



National Library
of Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Canadian Theses Service

Service des thèses canadiennes

Ottawa, Canada
K1A 0N4

NOTICE

The quality of this microform is heavily dependent upon the quality of the original thesis submitted for microfilming. Every effort has been made to ensure the highest quality of reproduction possible.

If pages are missing, contact the university which granted the degree.

Some pages may have indistinct print especially if the original pages were typed with a poor typewriter ribbon or if the university sent us an inferior photocopy.

Reproduction in full or in part of this microform is governed by the Canadian Copyright Act, R.S.C. 1970, c. C-30, and subsequent amendments.

AVIS

La qualité de cette microforme dépend grandement de la qualité de la thèse soumise au microfilmage. Nous avons tout fait pour assurer une qualité supérieure de reproduction.

S'il manque des pages, veuillez communiquer avec l'université qui a conféré le grade.

La qualité d'impression de certaines pages peut laisser à désirer, surtout si les pages originales ont été dactylographiées à l'aide d'un ruban usé ou si l'université nous a fait parvenir une photocopie de qualité inférieure.

La reproduction, même partielle, de cette microforme est soumise à la Loi canadienne sur le droit d'auteur, SRC 1970, c. C-30, et ses amendements subséquents.

L'ENKYSTEMENT CHEZ *ACANTHAMOEBA CASTELLANII*:
PROFIL METABOLIQUE ETUDIE PAR ANALYSES BIOCHIMIQUES
ET SPECTROSCOPIE DE RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE

par

SYLVAIN LAREAU

mémoire présenté à
l'Ecole des Etudes Supérieures et de la Recherche
en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Philosophie (Chimie)

FACULTE DES SCIENCES
UNIVERSITE D'OTTAWA



Sylvain Lareau, Ottawa, Canada, 1989



National Library
of Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Canadian Theses Service Service des thèses canadiennes

Ottawa, Canada
K1A 0N4

The author has granted an irrevocable non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of his/her thesis by any means and in any form or format, making this thesis available to interested persons.

The author retains ownership of the copyright in his/her thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without his/her permission.

L'auteur a accordé une licence irrévocable et non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de sa thèse de quelque manière et sous quelque forme que ce soit pour mettre des exemplaires de cette thèse à la disposition des personnes intéressées.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège sa thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

ISBN 0-315-60093-4

Canada



UNIVERSITÉ D'OTTAWA
UNIVERSITY OF OTTAWA

*A une amie, qui dans mon coeur,
occupe une place très spéciale.*

SOMMAIRE

Acanthamoeba castellanii est une petite amibe du sol que l'on retrouve dans deux états physiologiques distincts: un état amiboïde trophozoïte où les cellules croissent et se reproduisent, et un état de latence, le kyste. Le passage d'un état à l'autre survient lorsque les conditions ne sont plus favorables à la croissance. En laboratoire, l'enkystement peut être induit de façon synchronisée par une manipulation appropriée du milieu de culture. *Acanthamoeba castellanii* est un modèle intéressant pour l'étude de la différenciation cellulaire car cet organisme possède des propriétés d'endocytose et d'osmorégulation que l'on retrouve chez les organismes supérieurs.

Les travaux présentés dans cette thèse portent sur l'étude des changements métaboliques associés au processus d'enkystement. Au cours des dernières années, la RMN *in vivo* s'est avérée une méthode de choix pour suivre de façon continue et non destructrice les processus métaboliques. La RMN du ^{31}P permet de mesurer le niveau des métabolites reliés aux processus énergétiques cellulaires, tels que l'ATP et le phosphate inorganique. Elle permet aussi la détermination du pH intracellulaire. La RMN de ^{13}C permet de visualiser le niveau des métabolites présents en concentration importante

tels que les hydrates de carbone et certains acides aminés. Afin d'étudier le processus d'enkystement par spectroscopie RMN, nous avons construit un système de perfusion permettant de maintenir dans des conditions physiologiques saines les cellules emprisonnées dans l'espace restreint d'un tube RMN.

Dû aux contraintes de la technique, il est difficile d'obtenir des mesures quantitatives par spectroscopie RMN. Pour avoir une vue complète des événements métaboliques durant l'enkystement, nous avons mis au point des techniques biochimiques et chromatographiques très sensibles permettant l'analyse des mono- et disaccharides, des acides aminés, du glycogène et de la cellulose, sur des extraits provenant de quelques mg (en poids sec) de cellules.

Nos résultats ont montré que lors de l'enkystement, une partie importante du glycogène est transformé en tréhalose. Cependant, plus de la moitié de ce disaccharide provient de synthèse *de novo* d'unités glycosyles. Les réserves de lipides constituent une source probable de carbone pour cette synthèse. L'utilisation de produits marqués en ^{13}C a aussi montré la présence de sentiers gluconéogéniques inhabituels chez cet organisme. Le tréhalose et la proline se retrouvent en concentration importante dans les kystes. Ces substances semblent conférer à cet organisme la protection adéquate à la déshydratation.

ABSTRACT

Acanthamoeba castellanii is a small living amoeba that assumes two states of differentiation: an amoeboid trophozoite form where cells can grow and divide, and a resting cyst where cells have suspended their life. The encystment process arises when the environmental conditions do not further support growth. In the laboratory, the process can be induced synchronously by a proper manipulation of the growth medium. *Acanthamoeba castellanii* is an interesting model for the study of cell differentiation since this organism possesses many features, like endocytosis and osmoregulation, that are found in higher organisms.

In this thesis, studies of metabolic changes that occur during the encystment process are presented. During the last few years, NMR spectroscopy has been shown to be an outstanding technique to follow in a continuous and non-destructive way metabolic changes in living organisms. ^{31}P NMR spectroscopy is used to assess the levels of metabolites related to the cell energetic process such as ATP and P_i . It also provides information about intracellular pH. The ^{13}C NMR is used to monitor metabolites that are present in relatively high concentrations, such as some carbohydrates and amino

acids. In order to study the encystment process by NMR, we have built a perfusion system that maintains under physiological conditions densely packed cells trapped in the observation part of an NMR coil.

It is difficult to obtain quantitative measurements by NMR spectroscopy. In order to get more information about the encystment process, we have developed biochemical and chromatographic techniques to analyse mono- and disaccharides, amino acids, glycogen and cellulose, from only a few milligrams of cells.

Our results have shown that, during the encystment process, an important part of the glycogen is transformed to trehalose. The missing source of glycosyl units seems to be generated by *de novo* synthesis. Lipid reserves are prime candidates as carbon sources for the synthesis. The use of ^{13}C labelled compounds have shown unusual gluconeogenic pathways in the amoeba. Trehalose and proline are found in large amounts in the cyst. These products seem to provide the cells the protection needed to survive dessication.

REMERCIEMENTS

Je voudrais exprimer ma reconnaissance à mon directeur de thèse, le docteur Ian C. P. Smith, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour m'avoir appuyer dans mes travaux. Je tiens à exprimer ma sincère gratitude au docteur Roxanne Deslauriers pour nos discussions fructueuses, ses nombreux conseils et pour ses critiques constructives.

J'aimerais aussi remercier mes collègues de travail pour leurs échanges bénéfiques et leur bonne humeur, mais surtout mes nombreux amis pour m'avoir appuyer jusqu'au bout dans mes travaux. J'aimerais tout spécialement remercier Michèle Auger, Thérèse Kroft et Kim Francoeur qui se sont grandement dévoués à la correction de ce mémoire.

TABLE DES MATIERES

	page
SOMMAIRE	ii
SOMMAIRE ANGLAIS (ABSTRACT).	iv
REMERCIEMENTS.	vi
TABLE DES MATIERES	vii
LISTE DES TABLEAUX	xiv
LISTE DES FIGURES.	xvi
CHAPITRE 1 - LE CYCLE DE VIE D' <i>ACANTHAMOEBA CASTELLANII</i>	1
1.1 Introduction.	1
1.2 Le cycle de croissance-division	3
1.3 Le cycle d'enkystement-désenkystement	6
1.3.1 L'enkystement	6
1.3.2 Le désenkystement	16
CHAPITRE 2 - LA SPECTROSCOPIE DE RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE	18
2.1 Introduction.	18
2.2 La spectroscopie RMN à transformée de Fourier	19
2.3 La RMN <i>in vivo</i>	29
2.4 La spectroscopie de culture cellulaire.	37

	page
CHAPITRE 3 - TECHNIQUES EXPERIMENTALES GENERALES	44
3.1 Introduction.	44
3.2 Mesure de la densité cellulaire	46
3.3 Préservation des cellules	47
3.4 Enkystement	48
3.5 Effet des inducteurs et des inhibiteurs de l'enkystement	50
3.6 Méthode d'extraction à l'éthanol.	51
3.7 Microextraction à l'acide perchlorique.	52
3.8 Détermination des protéines par la méthode de Lowry	53
3.9 Dosage du glucose et du maltose dans le milieu de culture	54
3.10 Analyse du glycogène et de la cellulose cellulaire	55
3.10.1 Purification du glycogène et de la cellulose .	55
3.10.2 Test d'anthrone.	56
3.11 Purification des constituants pour la spectroscopie RMN.	57
3.11.1 Extraction à l'acide perchlorique.	57
3.11.2 Extraction à l'éthanol	58
3.11.3 Purification du tréhalose.	58
3.11.4 Purification et dégradation du glycogène . . .	59
3.12 Méthylation du tréhalose pour l'analyse par GC-MS.	60
3.13 Dosage enzymatique et production du lactate et de l'éthanol.	61
3.13.1 Préparation du cytosol	61
3.13.2 Dosage enzymatique de l'alcool deshydrogénase.	62

	page
3.13.3 Dosage du lactate deshydrogénase	63
3.13.4 Dosage du malate deshydrogénase.	63
3.13.5 Dosage enzymatique de l'acide lactique	63
3.13.6 Détermination de l'éthanol par chromatographie gazeuse.	64
 CHAPITRE 4 - TECHNIQUES D'ANALYSE DE CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE	
4.1 Introduction.	65
4.2 Chromatographie liquide à haute performance	68
4.3 Analyse des hydrates de carbone	70
4.3.1 Introduction.	70
4.3.2 Préparation des échantillons.	73
4.3.3 Dérivation à l'aide du chlorure de <i>p</i> - nitrobenzoyle	74
4.3.4 Stabilité des dérivés	77
4.3.5 Chromatographie	77
4.3.6 Séparation et temps de rétention.	78
4.3.7 Calcul des concentrations en hydrates de carbone	80
4.4 Analyse des acides aminés physiologiques.	82
4.4.1 Introduction.	82
4.4.2 Analyse des dérivés <i>p</i> -nitrobenzoyles d'acides aminés.	89
4.4.2.1 Introduction.	89
4.4.2.2 Dérivation.	89

	page
4.4.2.3 Chromatographie	89
4.4.2.4 Discussion de la méthode.	94
4.4.3 Dérivés phénylthiocarbamoyles d'acides aminés:	
méthode 1	96
4.4.3.1 Dérivation des acides aminés.	96
4.4.3.2 Méthode de séparation rapide.	101
4.4.3.3 Effet des modificateurs organiques.	102
4.4.3.4 Effet de pH	105
4.4.3.5 Effet de la concentration du tampon	107
4.4.3.6 Effet du volume de délai du gradient et de la concentration initiale en acétonitrile .	107
4.4.3.7 Chromatogramme.	110
4.4.4 Dérivés phénylthiocarbamoyles d'acides aminés:	
méthode 2	112
4.4.4.1 Dérivation.	112
4.4.4.2 Séparation.	113
4.4.4.3 Effet du pH	114
4.4.4.4 Effet de la concentration du tampon	116
4.4.4.5 Effet de la concentration initiale en acétonitrile.	117
4.4.4.6 Effet de la pente du gradient	117
4.4.4.7 Effet du débit.	119
4.4.4.8 Chromatogramme.	119
4.4.4.9 Quantification.	122
4.5 Analyse de l'adénine 3'-5' monophosphate cyclique .	123
4.5.1 Introduction.	123

	page
4.5.2 Préparation des échantillons.	124
4.5.3 Chromatographie et discussion	124
 CHAPITRE 5 - TECHNIQUES DE SPECTROSCOPIE DE RESONANCE	
MAGNETIQUE NUCLEAIRE.	
	127
5.1 Introduction.	127
5.2 Spectromètres RMN	128
5.3 La perfusion des cellules	128
5.3.1 Introduction.	128
5.3.2 Système de perfusion.	129
5.3.3 Perfusion avec les filaments d'agarose.	132
5.3.3.1 Description du système.	132
5.3.3.2 Préparation des fibres d'agarose.	134
5.3.4 Fibres à dialyse.	136
5.3.4.1 Confection du faisceau de fibres à dialyse.	136
5.3.4.2 Perfusion des fibres à dialyse.	138
5.3.4.3 Insertion des cellules dans les fibres à dialyse	138
5.3.5 Comparaison des techniques de perfusion	141
5.3.6 Evaluation du système de perfusion.	142
5.4 Détermination du pH intracellulaire	146
 CHAPITRE 6 - L'INITIATION DE L'ENKYSTEMENT CHEZ	
<i>ACANTHAMOEBA CASTELLANII</i>	
	150
6.1 Introduction	149
6.2 Technique d'enkystement	151
6.3 Modifications métaboliques.	154

	page
6.3.1 Introduction.	154
6.3.2 Courbe de croissance.	154
6.3.3 Métabolisme des hydrates de carbone	158
6.3.4 Métabolisme des acides aminés	164
6.3.5 pH intracellulaire et extracellulaire	170
6.3.6 Conclusion.	176
6.4 L'enkystement	178
6.4.1 Effet des ions monovalents.	178
6.4.2 Effet des ions divalents et de l'EDTA	181
6.4.3 Effet des solvants polaires aprotiques.	185
6.5 Mécanisme d'action proposé.	188
 CHAPITRE 7 - LES CHANGEMENTS METABOLIQUES DURANT	
L'ENKYSTEMENT	
	194
7.1 Introduction.	194
7.2 Etude de l'enkystement - approche biochimique	194
7.2.1 Introduction.	194
7.2.2 La synchronisation.	195
7.2.3 L'induction et l'enkystement.	197
7.3 L'enkystement tel qu'observé par spectroscopie RMN.	210
7.3.1 Introduction.	210
7.3.2 La RMN de ^{31}P	211
7.3.3 La RMN de ^{13}C	215
7.4 Séquence des évènements	220
7.5 Le pH durant l'enkystement.	229

	page
7.6 Utilisation de marqueurs dans l'étude de l'enkystement	231
7.6.1 Introduction.	231
7.6.2 Croissance des cellules sur ^{13}C -1-glucose . . .	231
7.6.3 Croissance des cellules sur acétate enrichi . .	237
CHAPITRE 8 - CONCLUSION.	252
ANNEXE - LISTE DES ABREVIATIONS.	256
BIBLIOGRAPHIE.	258

