba proteus is inhibited by the actin specific drug phalloidin". *Exp. Cell Res.* 115: 451-454.
177. WEHLAND, J.; WEBER, K.; GAWLITTA, W.; STOCKEM, W. (1979). "Effects of the actin binding protein DNase I on cytoplasmic streaming and ultrastructure in Amoeba proteus". *Cell Tissue Res.* 199: 353-372.
178. WEIGEL, P.H.; RAY, D.A.; OKA, J.A. (1983). "Quantitation of intracellular membrane-bound enzymes and receptors in digitonin permeabilized cells". *Analyt. Biochem.* 133: 437-449.

179. WEIHING, R.R.; KORN, E.D. (1971). "Acanthamoeba actin, isolation and properties". *Biochem.* 10: 590-600.
180. WIELAND, O. (1965) in *Clin. Chem. (N.Y.)* 2: 323-335.
181. WIELAND, T. (1977). "Modifications of actin by phallotoxins". *Naturwissenschaften* 64: 303-309.
182. WIELAND, T.; FAULSTICH, H. (1978). "Amatoxins, phallotoxins, phal-lolysin and antamanide: The biologically active components of poisonnous Amanita mushrooms". *Crit. Rev. Biochem.* 5: 185-260.
183. WILSON, S.P. (1980). "Calcium-evoked secretion from digitonin permeabilized adrenal chromaffin cells". *J. Biol. Chem.* 258: 4994-5000.
184. WOLOSEWICK, J.J.; PORTER, K.R. (1979). "Microtrabecular lattice of the cytoplasmic ground substance: Artifact or reality?" *J. Cell Biol.* 82: 114-139.
185. YAHARA, I.; HARADA, F.; SEKITA, S.; YOSHIHIRA, K.; NATORI, S. (1982). "Correlation between effects of 24 different cytochalasins on cellular structures and cellular events and those on actin in vitro". *J. Cell Biol.* 92: 69-78.
186. YANG, Y.Z.; KORN, E.D.; EISENBERG, E. (1979). "Binding of tropomyosin to copolymers of Acanthamoeba actin and muscle actin". *J. Biol. Chem.* 254: 7137-7140.
187. YOCUM, R.R. (1978). "New laboratory scale purification of  $\beta$ -amantin from american Amanita phalloides". *Biochem.* 17: 3786-3789.
188. YOCUM, R.R.; SIMONS, D.M. (1977). "Amatoxins and phallotoxins in Amanita species of the North Eastern United States" *Lloydia* 40: 178-190.