LISTE DES TABLEAUX

	page
1.1. Le cycle d'enkystement - déenkystement d' <i>Acanthamoeba castellanii</i>	8
2.1. Propriétés spectroscopiques de noyaux importants dans les études des systèmes biologiques	31
2.2. Comparaison des propriétés spectroscopiques de noyaux couramment utilisés dans l'étude des systèmes biologiques	36
3.1. Composition du milieu de culture OGM	45
3.2. Composition du milieu de culture OGM 1/2	49
3.3. Composition du milieu Na-PIPES	50
4.1. Organigramme de sélection d'une technique de chromatographie liquide à haute performance.	67
4.2. Programme de CLHP utilisé pour la séparation des dérivés per- <i>p</i> -nitrobenzoyle d'hydrates de carbone.	78
4.3. Temps de rétention de divers hydrates de carbone	81
4.4. Programme utilisé pour la séparation des dérivés <i>p</i> -nitrobenzoyles d'acides aminés	92
4.5. Déplacements chimiques et tentative d'attribution des raies d'absorption des isomères rotationnels du dérivé <i>p</i> -nitrobenzoyle de la proline.	98

	page
4.6. Programme utilisé pour la séparation des dérivés PTC d'acides aminés (méthode 1).	103
4.7. Programme utilisé pour la séparation des dérivés PTC d'acides aminés (méthode 2).	114
6.1. Concentration en acides aminés présents dans le milieu de culture.	166
6.2. Effet des ions monovalents sur l'enkystement . . .	179
7.1. Incorporation du 1- ¹³ C-glucose dans le tréhalose et le glycogène.	236
7.2. Incorporation de l'acétate enrichi dans le tréhalose.	246

LISTE DES FIGURES

	page
1.1. Le cycle de croissance-division et d'enkystement-désenkystement chez <i>Acanthamoeba</i>	2
2.1. Mouvement de précession d'un noyau sous l'influence d'un champ magnétique externe	21
2.2. Système de coordonnées et magnétisation	23
2.3. Signaux de précession libre	27
2.4. Déplacement chimique de quelques groupements fonctionnels importants en ^1H	32
2.5. Déplacements chimiques des principaux groupements phosphorylés importants en spectroscopie du ^{31}P des systèmes biologiques.	34
2.6. Déplacements chimiques de quelques groupements fonctionnels en spectroscopie en ^{13}C	36
4.1. Montage utilisé pour l'évaporation des solvants .	76
4.2. Chromatogramme d'une série d'alditols de référence	79
4.3. Effet du pH sur la rétention des acides aminés par rapport à l'alanine	91
4.4. Séparation d'un mélange standard d'acides aminés.	93
4.5. Chromatogramme du dérivé <i>p</i> -nitrobenzoylé de la proline	95

	page
4.6. Spectre RMN en ^{13}C du dérivé <i>p</i> -nitrobenzoyle de la proline.	97
4.7. Effet du mélange dioxane:THF sur la séparation des dérivés PTC d'acides aminés	104
4.8. Effet du pH sur la séparation des dérivés PTC d'acides aminés	106
4.9. Effet de la concentration du tampon sur la séparation des dérivés PTC d'acides aminés.	108
4.10. Séparation d'un mélange standard d'acides aminés.	111
4.11. Effet du pH sur la rétention des dérivés PTC d'acides aminés	115
4.12. Effet de la concentration initiale en acétonitrile sur la séparation des dérivés PTC d'acides aminés	118
4.13. Effet du débit sur la séparation des dérivés PTC d'acides aminés	120
4.14. Chromatogramme illustrant la séparation d'un mélange standard d'acides aminés.	121
4.15. Chromatogramme illustrant la séparation d'un extrait cellulaire contenant de l'AMP _c	126
5.1. Système utilisé pour la perfusion des cellules.	131
5.2. Système utilisé pour la perfusion des cellules emprisonnées dans les filaments d'agarose	133
5.3. Système utilisé pour la perfusion des cellules emprisonnées dans les fibres à dialyse.	139

	page
5.4. Effet de l'oxygénation sur le pH intracellulaire.	144
5.5. Spectres de cellules après 24 heures de perfusion.	147
5.6. Courbe d'étalonnage utilisée pour la détermination du pH intracellulaire.	149
6.1. Organigramme d'analyse de la composition cellulaire et du milieu de culture.	155
6.2. Courbe de croissance et fluctuation du pH du milieu d'une culture typique.	156
6.3. Courbe de croissance sur maltose et niveau des sucres intracellulaires	163
6.4. Concentration totale en acides aminés et variation du pH dans le milieu de culture lors de la croissance	168
6.5. Variation de la concentration des acides aminés intracellulaires d'importance lors de la croissance.	169
6.6. Spectres RMN de ^{31}P d'extraits de cellules en début de phase stationnaire en absence et en présence d'EDTA	172
6.7. Effet du pH sur le déplacement chimique de quelques constituants visibles en RMN de ^{31}P . . .	173
6.8. Effet du pH extracellulaire sur le pH intracellulaire d' <i>Acanthamoeba castellanii</i>	175
7.1. Métabolisme des hydrates de carbone lors de l'enkystement induit par le Mg^{2+}	199

	page
7.2. Métabolisme des hydrates de carbone lors de l'enkystement induit par le DMSO.	200
7.3. Chromatogramme illustrant la composition en acides aminés des trophozoïtes et des kystes . . .	204
7.4. Variation quantitative des acides aminés dans les kystes au cours de l'enkystement.	205
7.5. Survie des kystes dans le milieu OGM en fonction du temps.	209
7.6. Spectres RMN de ^{31}P de cellules au cours de la synchronisation	212
7.7. Spectres RMN de ^{31}P de cellules au cours de l'enkystement	214
7.8. Spectres RMN de ^{13}C de cellules à différentes étapes de l'enkystement	216
7.9. Spectres RMN de ^{13}C de cellules et d'extraits . .	217
7.10. Spectres RMN de ^{13}C à différentes étapes de l'enkystement	218
7.11. Evènements du processus d'enkystement chez <i>Acanthamoeba castellanii</i> en fonction du temps . .	221
7.12. Sentiers métaboliques des hydrates de carbone chez <i>Acanthamoeba castellanii</i>	224
7.13. Production de lactate et d'éthanol après 22 heures d'anoxie partielle	228
7.14. Fluctuations de pH observées au cours de l'enkystement	230

	page
7.15. Spectres RMN de ^{13}C du glucose provenant du glycogène des cellules cultivées sur ^{13}C -1-glucose et en abondance naturelle	233
7.16. Spectres RMN de ^{13}C du tréhalose des cellules après croissance sur ^{13}C -1-glucose et en abondance naturelle	234
7.17. Cycle du glucuronate.	238
7.18. Spectres RMN de ^{13}C de cellules perfusées dans des filaments d'agarose en présence d'acétate enrichi en position C-2	240
7.19. Spectres RMN de ^{13}C de trophozoïtes après croissance sur ^{13}C -1-acétate et ^{13}C -2-acétate	241
7.20. Spectres RMN de ^{13}C de kystes après croissance sur ^{13}C -1-acétate et ^{13}C -2-acétate.	242
7.21. Spectres de ^{13}C d'extraits lipidiques après croissance des cellules sur ^{13}C -1-acétate et ^{13}C -2-acétate	243
7.22. Spectres RMN de ^{13}C d'extraits de tréhalose après croissance des cellules sur ^{13}C -1-acétate et ^{13}C -2-acétate	245
7.23. Voie des pentoses phosphates.	248
7.24. Sentiers métaboliques empruntés par l'acétate et le glucose.	249

CHAPITRE 1

LE CYCLE DE VIE D'*ACANTHAMOEBA CASTELLANII*

1.1 Introduction

Acanthamoeba castellanii est une petite amibe non-parasite que l'on retrouve dans le sol, l'eau fraîche et l'eau salée. La recherche sur cet organisme s'est intensifiée au cours des dernières années car il constitue un modèle intéressant pour l'étude de la différenciation cellulaire. *Acanthamoeba* possède des propriétés d'osmorégulation et d'endocytose que l'on retrouve habituellement chez les organismes supérieurs. Il se cultive facilement en conditions axéniques et le processus de différenciation est simple. Les cellules existent sous forme de trophozoïtes amiboïdes ou de kystes (Fig. 1.1) et le passage d'une forme à l'autre peut être induit de façon synchronisée. Lors de l'enkystement, les cellules acquièrent une très grande résistance aux stress environnementaux. Les kystes matures survivent aisément à une gamme étendue de pH, de pression osmotique et de température. Ils s'avèrent plus stables sous la forme déshydratée où ils restent viables durant plusieurs années. Le désenkystement s'initie spontanément lorsque les conditions redeviennent favorables à la croissance. Certaines souches

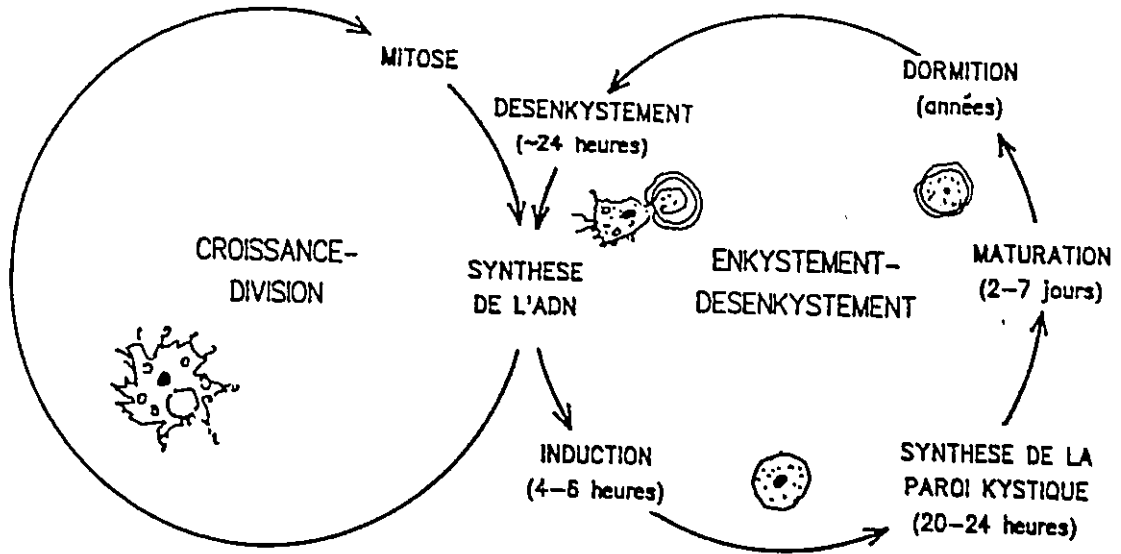


FIG. 1.1. Le cycle de croissance-division et d'enkystement-déenkystement chez *Acanthamoeba*. (Adapté de Neff et Neff, 1969)

identifiées récemment comme pathogènes opportunistes pour l'humain ont attiré l'attention de plusieurs chercheurs dans le domaine médical.

Mon projet de recherche consiste en l'étude des changements métaboliques associés au processus d'enkystement chez *Acanthamoeba castellanii*. Nous avons cherché à répondre à plusieurs questions fondamentales, à savoir: Quels sont les facteurs qui déclenchent l'enkystement? Quelle est la séquence des événements au niveau moléculaire du processus? Quelles sont les changements métaboliques intracellulaires

majeurs? Qu'est-ce qui confère aux kystes cette grande résistance à l'environnement? Une partie de ce travail porte sur le développement et l'application de nouvelles techniques de spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) *in vivo* et de chromatographie liquide à haute performance (CLHP). La RMN n'étant ni envahissante et ni destructrice, il est possible de suivre en fonction du temps le niveau des métabolites majeurs intra- et extracellulaires. La mise au point de nouvelles techniques de CLHP a permis de compléter ces études par l'observation et la quantification de plusieurs composés au cours du processus d'enkystement.

1.2 Le cycle de croissance-division

Dans notre laboratoire, *Acanthamoeba* est cultivée dans un milieu non défini (OGM ; Optimal growth medium) tel que décrit par Neff et al. (1964b). Un temps de génération de 6 à 10 heures en phase logarithmique et une densité cellulaire de 6 à 12×10^6 cellules/ml en phase stationnaire est couramment obtenue. Les amibes peuvent être également cultivées en milieu défini composé d'acides aminés, de vitamines, des sels inorganiques et d'une source de carbone, habituellement du glucose. Cependant, les temps de génération oscillent entre 14 et 50 heures selon la complexité et la composition du milieu. L'arginine, la glycine, l'isoleucine, la leucine, la méthionine, la valine et la phénylalanine sont normalement requis pour la croissance des cellules (Adam, 1964; Dolphin, 1976). La sérine ou la thréonine peuvent remplacer la glycine

mais ces substitutions augmentent le temps de génération. La glycine et la phénylalanine sont indispensables lorsque la principale source de carbone est l'acétate mais ils peuvent être omis lorsque le glucose remplace l'acétate (Dolphin, 1976; Adam et Bleweet, 1967). La facilité d'utilisation de différents sucres comme source de carbone varie selon la souche d'amibe (Adam et Bleweet, 1967). La souche Neff est capable de croître sur 15 différentes sources de carbone. Le glucose, le maltose, le tréhalose, le sucrose, le raffinose, et l'amidon offrent une meilleure possibilité de croissance. Le fructose, le mannose, la cellobiose, le lactose, la mélibiose, le mannitol, le glycérol, le glycogène et la laminarine peuvent aussi être utilisés. Quand au dulcitol, il n'entretient pas la croissance.

Le principal mode d'ingestion des substances nutritives est l'endocytose. La similitude des vitesses d'incorporation de molécules de différents poids moléculaires laisse penser que la pinocytose est le mécanisme majeur d'absorption des composés en solution (Bowers et Olzewski, 1972). Le transport de l'eau se fait cependant par osmose, la pinocytose n'y jouant qu'un rôle mineur (Pal, 1972). La phagocytose permet aux amibes l'ingestion de matières solides. L'ingestion montre une cinétique de saturation (située à environ 15% du volume total cellulaire) liée au volume total de particules ingérées (Weisman et Korn, 1967; Bowers, 1977). *Acanthamoeba* semble aussi pouvoir faire la distinction entre les particules nutritives et non-nutritives (Rabinovitch et De Stephano,

1971; Brown et al., 1975; Bowers et Olszewski, 1983).

La pinocytose est un processus continu chez *Acanthamoeba*. Cependant, cette activité diminue lors de la phagocytose (Bowers, 1977; Weisman et Korn, 1967). Les deux processus semblent donc intimement liés. Ils montrent la même dépendance de température, et sont perturbés de la même façon par différents inhibiteurs (concanavalin A, azidure, cyanure et autres). Le volume ingéré par pinocytose est contrebalancé par l'expulsion d'eau à l'aide de la vacuole contractile, alors que la phagocytose ne l'est pas (Bowers, 1977).

L'endocytose induit de fréquents changements de la membrane cellulaire. La membrane est remplacée de 3 à 40 fois par heure (Bowers et Olszewski, 1972). Bien qu'il soit difficile de savoir exactement le pourcentage de membrane provenant de synthèse nouvelle et celui provenant de vacuoles et de vésicules recyclées, il semble que la réutilisation de la membrane se fasse de façon extensive.

Lors du passage de la phase logarithmique à la phase stationnaire, la pinocytose diminue de moitié et la phagocytose arrête (Chambers et Thompson, 1976). Les données accumulées s'avèrent insuffisantes pour déterminer précisément la raison de l'arrêt de la phase exponentielle de croissance. La question possède toutefois son importance, puisque ce phénomène semble directement lié au processus d'enkystement. Il est possible que l'agent responsable

diffère selon les conditions de croissance. Il semble cependant que la diminution de la tension d'oxygène soit un facteur important dans plusieurs cas (Byers *et al.*, 1969). L'enchevêtrement des cellules semble aussi important bien que l'on n'ait pas démontré d'inhibition de croissance par contact ou autre. Pigon (1972) a montré l'accumulation d'un facteur thermolabile dans le milieu de culture pouvant ralentir la croissance des cellules. Bien que le composé n'ait pas été identifié, une fraction de poids moléculaire élevé, pouvant de façon transitoire inhiber le mouvement, l'attachement et la cytokinèse des cellules, a été isolée. Le traitement de cultures en croissance avec cette fraction provoque une augmentation de la multinucléarité cellulaire, particularité habituellement observée chez les cellules en phase stationnaire.

1.3 Le cycle d'enkystement-désenkystement

1.3.1 L'enkystement

Bien qu'un faible pourcentage d'enkystement se produise dans les cultures en croissance, une augmentation massive de la différenciation est habituellement associée à des conditions environnementales hostiles. En milieu naturel, les conditions susceptibles ou connues comme étant initiatrices de l'enkystement sont la déshydratation, les concentrations élevées en sels (Band, 1963), une diminution de la tension d'oxygène (Byers *et al.*, 1969) et un changement de pH (Neff *et al.*, 1964b). Plusieurs de ces conditions peuvent être

présentes simultanément et être requises pour l'enkystement. Cependant, personne ne sait si ces facteurs affectent un système d'initiation commun ou si chaque facteur a un site d'action différent.

Acanthamoeba est un organisme aérobique pour la croissance et l'enkystement (Neff et al., 1964). La tension d'oxygène commence à décroître à la demie de la phase exponentielle dans les cultures avec (Edwards et Lloyd, 1977a) et sans agitation (Byers et al., 1969). Ces derniers suggèrent que la diminution de la tension d'oxygène initie le processus d'enkystement. Cependant, aucune preuve n'a pu être apportée. La consommation d'oxygène se situe entre 5 et 18 nmoles / 10^6 cellules par minute pour les cellules en phase exponentielle. La consommation d'oxygène chez les kystes matures est trop faible pour être mesurée (Chagla et Griffiths, 1974). L'induction de l'enkystement provoque l'exocytose des particules non-digérées (Weisman et Moore, 1969; Stewart et Weisman, 1972). L'endocytose arrête et les vacuoles disparaissent. Toutes les organelles majeures trouvées chez les trophozoïtes sont présentes chez les kystes (Neff et Neff, 1969). L'induction et l'accomplissement de l'enkystement est totalement endogène et se fait en absence totale d'une source externe d'énergie. Le Tableau 1.1 montre les principales étapes du cycle d'enkystement-désenkystement. Tous les constituants majeurs des cellules diminuent lors de l'enkystement (Neff et Neff, 1969). La vitesse de disparition

Stage	Trophozoïte	Induction	Formation de la paroi kystique	Maturation	Dormition	Désenkystement	Trophozoïte
Durée	Années	4 - 6 h	20 - 24 heures	2-7 jours	Années	Heures ?	Années
Evénement	Initiation Arrondissement des cellules Synthèse des protéines-P (4 - 6 h) Arrêt de la respiration Synthèse de la cellulose (8 - 14 h?) Digestion de la paroi kystique Emergence						
Etape	Croissance - division	Enkystement			Survie	Désenkystement	Croissance - division

TABLEAU 1.1. Le cycle d'enkystement-désenkystement d'*Acanthamoeba castellanii*.

des protéines, des lipides, de l'ADN et de l'ARN est la plus élevée au cours des heures suivant immédiatement l'induction de l'enkystement. Il semble que cette période de déclin rapide coïncide avec la synthèse d'une paroi protéique riche en phosphate et probablement à celle de l'exclusion des débris autolysosomiaux.

La formation de la paroi kystique entraîne une excrétion extensive à travers la membrane, ce qui explique probablement l'augmentation marquée de l'activité de l'appareil de Golgi lors de l'enkystement (Bowers et Korn, 1967). La paroi kystique est entièrement construite à partir des constituants normaux des cellules végétatives. Elle est composée de 36 à 45% de protéines, et de 20 à 34% d'hydrates de carbone, principalement de la cellulose (Neff et Neff, 1969). Le contenu en phosphore est aussi élevé. La paroi kystique constitue environ 37% du poids sec des kystes (Tomlinson et Jones, 1962). Les unités glucose de la cellulose sont principalement dérivées des réserves de glycogène chez *Acanthamoeba castellanii* et *Acanthamoeba culbertsoni* (Verma et Raizada, 1975). Le cycle du glyoxylate est aussi disponible pour la formation de glucose à partir de métabolites à 2 carbones (Tomlinson, 1967).

Bien que parfois présent en faible quantité chez les cellules végétatives, le tréhalose (*O*- α -D-glucopyrannosyl-[1 \rightarrow 1]-*O*- α -glucopyrannoside) atteint une concentration élevée chez les kystes matures d'*Acanthamoeba* (Deslauriers et al.,

1980a). Ce phénomène est aussi observé chez d'autres organismes anhydro-tolérant ayant la propriété de pouvoir suspendre leur vie. Il est le sucre principal de l'hémolymphe des insectes. Plusieurs organismes accumulent de grandes quantités de tréhalose, certains jusqu'à une masse égale à 20% de leur poids sec (Crowe et al., 1984 et les références mentionnées). Parmi ceux-ci on retrouve les organismes anhydrobiotiques tels que les kystes de crevettes de mer *Artemia salina*, les larves ou les adultes de plusieurs espèces séchées de nématodes, la plante "resurrection plant" *Seligilla lepidophylla*, les microorganismes anhydro-tolérants tels les levures, les ascospores de *Neurospora* et les macrokystes du champignons *Dictyostelium*. La fonction exacte de ce disaccharide est actuellement l'objet de plusieurs études. Le fait qu'il se retrouve chez une aussi grande variété d'organismes résistants à la déshydratation suggère qu'il soit impliqué dans ce processus. Des travaux récents de calorimétrie à balayage différentiel (CBD), de spectroscopie infra-rouge (IR) et de RMN ont montré que ce sucre interagit avec le groupement phosphate de plusieurs lipides et stabilise les membranes lors de la déshydratation des cellules (Crowe et Crowe, 1984; Crowe et al., 1984; Lee et al., 1986). L'eau joue un rôle primordial dans le maintien de l'intégrité structurale et fonctionnelle des membranes biologiques et des macromolécules. L'élimination de l'eau par déshydratation ou lyophilisation provoque souvent des altérations importantes dans la fonction

membranaire, modification qui sont dues à la séparation de phase des composantes, l'aggrégation des particules membranaires, la perte de perméabilité ou la fusion des membranes. Le tréhalose aurait pour rôle de remplacer l'eau dans l'hydratation des bicouches et ainsi de préserver l'intégrité des membranes. Il semble aussi être la source d'énergie principale pour la germination pendant laquelle il est activement dégradé.

Un degré d'enkystement élevé est obtenu en milieu défini simplement en éliminant le glucose ou l'acétate, les principales sources de carbone des amibes. En milieu complexe, l'addition de Mg^{2+} (50 mM) aux cultures en phase stationnaire (Chagla et Griffiths, 1974) ou le transfert des cellules dans un milieu non-nutritif contenant une teneur élevée en Mg^{2+} provoque l'enkystement (Griffiths et Hughes, 1969). Bien que d'autres substances puissent induire un haut degré d'enkystement, tous les chercheurs s'accordent à dire que la présence de Mg^{2+} est essentielle. Son rôle demeure encore obscur. Cependant, nous savons qu'une concentration élevée en magnésium inhibe temporairement la division des cellules en phase de croissance logarithmique. Chagla et Griffiths (1978) ont tiré profit de cet effet pour synchroniser des cultures de cellules. Il est bien connu que la concentration intracellulaire en Mg^{2+} contrôle l'activité enzymatique de nombreuses protéines cellulaires. Cependant, les études de Pal (1972) suggèrent que le Mg^{2+} est imperméable à la membrane d'*Acanthamoeba*, mais qu'à une concentration

élevée, il décroît l'activité de la vacuole contractile. Il est par conséquent plausible de supposer que le Mg^{2+} affecte la fonction membranaire en interagissant avec les protéines ou les lipides de la membrane. McLaughlin et al. (1978) ont d'ailleurs montré que la phosphatidylcholine, un des lipides présents dans les membranes d'*Acanthamoeba*, lie le Mg^{2+} dans un rapport de 1:1 avec une constante de dissociation K_D de 1. Krichevsky et Love (1965) ont suggéré que le magnésium altère la perméabilité de la membrane et diminue l'apport nutritif à la cellule.

Contrairement aux résultats de Pal (1972), Larochelle et Gagnon (1977) ont montré lors d'études d'osmorégulation chez *Acanthamoeba castellanii* qu'une augmentation de la teneur intracellulaire des ions Na^+ , K^+ , Mg^{2+} et Ca^{2+} était possible lors de stress hyperosmotiques où la concentration des ions dans le milieu de culture est augmentée. A partir de cette observation, on peut supposer qu'une augmentation même temporaire de la concentration intracellulaire de Mg^{2+} pourrait perturber le fonctionnement de certaines enzymes et ainsi initier le processus d'enkystement. Il est intéressant de noter que la synthèse du tréhalose, principal sucre des kystes, est stimulée chez le vers à soie *Hyalophora cecropia* par une augmentation de la concentration en Mg^{2+} de l'hémolymphe (Murphy et Wyatt, 1965; Jungreis et al., 1974).

Band (1975) a montré que le diméthylsulfoxyde (DMSO) induit l'enkystement des cellules, en présence de faibles

concentrations de Mg^{2+} et de Ca^{2+} . Le DMSO n'a d'effet qu'en présence de Ca^{2+} dans le milieu d'enkystement. Selon Band, le DMSO pourrait causer une augmentation de la perméabilité de la membrane au Ca^{2+} et suggère que l'augmentation intracellulaire de cet ion aurait un effet régulateur sur les processus enzymatiques impliqués dans l'enkystement. Ses études ont par contre montré que le $^{45}Ca^{2+}$ n'est pas incorporé de façon significative dans les éléments structuraux de la cellule lors de l'enkystement et que le contenu en Ca^{2+} est inférieur dans les kystes par rapport aux trophozoïtes. Il est cependant possible que l'augmentation recherchée en Ca^{2+} ne soit que transitoire.

L'AMP cyclique (AMP_c) semble impliqué dans l'enkystement. Une augmentation transitoire de 2 à 3 fois son niveau normal a été observée dans les cultures en suspension d'*Acanthamoeba castellanii* lors du passage de la phase logarithmique à la phase stationnaire, après l'addition de bromure d'éthylène (un inducteur de l'enkystement) aux cellules en phase logarithmique ou après le transfert des cellules dans un milieu non-nutritif (Gessat et Jantzen, 1974). L'activité de la phosphodiesterase subit un changement transitoire semblable à celui de l' AMP_c . La suggestion que l' AMP_c soit la substance-clé déclenchant l'enkystement fait suite aux observations que l'enkystement peut être initié par la théophylline, un inhibiteur de la phosphodiesterase, et par l'addition d' AMP_c ou de dibutyryl- AMP_c (un analogue de l' AMP_c

capable de traverser les membranes plasmiques) au milieu de culture (Raidzada et Krishna Murti, 1972). Krishna Murti et Shukla (1984) ont proposé un modèle selon lequel la taurine et les amines biogéniques (épinéphrine) qui stimulent l'enkystement se lient à un récepteur localisé à la surface de la membrane et couplé à une adénylate cyclase membranaire, ressemblant au récepteur β -adrénergique des cellules mammifères. L'action de la taurine et de l'épinéphrine ainsi que l'élévation de l'activité de l'adénylate cyclase sont inhibées par l'actinomycine D (un inhibiteur de la transcription de l'ADN) ou la cycloheximide (inhibiteur de la synthèse protéique chez les eukariotes) suggérant que le contrôle de la différenciation soit exercé au niveau transcriptionnel et translationnel (Krishna Murti, 1975). L'implication exacte de l'AMP_c dans le processus d'enkystement est inconnue. Il semble cependant impliqué dans la régulation des niveaux de glycogène (Weisman, 1976; Gessat et Jantzen, 1974) et joue possiblement un rôle de second messenger en agissant directement ou non au niveau de l'ADN.

Villemez et al. (1985) ont induit l'enkystement chez *Acanthamoeba castellanii* à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques liant une protéine membranaire de poids moléculaire élevé. Un autre anticorps qui se lie avec la protéine principale de la membrane plasmique n'influence ni la division cellulaire, ni la différenciation. Tous les anticorps effectifs inhibent la pinocytose. Les auteurs suggèrent deux mécanismes d'action possibles: 1° l'antigène

plasmique est relié directement au mécanisme de pinocytose, l'arrêt de la pinocytose étant relié à l'enkystement; 2° les amibes possèdent un récepteur membranaire à la surface des cellules qui, une fois stimulé, a pour fonction d'initier la différenciation cellulaire. Cette dernière hypothèse serait en accord avec le modèle de Krishna Murti et Shukla (1984) précédemment décrit.

Plusieurs inhibiteurs de la synthèse de l'ADN sont connus comme promoteurs de l'enkystement chez *Acanthamoeba castellanii*. Neff et Neff (1972) ont étudié l'effet de plus de 40 composés et ont conclu que les inhibiteurs de la synthèse de l'ADN nucléaire sont les plus efficaces pour induire l'enkystement et que l'arrêt de la répllication de l'ADN pourrait être la clé des événements initiateurs de l'enkystement. Un faible taux d'enkystement est obtenu dans les cultures en phase stationnaire non-diluées probablement à cause de la tension en oxygène trop faible. Relativement peu de choses sont connues sur l'action moléculaire des inhibiteurs de la synthèse d'ADN chez *Acanthamoeba*. Byers (1979) a suggéré que leur site d'action se situe au niveau d'ADN non-nucléaire, présumément mitochondrial (ADN_{nt}). Cette suggestion fait suite à l'observation que les inhibiteurs spécifiques de la synthèse d' ADN_{nt} tels que le bromure d'éthylène et le bérénil sont parmi les meilleurs inducteurs de l'enkystement, qu'une dégradation préférentielle de l' ADN_{nt} se produise lors de l'enkystement

induit en milieu appauvri et que les substances relâchées par les mitochondries en présence de bérénil stimulent activement l'enkystement. Le produit activant l'enkystement relâché par les mitochondries, n'a pas encore été caractérisé. Une activité semblable a été observée dans un extrait obtenu à partir du milieu de cellules enkystées sous l'action de bérénil, ainsi que dans le milieu de cellules cultivées en milieu défini et enkysté par jeûne après l'élimination du glucose ou de l'acétate. Le composé semble une molécule relativement petite, possiblement un nucléotide puisqu'il est sensible à la phosphodiesterase de venin de serpent et qu'il résiste bien aux nucléases, amylases et protéases, à l'action du NaOH 1 N à 25°C et à l'inactivation par la chaleur à 100°C (Atkins et Byers, 1980). Dans le milieu, son activité semble reliée à celle d'une plus grosse molécule qui est sensible à l' α -amylase.

1.3.2 Le désenkystement

Lors de l'enkystement, les cellules semblent relâcher une substance qui inhibe la formation de colonies de cellules de la même espèce (Dubes et Jensen, 1964). Le désenkystement des cellules est obtenu par leur transfert dans un milieu nutritif frais. Le désenkystement chez *Acanthamoeba culbertsoni* est stimulé par des substances thermostables extraites à partir d'une variété de bactéries et de champignons, et contenues dans la peptone, la protéose peptone, la tryptone et les acides aminés (Kaushal et Shukla, 1977a). Les facteurs les

plus actifs dans les extraits bactériens sont l'acide glutamique, suivi de la sérine, la thréonine, et l'alanine (Kaushal et Shukla, 1977b). L'étude de la relation-structure activité suggère que les composés les plus actifs sont ceux de structure similaire à l'acide γ -aminobutyrique (Kaushal et Shukla, 1977c). Il est intéressant de noter que les quatre acides aminés identifiés comme étant actifs sont tous non-essentiels pour la croissance de plusieurs espèces d'*Acanthamoeba*, incluant *Acanthamoeba culbertsoni* et *Acanthamoeba castelanii*.

Bien que les kystes semblent matures après 50 heures ou moins, ils sont pour la plupart incapables de se désenkyster lorsqu'ils sont transférés dans un milieu nutritif (Chambers et Thompsons, 1974). Leur capacité à se désenkyster et leur degré de synchronie augmentent avec le temps et atteignent un maximum après environ 800 heures. Ces observations suggèrent que certains processus métaboliques ou physiologiques initiés lors de l'enkystement, doivent être complétés avant de pouvoir amorcer le processus de désenkystement.

CHAPITRE 2

LA SPECTROSCOPIE DE RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE

2.1 Introduction

L'avènement de la technique de transformée de Fourier en spectroscopie RMN a permis le développement d'une vaste gamme d'applications dans des champs d'activités très diversifiés. Il y a à peine quelques années, la spectroscopie RMN était surtout réservée à l'élucidation de structures de composés organiques. Avec la commercialisation d'aimants supraconducteurs à champs élevés (7 à 11.8 Tesla) et d'ordinateurs plus performants, la spectroscopie RMN est aujourd'hui considérée comme étant un outil de choix pour des études aussi complexes que les cinétiques enzymatiques, l'élucidation de la structure tridimensionnelle des protéines, l'étude des mouvements des macromolécules, l'étude de noyaux peu sensibles dans les composés organiques ou inorganiques, et la spectroscopie des solides. La technique étant non-invasive et non-destructrice, la spectroscopie *in vivo* est de plus en plus utilisée dans l'étude du métabolisme des systèmes biologiques micro- et macroscopiques. Le développement rapide et récent de techniques d'imagerie a fait faire un grand pas à la physiologie et à la médecine grâce à la

grande précision des images obtenues et leur richesse en information.

2.2 La spectroscopie RMN à transformée de Fourier

Les noyaux possédant soit un nombre de masse impair, soit un numéro atomique impair, ou les deux, ont un moment angulaire de spin et un moment magnétique. Pour chaque noyau ayant un spin, un nombre défini d'états de spin peuvent être adoptés. Ce nombre est déterminé par le nombre de spin quantique I qui est une valeur propre à chaque noyau. Le nombre d'états permis est donné par la relation $2I + 1$. En absence de champ magnétique externe, tous les états de spin ont une énergie équivalente. Les noyaux se répartissent donc également dans les états de spin permis. Un noyau, comme toute particule chargée en mouvement, génère son propre champ magnétique. Donc, un noyau possède un moment magnétique (μ) par sa charge et par son spin. Pour un noyau de spin $1/2$ soumis à un champ magnétique B_0 , les noyaux d'état de spin $+1/2$ (qui tournent dans le sens des aiguilles d'une montre) aligneront leur moment magnétique dans le sens du champ magnétique, à l'opposé des noyaux de spin $-1/2$. La différence de population entre les deux niveaux d'énergie est directement proportionnelle à la force du champ magnétique appliqué. Cette différence dépend aussi du noyau observé. Chaque noyau a un moment magnétique μ et un moment angulaire qui lui est propre, puisque tous possèdent une charge et une masse différentes. Le rapport entre le moment magnétique et le moment angulaire,

nommé le rapport gyromagnétique γ , détermine la relation entre les différents niveaux d'énergie et le champ magnétique.

L'équation exacte est:

$$\Delta E = \gamma \left(\frac{h}{2\pi} \right) B_0 = h\nu$$

où h est la constante de Planck et ν la fréquence de résonance. Pour un système à deux états de spin ($I = 1/2$), le rapport de la population en équilibre dans les différents niveaux d'énergie N_p et N_q , est donné par la relation:

$$N_q/N_p = \exp(-\gamma\hbar B_0/kT)$$

où $\hbar = h/2\pi$, k est la constante de Boltzmann et T , la température. La différence de population donnera la grandeur du vecteur net de magnétisation. Elle est reliée à l'intensité du signal de précession libre. Sous l'influence d'un champ magnétique, les noyaux "précessent" à une fréquence angulaire ω appelée fréquence de Larmor (Fig. 2.1). La fréquence de précession est directement proportionnelle à la force du champ magnétique. La fréquence exacte de précession des noyaux d'une espèce varie légèrement selon leur environnement électronique dans la molécule qu'ils constituent. Le flot des électrons autour du noyau génère un champ magnétique qui s'oppose au champ magnétique appliqué. Plus la densité électronique autour du noyau est élevée, plus celui-ci sera blindé. La fréquence de Larmor diminue en conséquence. En observant la fréquence de résonance de

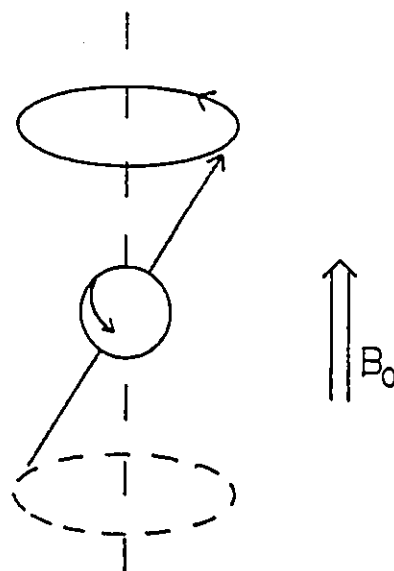


FIG. 2.1. Mouvement de précession d'un noyau sous l'influence d'un champ magnétique externe.

chaque noyau, on obtient de l'information sur son environnement électronique, donc sur la molécule qu'ils constituent.

Pour un noyau d'intérêt, les signaux de résonance de différentes fréquences de Larmor, présents dans une fenêtre spectrale choisie, forment un vecteur de *magnétisation macroscopique* M de grandeur M_0 , parallèle au champ magnétique externe B_0 (Fig. 2.2a). Une impulsion de fréquence radio B_1 produit par une bobine et dirigée sur l'axe des x , bascule M loin de l'axe des z . La durée et la puissance de l'impulsion B_1 déterminent l'angle parcouru par M dans le plan z,y . Pour une impulsion de 90° ou $\pi/2$, M se retrouve le long de l'axe y , dans la région positive (Fig. 2.2b). La *magnétisation longitudinale* est alors transformée en *magnétisation transversale*. La gamme de fréquences linéairement excitées

par une impulsion de durée τ est décrite par la relation $\Delta\nu \cong 1/2\tau$. Avec la puissance des sources de fréquence radio des spectromètres modernes, la durée requise pour produire une impulsion de 90° varie entre 5 et 25 μs , ce qui permet d'observer des domaines de fréquences de 100,000 à 20,000 Hertz respectivement. Comme les fréquences de Larmor des moments magnétiques présents ne sont pas toutes identiques, le vecteur M se divise en ses diverses composantes dans le plan x,y (Fig. 2.2c). Dans une sonde RMN, le mouvement des différents moments magnétiques dans la région sensible de la bobine de fréquence radio induit un voltage d'allure sinusoïdale qui sera enregistré par le spectromètre. Le signal déclinera éventuellement d'intensité par son retour à l'état d'origine (dans la direction de l'axe z) et par sa dispersion dans le plan x,y . Selon le théorème de Nyquist, la fréquence d'échantillonnage d'un signal d'induction libre doit être au moins deux fois supérieure à la fréquence la plus élevée qui le compose. Pour un atome d'hydrogène soumis à un champ magnétique de 7.05 Tesla, la fréquence de Larmor de l'atome est d'environ 300 MHz. La fréquence d'échantillonnage minimale requise serait alors de 600 MHz. La mémoire nécessaire pour enregistrer un signal d'une durée de 1 seconde serait d'environ 600,000 mots de mémoire, ce qui est énorme. Malgré les progrès de l'électronique moderne, les convertisseurs analogique-numérique modernes les plus rapides ne fonctionnent qu'à une vitesse de quelques MHz. De plus, un ordinateur ayant la puissance et la capacité d'emmagasinage

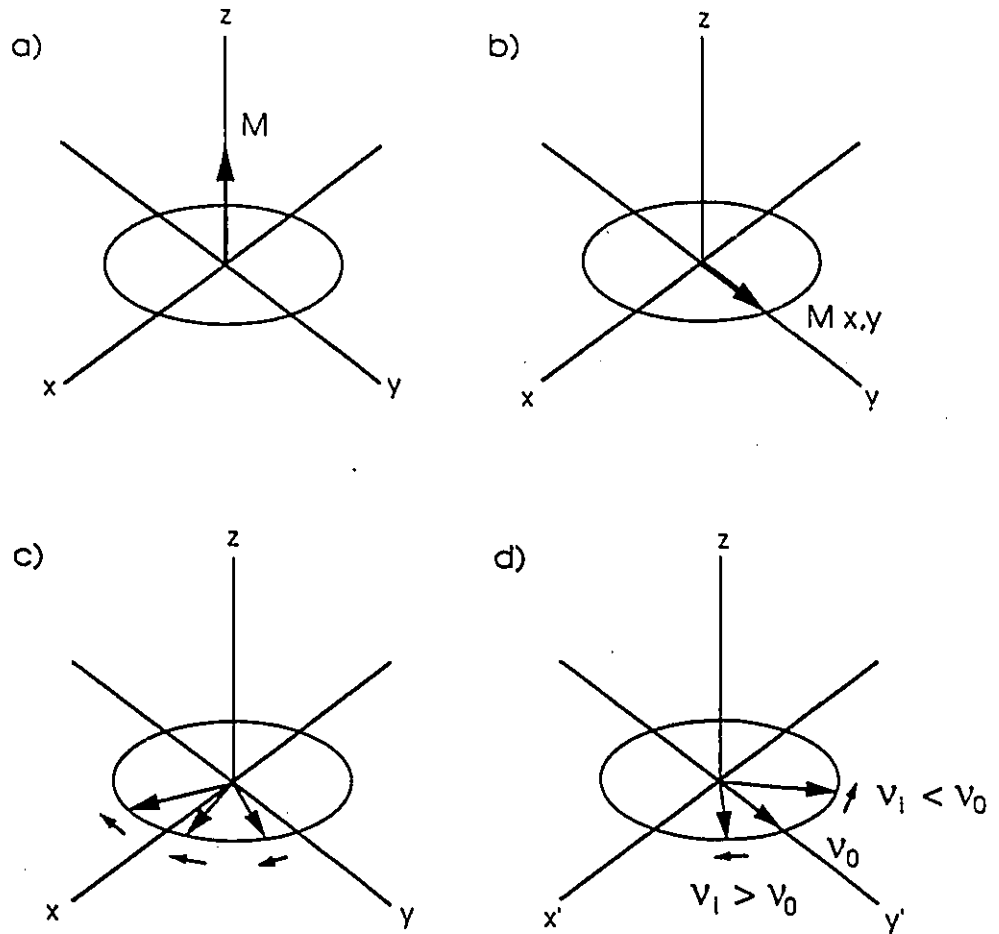


FIG. 2.2. Système de coordonnées et vecteurs de magnétisation.

a) Vecteur de magnétisation macroscopique M dans le système de coordonnées du laboratoire; b) Effet d'une impulsion de 90° sur le vecteur de magnétisation; c) Déphasage de M et précession des différents moments magnétiques à leur fréquence de Larmor dans le système de coordonnées du laboratoire et d) dans le système de coordonnées du référentiel tournant $K'(x',y',z)$ (voir texte).

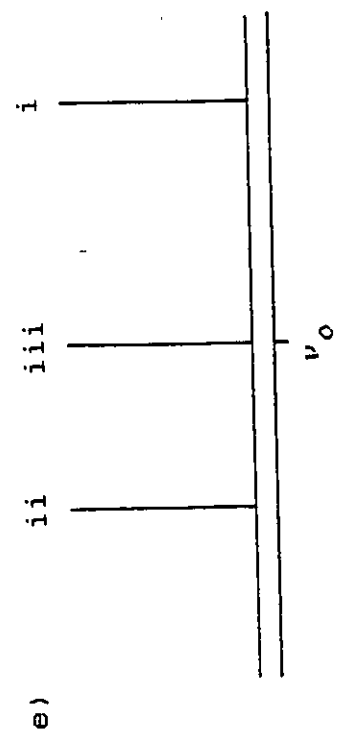
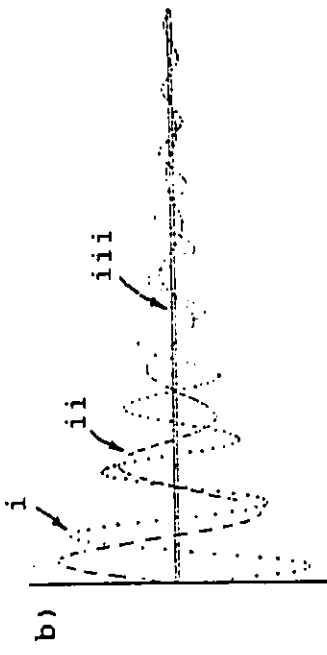
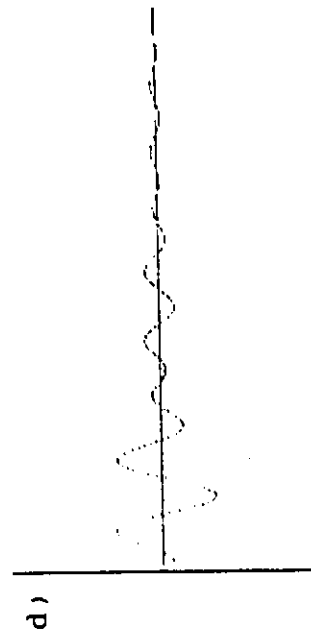
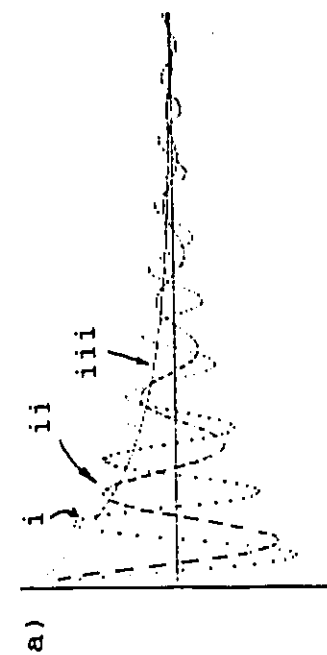
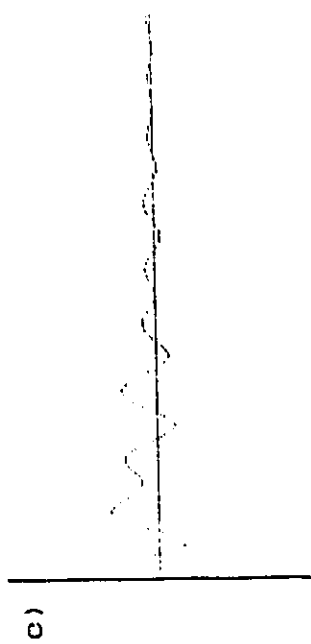
requis pour effectuer les calculs mathématiques sur une quantité aussi énorme de données serait très dispendieux. Pour solutionner ce problème, on a recours à un système électronique ingénieux. En superposant au signal d'induction libre un signal sinusoïdal de même fréquence que celle de l'impulsion d'excitation, on obtient une onde comprenant un terme de somme et un terme de différence. Un filtre passe-bas élimine les composantes de hautes fréquences et le signal enregistré est la différence entre la fréquence de Larmor des divers moments ν_i et la fréquence d'excitation ν_0 habituellement centrée sur le domaine d'intérêt.

Le déplacement des vecteurs de magnétisation est habituellement représenté schématiquement en utilisant le système du référentiel tournant, introduit par Torrey (1949). Il utilise un système de coordonnées K' qui tourne dans le même sens et à la même fréquence que le signal de référence (Fig. 2.2d). Il sert à représenter le comportement des noyaux dans le champ magnétique tel qu'observé par la RMN une fois soustrait de la fréquence d'excitation. Les composantes excitées dans le plan x',y' ayant une fréquence supérieure à la fréquence de l'impulsion d'excitation tourneront dans le système d'axe dans le sens des aiguilles d'une montre. Ceux de fréquences inférieures tourneront dans le sens inverse. Pour un signal observé uniquement le long de l'axe des y' , la fréquence du signal d'induction libre enregistré sera la différence entre la fréquence de Larmor et celle de la fréquence de référence. On ne pourra cependant pas dire si

elle est inférieure ou supérieure au signal de référence. A l'aide d'un circuit électronique spécial, on peut observer à l'aide d'une seule bobine le signal le long de deux axes préalablement choisis dans le plan x',y' . En observant le signal le long des axes des x' et des y' simultanément, le signal observé le long de l'axe des y' à la suite d'une impulsion de 90° sera une forme d'onde cosinus d'intensité exponentiellement décroissante. Il sera appelé le signal du domaine réel. Son signal complémentaire, observé le long de l'axe des x' sera de forme sinusoïdale d'intensité décroissante. Il sera appelé le signal du domaine imaginaire. Des exemples de signaux de précession d'ondes réelles et imaginaires sont illustrés à la Figure 2.3. La représentation spectrale d'un signal de précession libre est rendue possible par la transformée de Fourier. Les composantes essentielles de tout spectromètre à transformée de Fourier sont: 1° un champ magnétique de haute puissance; 2° une sonde capable de produire une impulsion de fréquence radio excitatrice et capable de percevoir les mouvements des différents moments magnétiques et de les traduire en signal analogue électrique; 3° un convertisseur analogique-numérique; 4° une mémoire tampon d'accès rapide où le signal de précession sera sauvegardé; 5° un ordinateur numérique pour effectuer la transformée de Fourier, la manipulation des spectres et les calculs subséquents. La transformée de Fourier convertit un signal acquis dans un domaine de temps en un spectre dans un domaine de fréquence. La largeur des raies spectrales

FIG. 2.3. Signaux de précession libre.

Les figures a) et b) représentent respectivement les parties réelle et imaginaire de trois signaux de précession libre de fréquence: i) $\nu_j < \nu_0$; ii) $\nu_{jj} > \nu_0$; et iii) $\nu_{jj} = \nu_0$ et où $|\nu_j - \nu_0| > |\nu_{jj} - \nu_0|$. Pour un échantillon contenant uniquement ces trois composantes, les signaux de précession réels et imaginaires enregistrés par le spectromètres seraient identiques à ceux illustrés à la figure c) et d). La figure e) est le spectre de fréquences obtenu par la transformée de Fourier des signaux de précession libre des figures c) et d).



observées est inversement reliée au temps d'observation du signal de précession, donc à sa vitesse de relaxation. La perte du signal est reliée à deux processus, la relaxation longitudinale et la relaxation transversale. Le dernier mécanisme prédomine toujours sur le premier ($T_1 \geq T_2$). Le processus de relaxation T_1 est causé par des interactions avec des mécanismes générant des champs magnétiques fluctuants dans le plan x',y' alors que le processus de relaxation T_2 provient de l'interaction avec des composantes dans les trois dimensions. La relaxation est plus efficace lorsque la fréquence de ces fluctuations est proche de celle du mouvement moléculaire τ_c (temps de corrélation).

Le temps de relaxation longitudinale T_1 caractérise la vitesse à laquelle le vecteur de magnétisation M retourne à son état initial d'équilibre dans la direction de l'axe des z . Elle est fonction de l'interaction du système de spin avec son environnement. Plusieurs interactions physiques impliquées dans ce mécanisme ont été identifiées. Ces processus sont: 1° l'interaction dipôle-dipôle; 2° l'interaction quadripôle électrique; 3° l'interaction de l'anisotropie du déplacement chimique; 4° l'interaction du couplage scalaire; et 5° l'interaction spin-rotation. Ces processus sont décrits en détail dans la plupart des livres de spectroscopie RMN (Becker, 1980; Levy *et al.*, 1980).

Le temps de relaxation transversale effectif T_2^* caractérise la vitesse de relaxation du signal dans le plan

x,y. La perte transversale de magnétisation est due à trois mécanismes distincts: la relaxation transversale elle-même, la non-homogénéité du champ magnétique B_0 et le couplage spin-spin avec des noyaux voisins. La largeur de raie à la mi-hauteur $\nu_{1/2}$ est une fonction directe de la relaxation transverse effective T_2^* . La relation exacte est donnée par l'équation $\nu_{1/2} = 1/\pi T_2^*$. De façon générale, la non-homogénéité du champ magnétique est la cause principale de l'élargissement des raies des molécules en spectroscopie à haute résolution. En spectroscopie *in vivo*, les phénomènes d'échange et d'équilibre participent aussi à l'élargissement des raies.

2.3 La RMN *in vivo*

La spectroscopie RMN est assez unique par le type d'information qu'elle permet d'obtenir. Etant non-envahissante et non-destructrice, elle permet de suivre directement à l'intérieur des cellules vivantes les changements de concentrations des métabolites qui s'y trouvent en fonction du temps. Cependant, dû au principe même de la spectroscopie RMN, la technique est peu sensible en comparaison avec les techniques plus traditionnelles d'études du métabolisme. Pour des études du métabolisme par RMN, le noyau idéal devrait posséder les caractéristiques suivantes: 1° un nombre quantique de spin de 1/2 afin d'éviter l'élargissement des raies par la présence d'un moment quadrupolaire; 2° une grande gamme de déplacements chimiques

en comparaison avec la largeur naturelle des raies, pour réduire les probabilités de superposition de raies; 3° une concentration élevée dans les tissus biologiques; et 4° avoir une sensibilité naturelle élevée en spectroscopie RMN. Considérons les principaux noyaux présents dans les intermédiaires métaboliques (Tableau 2.1), soit le ^{12}C , le ^1H , le ^{16}O , le ^{14}N et le ^{31}P . Parmi ceux-ci, le ^{12}C et le ^{16}O n'ont pas de spin et ne sont donc pas observables par RMN. Le ^1H , le ^{31}P et le ^{13}C ont un nombre quantique $I = 1/2$, ce qui est idéal pour des études métaboliques. Le ^{13}C possède par contre une abondance naturelle très faible, ce qui complique sa détection. Le ^{14}N a un spin de 1 et possède un moment quadripolaire qui normalement génère un élargissement des raies observées. Les temps de relaxation des atomes liés au ^{14}N sont en général diminués. Par exemple, même dans les conditions où les échanges de protons n'interviennent pas et donc, ne contribuent pas à l'élargissement des raies (ex: solvant aprotique), les raies des protons sur les groupements $-\text{NH}$, $-\text{NH}_2$ et $-\text{NH}_3^+$ sont souvent si larges qu'elles sont inobservables.

Le proton est le plus sensible et le plus abondant des noyaux présent dans les systèmes biologiques. Cependant, la combinaison de sa faible gamme de déplacements chimiques (Fig. 2.4), du nombre élevé d'atomes par molécule et la présence de macromolécules tournant à des vitesses réduites en solution génère un spectre complexe composé de raies étroites et larges superposées, difficile à interpréter. Le couplage intensif des

TABLEAU 2.1. Propriétés spectroscopiques de noyaux importants dans les études des systèmes biologiques.

Noyau	Nombre quantique de spin	Sensibilité relative (no. égal de noyau)	Abondance naturelle	Fréquence (MHz) à 7.0 Tesla
^1H	1/2	1	100	300
^2H	1	9.7×10^{-3}	1.5×10^{-3}	46.05
^{13}C	1/2	1.6×10^{-2}	1.1	75.45
^{14}N	1	1.0×10^{-3}	99.6	21.45
^{15}N	1/2	1.0×10^{-3}	0.4	30.45
^{17}O	5/2	2.9×10^{-2}	3.7×10^{-2}	40.65
^{19}F	1/2	0.83	100	282.75
^{23}Na	3/2	9.3×10^{-2}	100	79.35
^{31}P	1/2	6.6×10^{-2}	100	121.5

protons entre eux décuple rapidement le nombre de raies et complique proportionnellement leur interprétation. De plus, le signal provenant des protons de l'eau présents en concentration d'au moins 1000 fois supérieure à celle de la plupart des métabolites, masque une bonne portion du spectre. Le remplacement total ou partiel de H_2O par D_2O est déconseillé dans la plupart des cas, car la vitesse de plusieurs réactions enzymatiques et par conséquent le métabolisme, peut être gravement perturbé. Plusieurs séquences d'impulsions de RMN ont été développées pour

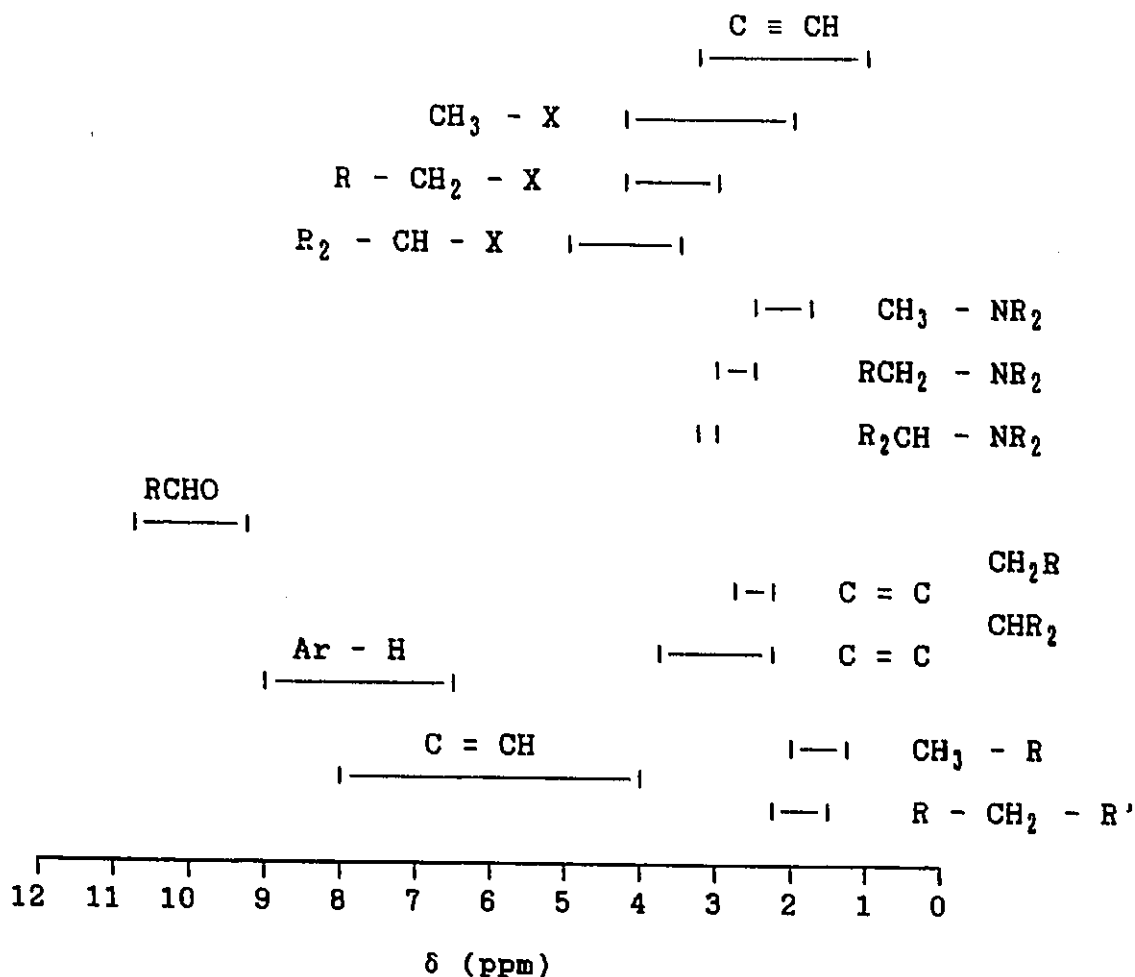


FIG. 2.4. Déplacement chimique de quelques groupements fonctionnels importants en ^1H . X = halogène, -OR, -NHCOR, -OCOR (R = alcoyle; Ar = aryle).

minimiser ces problèmes et faciliter l'utilisation de ce noyau dans les études du métabolisme de molécules de faible poids moléculaire.

Le ^{31}P est jusqu'à présent le noyau le plus communément employé pour les études métaboliques. Son abondance naturelle est de 100% et sa sensibilité de 1/6 de celle du proton. Sa

gamme de déplacements chimiques est aussi beaucoup plus grande (Fig. 2.5). Bien que le nombre de métabolites phosphorylés visibles soit relativement restreint, beaucoup jouent un rôle important dans le "métabolisme énergétique" de la cellule. Les composantes le plus souvent étudiées sont la phosphocréatine, l'ATP, et le phosphate inorganique ainsi que leur interrelation. Le pK_a des groupes phosphorylés de plusieurs métabolites (dont le P_i) est voisin du pH intracellulaire. Sous les conditions habituelles d'observation en RMN, les sous-espèces de ses composés sont en équilibre rapide et pour cette raison, une seule raie est observée. Le déplacement chimique de cette raie est fonction de la proportion des sous-espèces présentes (donc le pH) et du déplacement chimique de leur raie respective. La position de la raie observée peut donc être utilisée pour mesurer les changements de l'acidité intracellulaire de l'organisme soumis à diverses conditions. Comme le déplacement chimique des atomes est aussi fonction de la température, la force et la composition ionique du milieu ainsi que de plusieurs autres facteurs, il est difficile d'obtenir des mesures absolues des valeurs de pH. Par contre, il est possible de détecter des variations de pH inférieures à 0.1 unité.

Le ^{13}C a un rapport gyromagnétique quatre fois plus faible que celui du proton. Sa sensibilité n'est que de 1.6% de celle du 1H . Puisque son abondance naturelle n'est que de 1.1%, il est évident que dans un même échantillon, la

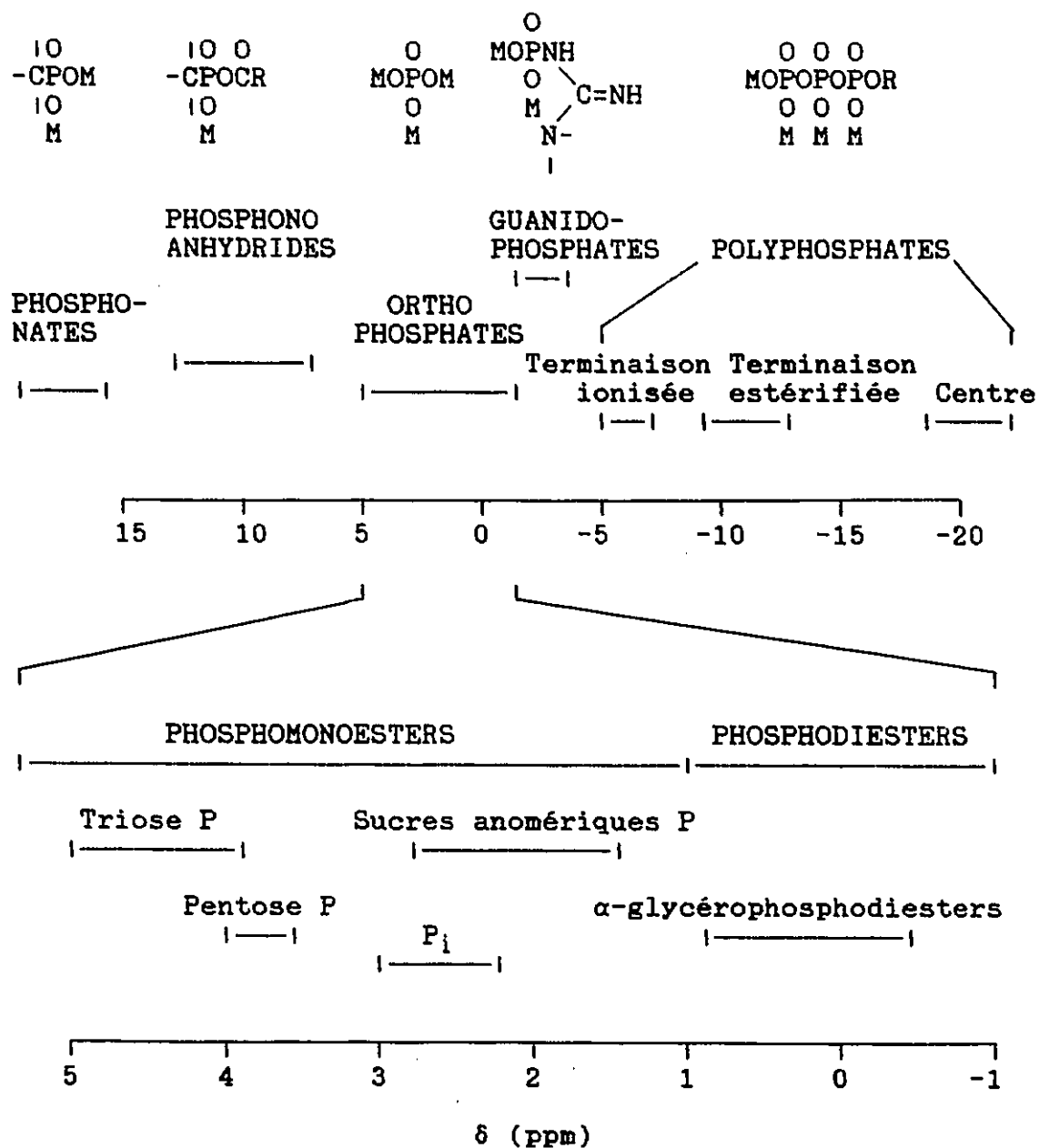


FIG. 2.5. Déplacements chimiques des principaux groupements phosphorylés importants en spectroscopie du ^{31}P des systèmes biologiques (M = cation). (H_3PO_4 85% = 0 ppm)

sensibilité globale du signal de ^{13}C n'est que de 0.01% de celle du ^1H . Le ^{13}C est le plus intéressant des noyaux car il constitue le squelette des métabolites d'intérêt. La vaste gamme de déplacements chimiques (Fig. 2.6), et un rapport d'atomes par molécule adéquat fait que les spectres de ^{13}C sont en général faciles à interpréter et très riches en information. Malheureusement, ils s'avèrent aussi difficiles à obtenir dû à la faible abondance naturelle du noyau. Cependant, cet inconvénient peut être mis à profit en se servant de molécules enrichies en ^{13}C pour suivre les sentiers métaboliques d'intérêt.

Le Tableau 2.2 résume les caractéristiques des noyaux principalement utilisés en spectroscopie des systèmes biologiques. Le ^{23}Na est probablement le quatrième noyau d'importance en RMN *in vivo*. Il est utilisé dans la détermination du Na intracellulaire et en imagerie. Le ^{15}N a l'avantage de posséder un spin de 1/2 et de couvrir une large gamme de déplacement chimique (400 ppm). Il est un important constituant des acides aminés libres et des protéines. Son désavantage est sa faible sensibilité (1×10^{-3}) et sa faible abondance naturelle. Il a été utilisé dans l'étude de cellules entières cultivés en milieu enrichi en ^{15}N (Lapidot et Irving, 1977). Les résonances observées provenait principalement des groupements relativement mobiles des peptides et protéines des membranes cellulaires et non pas des acides aminés libres. Le ^{19}F est présent en faible concentration, sous forme ionique, dans les systèmes

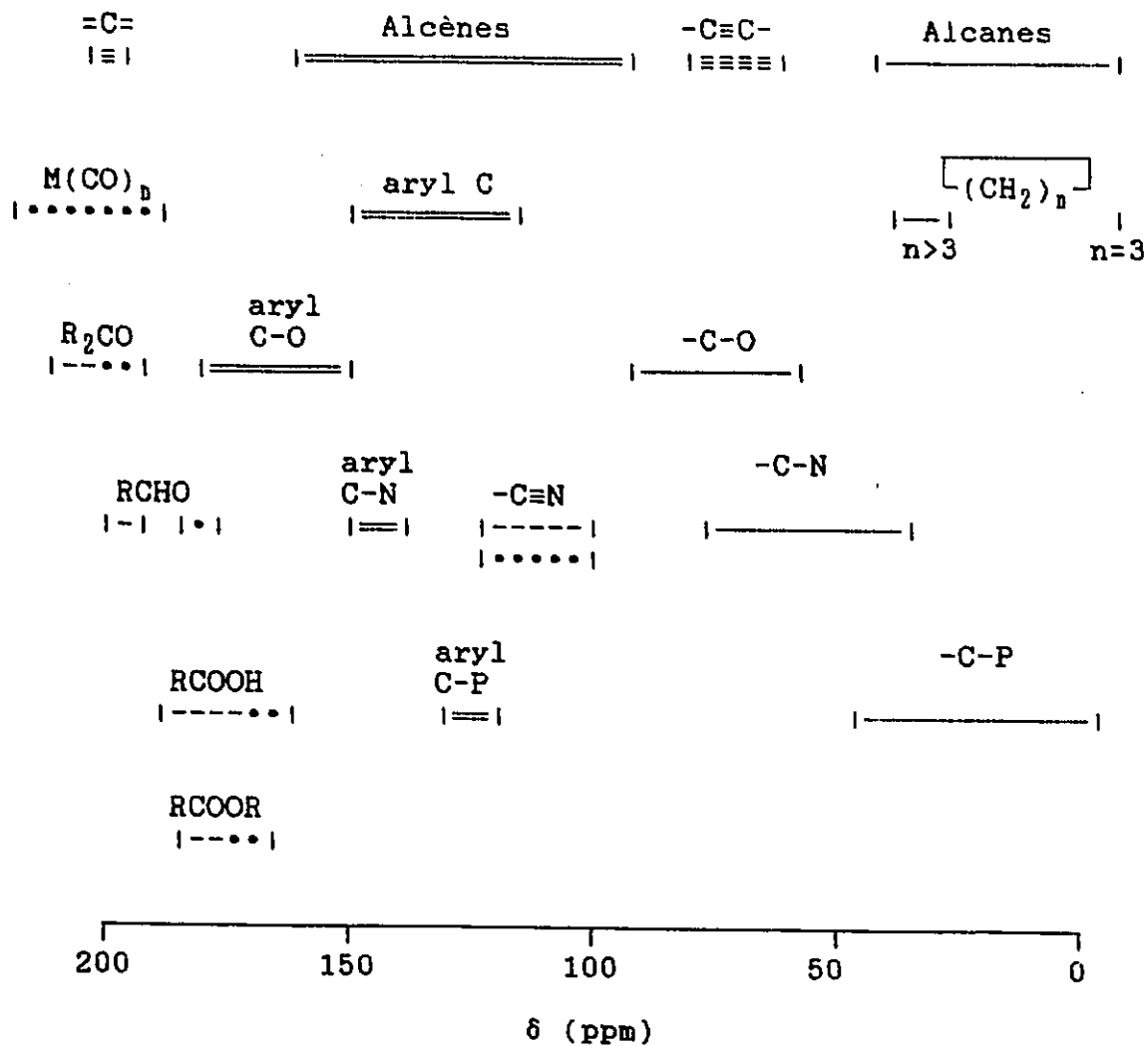


FIG. 2.6. Déplacements chimiques de quelques groupements fonctionnels en spectroscopie du ^{13}C .

L'hybridation des carbones est notés par --- pour sp^3 , = pour sp^2 et = pour sp . Les groupements carbonyles sont indiqués comme étant conjugués --- , ou non-conjugués --- .

TABLEAU 2.2. Comparaison des propriétés spectroscopiques de noyaux couramment utilisés pour l'étude des systèmes biologiques.

Noyau	Sensibilité (vs. ^1H) (abondance naturelle)	Gamme de déplacements chimiques (ppm)	Nombre de composés d'intérêt
^1H	100	15	Très élevé
^{31}P	16	60	Peu, mais important
^{13}C	0.01*	250	Potentiellement élevé

* Peut être presque triplé par l'effet Overhauser nucléaire.

biologiques. Sa sensibilité élevée (83% de celle du proton) et son abondance naturelle de 100% rendent ce noyau intéressant pour des expériences à l'aide de métabolites marqués au ^{19}F .

2.4 La spectroscopie de cultures cellulaires

La spectroscopie RMN constitue une technique unique pour étudier le processus d'enkystement chez *Acanthamoeba castellanii* puisqu'elle permet de suivre de façon non perturbante les changements de concentration des métabolites majeurs des cellules en fonction du temps. Dans les conditions expérimentales utilisées, l'obtention de spectres dans un temps raisonnable et avec un rapport signal sur bruit convenable, requiert d'emprisonner de 2 à 5 cm³ de cellules

dans le volume observé par la bobine RMN. Les cellules doivent tout au long de l'expérience être maintenues dans des conditions physiologiques acceptables. Elles doivent par conséquent être approvisionnées en éléments nutritifs et en oxygène durant la durée du processus étudié, soit environ 36 heures pour l'enkystement chez *Acanthamoeba*. Les déchets métaboliques doivent être éliminés pour éviter l'intoxication des cellules. Le pH du milieu doit être maintenu à des valeurs physiologiques acceptables.

Au cours des premières études de RMN, les cellules étaient simplement maintenues en vie en faisant barboter de l'oxygène dans le tube RMN contenant une suspension de cellules de densité élevée (Navon *et al.*, 1977; Ugurbil *et al.*, 1982). Le volume occupé par les cellules constitue habituellement entre 30 et 75% du volume observé par la bobine RMN. Les cellules sont maintenues en suspension par l'agitation créée par l'échappement à un débit constant et élevé des bulles de gaz. Un premier inconvénient inhérent à cette technique est la perturbation de l'homogénéité du champ magnétique par les bulles de gaz. Ogawa *et al.* (1978) ont remédié à ce problème en synchronisant l'accumulation des signaux RMN avec l'intervalle entre les bulles. Plus récemment, Santos et Turner (1986) ont préféré optimiser le système de barbotage au niveau du tube RMN pour éviter les problèmes de non-homogénéité et de sédimentation. Malgré ces améliorations, l'éclatement des bulles de gaz à la surface du

liquide cause souvent le bris des cellules. Les systèmes utilisant des agitateurs mécaniques souffrent du même désavantage en plus de nécessiter une sonde RMN spécialement construite. Dans les systèmes décrits, le volume de solution nutritive est très limité. Par conséquent, la durée des expériences est limitée par l'accumulation de déchets métaboliques et la diminution de la concentration en substrats. Pour ces raisons, les nouvelles orientations adoptées par les spectroscopistes biochimistes ont porté sur le développement de systèmes où les cellules emprisonnées dans le tube RMN, sont perfusées avec un volume adéquat (30 à 100 ml) de milieu nutritif préoxygéné.

Le principal problème relié à la perfusion est de confiner des cellules dans un volume restreint. A cause de leur taille, leur densité et leur fragilité, les microorganismes tendent à bloquer la plupart des filtres. Plusieurs techniques d'immobilisation présentées dans la littérature, peuvent solutionner ce problème (Mattiasson, 1983). Elles incluent: 1° le couplage covalent avec un support; 2° l'adsorption sur un support; 3° l'immobilisation sur un support d'affinité; 4° l'emprisonnement dans la matrice tridimensionnelle d'un polymère; 5° le confinement dans une émulsion liquide-liquide; 6° la capture des cellules entre les parois d'une membrane semi-perméable. Plusieurs de ces techniques peuvent modifier les propriétés des cellules. Certaines ne permettent cependant pas d'obtenir la densité cellulaire requise pour les expériences de RMN. Les

principales techniques rencontrées dans la littérature pour les études RMN sont l'emprisonnement des cellules dans une matrice de polymère et l'utilisation de membranes semi-perméables. Les supports solides utilisés dans les techniques de fixation des cellules diminuent proportionnellement la sensibilité du système par l'importance de la place qu'ils occupent. De plus, les cellules peuvent se détacher du support lors de la perfusion.

Les capillaires artificiels ont été utilisés depuis 1972 pour la culture des cellules (Knazek *et al.*, 1972). Les capillaires sont en général de faible diamètre (200 à 500 μm) et comportent de multiples cavités dans leur paroi, où les cellules peuvent se loger et s'ancrer. Attachés en groupe, ils constituent le fac-similé d'un réseau sanguin où les cellules possédant des propriétés d'adhésion peuvent s'ancrer et croître en couches superposées autour des fibres, à une densité proche de celle des tissus. Les fibres possèdent des propriétés d'ultrafiltration qui permettent l'échange rapide des molécules de poids moléculaire inférieur à celui d'exclusion des fibres avec le milieu de perfusion. Cette caractéristique a engendré plusieurs applications dans la production de macromolécules. Ces substances excrétées par les cellules dans le milieu environnant se concentrent dans le faible volume interstitiel des fibres, ce qui simplifie énormément leur purification. Les fibres capillaires ont ainsi servi à la fabrication d'hormones, d'enzymes,

d'interférons, de virus et de plusieurs autres substances (Hopkinson, 1983). Elles ont aussi été utilisées comme oxygénateur et comme reins artificiels. Gonzalez-Mendez et al. (1982) ont eu l'idée de construire une sonde RMN afin d'observer le signal de ^{31}P de cellules développées à l'intérieur d'une unité à culture capillaire commerciale. Bien que les résultats obtenus ont été satisfaisants une telle approche possède plusieurs désavantages. Premièrement, l'utilisation d'une sonde spéciale limite le nombre d'utilisateurs. En second, les systèmes commerciaux de culture sont dispendieux et ne sont pas optimisés pour les études par RMN. Par conséquent, il serait probablement difficile d'utiliser un tel système pour l'observation de noyaux moins sensibles tels que le ^{13}C . En dernier, la croissance des cellules à l'intérieur de telles unités nécessite de 7 à 20 jours afin d'atteindre une densité optimale. Les expériences doivent donc être planifiées longtemps à l'avance. Lorsque l'unité atteint la confluence, des zones nécrotiques peuvent apparaître aux endroits les plus éloignés des fibres où les cellules sont pauvrement oxygénées et le milieu moins rapidement échangé.

Une approche intéressante a été utilisée par Karczmar et al. (1983) pour éviter plusieurs des problèmes précédents. Ils ont utilisé un groupe de fibres de dialyse collé à un tube de polyéthylène pour échanger le milieu de culture environnant l'organisme étudié. Dans ce système, les fibres occupent environ 1/6 du volume sensible du tube RMN. Elles ont un

poids moléculaire d'exclusion de 1000 daltons. Le système s'adapte sur un tube RMN standard et permet l'utilisation d'une sonde RMN commerciale. Les mesures effectuées sur ce système montrent que l'oxygène s'équilibre en quelques minutes avec le perfusé. Par contre, le glucose, le lactate et le pH nécessitent au delà de 60 minutes pour s'équilibrer, ce qui peut être très limitant.

Boulangier et al. (1985) se sont servis de fibres capillaires provenant de dialyseurs rénaux (utilisé pour les personnes ayant des problèmes rénaux) pour perfuser les cellules. Une sonde spéciale a dû être construite à cet effet. Contrairement au système de perfusion précédent, les cellules sont introduites à l'intérieur des fibres, ce qui assure un meilleur échange des substrats grâce au faible diamètre des fibres (environ 200 μm). Les études effectuées sur ce montage ont montré que le temps d'équilibre entre le perfusé et le volume interne des fibres est inférieur à 5 minutes pour des molécules de faibles poids moléculaire.

Foxall et Cohen (1983) ont préféré emprisonner les cellules dans une matrice d'agarose. Les filaments d'agarose de faible diamètre (0.5 mm) permettent une oxygénation adéquate des cellules et un échange rapide du milieu. La technique qui requiert de 1 à 3 ml de cellules, s'adapte à la plupart des organismes et permet d'utiliser les sondes RMN commerciales. Ce système de perfusion a été utilisé avec succès dans plusieurs expériences (Foxall et al., 1984; Knop

et al., 1985).

Une bonne revue littéraire et des considérations techniques pertinentes sur la conception de bioréacteurs utilisés en spectroscopie RMN ont été présentées par Gillies *et al.* (1986).

CHAPITRE 3

TECHNIQUES EXPERIMENTALES GENERALES

3.1 Culture des cellules

Les cultures d'*Acanthamoeba castellanii* souche Neff ont été obtenues du laboratoire du Dr. J. E. Thompson, Université de Waterloo, en 1978. Les cellules sont cultivées en milieu non défini OGM (Optimal growth medium) selon la procédure décrite par Thompson (1977). Sa composition exacte est décrite au Tableau 3.1. L'extrait de levure et la protéose peptone proviennent de Difco (Difco Laboratory, Détroit, Michigan, USA). Le milieu est préparé, et stérilisé directement dans les flacons de culture par autoclavage. Une solution de glucose (18 g/100 ml) est aussi préparée, divisée par portion de 10 ml et stérilisée. Ce substrat est ajouté au milieu de culture avant l'inoculation. La concentration utilisée, légèrement plus élevée que celle suggérée par Thompson (18 g vs 15 g), permet une meilleure croissance des cellules. Les flacons utilisés pour les cultures sont des erlenmeyers de 500 ml dont le fond a été modifié pour augmenter la surface d'aération. Le fond comporte trois lattes surélevées d'environ 1 cm, formant plus ou moins une étoile à trois pointes.

TABLEAU 3.1. Composition du milieu de culture OGM.

Produit	Concentration (mM)	Quantité (g/l)
Protéose peptone	-	7.5
Extrait de levure	-	7.5
KH ₂ PO ₄	2.0	0.272
MgSO ₄ • 7 H ₂ O	1.0	0.246
CaCl ₂ • 2 H ₂ O	0.05	0.008
FeCl ₃ • 6 H ₂ O	0.10	0.027
Thiamine • HCl		0.001
Biotine		0.0002
Acide citrique • H ₂ O		0.020
Glucose	100	18

Le pH est ajusté à 7.0 avec du NaOH 1 M et le milieu est stérilisé par autoclavage. Le glucose est stérilisé séparément et ajouté avant l'inoculation.

Les cellules sont cultivées dans des incubateurs (New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, U.S.A.) à 30°C et maintenues sous agitation rotative à 100 rpm. Dans ces conditions, le temps de réplication est de 6 à 10 heures. Le transfert des cellules est effectué de façon hebdomadaire. Les nouvelles cultures sont inoculées avec de 100 à 500 µl de culture dont la densité cellulaire a atteint le plateau (8 à 12 × 10⁶ cellules/ml). Pour les expériences nécessitant

beaucoup de matériel, les cellules sont cultivées dans 600 ml de milieu OGM contenu dans des flacons de culture à bas profil de 2.5 litres (Canlab, modèle F4185, Missisauga, Canada).

3.2 Mesure de la densité cellulaire

La densité cellulaire des cultures est déterminée par comptage à l'aide d'un hémacytomètre (Bright-Line Hemacytometer, American Optical, Buffalo, U.S.A.) ou à l'aide d'un compteur de cellules automatique (Coulter Electronics Ltd., modèle ZM, Luton, Angleterre). Cet appareil fonctionne selon le principe suivant: les cultures cellulaires diluées à une densité appropriée sont aspirées par l'orifice de faible diamètre (100 μm) d'une sonde qui baigne dans la solution saline. Une électrode en contact avec la solution extérieure laisse passer un faible courant électrique jusqu'à l'électrode interne de la sonde. Le passage des cellules à travers l'orifice engendre une perturbation dans l'amplitude du courant proportionnelle à la taille des cellules.

Dans des récipients à comptage, 100 à 500 μl de cultures sont dilués dans 2 ml de formaldéhyde 2% et 16.0 ml de saline 4.0%. Les cellules sont comptées en utilisant les paramètres suivants: courant 120, amplification 1, atténuation 4 ou 8, limite de détection supérieure 99%, limite de détection inférieure 3%.

Une courbe de distribution de taille cellulaire peut être établie en variant les limites de détection supérieure et

inférieure par tranches de 5% et en diminuant le volume compté à 50 μ l. L'appareil peut être calibré pour déterminer la taille des cellules, à l'aide d'une suspension de billes de latex de taille connue.

3.3 Préservation des cellules

Les amibes sont très stables sous forme de kystes et peuvent être préservées plusieurs années dans des conditions anhydres et à basse température. La procédure utilisée pour la conservation des kystes est décrite par Seilhamer et Byers (1978).

Les kystes matures (âgés de 10 à 15 jours) sont collectés par centrifugation (International centrifuge, modèle V, rotor 250, Needham, U.S.A.) 3 min. à 800 g dans des tubes clos de 50 ml, sous conditions stériles. Le culot est remis en suspension dans un volume de solution saline (NaCl 5%) de deux à trois fois supérieur au volume initial. Un volume de suspension est déposé sur 5 fois son poids en gel de silice anhydre et stérile (séché 24 heures à 150°C et préalablement refroidi à -20°C) dans des tubes munis d'un bouchon hermétique. Le refroidissement du gel compense pour la réaction exothermique produite par l'absorption de l'eau sur la silice. Les tubes sont conservés à -30°C. Dans ces conditions, les kystes sont stables pour plusieurs années. L'inoculation de nouvelles cultures à partir des réserves congelées se fait simplement en saupoudrant le gel de silice

dans du milieu de culture frais. Les premières amibes émergent environ 24 heures après l'inoculation.

3.4 Enkystement

Les cellules ayant une bonne réponse à l'enkystment ont été sélectionnées par une série successive de cycles d'enkystement et de déenkystement. Périodiquement, de nouvelles cultures sont amorcées à partir de kystes pour assurer un bonne réponse à l'enkystement.

L'enkystement des cellules peut être induit chez *Acanthamoeba* par l'addition de 20 mM à 50 mM (concentration finale) de $MgSO_4$ à la culture de cellules en phase stationnaire (Chagla et Griffiths, 1974). Dans ces conditions, le taux d'enkystement est cependant aléatoire et semble être fonction de l'âge et de la densité de la culture cellulaire. Une approche plus élaborée permet d'obtenir un enkystement synchronisé et un rendement élevé. Elle consiste à transférer les cellules en phase de croissance dans du milieu nutritif appauvri pour une certaine période de temps avant d'initier l'enkystement. Le milieu utilisé (milieu OGM 1/2; Tableau 3.2) ne contient que la moitié de la concentration normale en protéose peptone et en extrait de levure. Aucun sucre n'est ajouté au milieu. La pression osmotique est maintenue semblable à celle du milieu de croissance par l'addition de NaCl. L'utilisation de tampon TES ou PIPES aide à maintenir le pH à 6.8. Lors de la synchronisation et de l'enkystement, la densité cellulaire

TABLEAU 3.2. Composition du milieu de culture OGM 1/2.

Produit	Concentration (mM)	Quantité (g/l)
Protéose peptone	-	3.755
Extrait de levure	-	3.75
KH ₂ PO ₄	2.0	0.272
MgSO ₄ • 7 H ₂ O	1.0	0.246
CaCl ₂ • 2 H ₂ O	0.05	0.008
FeCl ₃ • 6 H ₂ O	0.10	0.028
NaCl	30.0	1.75
Thiamine • HCl		0.001
Biotine		0.0002
Acide citrique • H ₂ O		0.020
PIPES	10.0	3.02

Le pH est ajusté à 6.8 avec du NaOH 1 M et le milieu est stérilisé à l'autoclave.

doit être inférieure à 8×10^6 cellules/ml. A des densités supérieures, la perte de cellules augmente rapidement. Après une période de 6 à 12 heures, l'enkystement est initié par l'addition de magnésium (MgSO₄, 25 mM finale) et de NaOH en concentration suffisante pour augmenter le pH à 7.2 - 7.5. Une approche alternative d'une efficacité comparable consiste à transférer des cellules dans un milieu inorganique (milieu

TABLEAU 3.3. Composition du milieu Na-PIPES.

Produit	Concentration (mM)	g/l
NaCl	100	5.84
PIPES	10	3.02
MgCl ₂ • 7 H ₂ O	5.0	1.23
CaCl ₂ • 2 H ₂ O	0.4	0.06

Le pH est ajusté à 6.8 avec du NaOH 1 M et le milieu est stérilisé à l'autoclave.

Na-PIPES ou Na-TES; Tableau 3.3) contenant 0.5% de diméthylsulfoxyde comme agent inducteur.

3.5 Effet des inducteurs et inhibiteurs de l'enkystement

L'effet de plusieurs composés sur l'enkystement a été étudié. La procédure expérimentale utilisée est la suivante. Les cellules provenant de cultures en début de phase stationnaire (âgées de 5 jours), sont collectées et transférées pour une période de 6 à 12 heures dans un volume égal de milieu OGM 1/2. Les cellules sont ensuite collectées, lavées et resuspendues dans le milieu d'enkystement étudié. La concentration cellulaire est ajustée à environ 6×10^6 cellules/ml. La culture est alors divisée en portions de 5 ml et placée dans des tubes de culture (15 mm × 150 mm) munis de bouchons d'aération métalliques. Dans ces expériences, trois

contrôles sont utilisés. Un tube ne contenant aucun agent sert à mesurer le taux d'enkystement spontané. Le second contient 25 mM de $MgSO_4$ et le troisième 5% de DMSO. Ces deux échantillons permettent de mesurer l'enkystement total potentiellement induit. Les autres tubes contiennent les composés à étudier. Chaque contrôle et chaque test est fait en duplicata. Les tubes sont maintenus dans un support ayant un angle d'inclinaison de 10° , dans un incubateur rotatif (100 rpm) à $30^\circ C$. L'effet des composés sur l'aspect cellulaire est vérifié à intervalles réguliers durant 72 heures. Sauf mention contraire, les résultats des expériences ont été vérifiés sur différentes cultures pour éviter tout artéfact.

3.6 Méthode d'extraction à l'éthanol

Cette technique d'extraction est principalement utilisée lors de l'analyse des acides aminés et des sucres intracellulaires par CLHP.

Un volume de 20 ml de culture de densité cellulaire de 5 à 12×10^6 cellules/ml est refroidi dans un bain de glace et centrifugé dans des tubes de 12.5 mm \times 10 cm, à 1000 g, pendant 3 minutes (Damon/IEC Division, Refrigerated Centrifuge, rotor modèle 215, Needham Heights, U.S.A.). Après élimination du surnageant, les cellules sont lavées dans environ 10 ml de saline 0.4% froide, et recentrifugées. Le surnageant est éliminé. Un volume de 4 ml d'éthanol 70% (EtOH) est ajouté aux cellules dans un bain de glace. Le tube

est alors rapidement mélangé à l'aide d'un agitateur mécanique. Le tube est conservé à 4°C pour une période de 24 heures ou plus afin de permettre l'extraction complète des constituants. Le volume total contenu dans le tube est déterminé afin de calculer le volume cellulaire. L'échantillon est ensuite centrifugé à 1500 g pendant 5 minutes. Le surnageant est prélevé et utilisé pour l'analyse des sucres et des acides aminés. Le culot est conservé pour la détermination du glycogène et de la cellulose.

3.7 Microextraction à l'acide perchlorique

Cette technique d'extraction est utilisée pour l'analyse des nucléosides et nucléotides intracellulaires par CLHP.

Un volume de 20 ml de culture contenant de 5 à 12×10^6 cellules/ml est refroidi dans un bain de glace. Les cellules sont collectées par centrifugation à 1000 g, 3 minutes (Damon/IEC Division, Refrigerated centrifuge) dans deux tubes de 12.5 mm x 10 cm. Après élimination du surnageant, les cellules sont resuspendues dans environ 10 ml de solution saline 0.4% froide et recentrifugées dans un tube contenant environ 50 mg de gel de silice 100 - 200 mesh. Le gel facilite la rupture des cellules par sonification. Au culot cellulaire, 50 µl d'une solution d'EDTA 10 mM sont ajoutés pour déstabiliser les membranes cellulaires par chélation du magnésium et du calcium associés à celles-ci. Après une agitation de quelques secondes, 700 µl d'acide perchlorique 8% froid est ajouté et les cellules sont sonifiées (puissance en

position 5.5) à l'aide d'une microsonde pendant 3 minutes, à un temps de cycle de 40% (Cell Disruptor, modèle 350, Danbury, U.S.A.). Rapidement, l'homogénat est transféré dans un tube Eppendorf de 1.5 ml et centrifugé pendant 2 minutes (centrifuge Eppendorf modèle 5414, Brinkman Instruments Co., Westbury, U.S.A.). Le surnageant est ajouté à 200 μ l de K_3PO_4 1.0 M et 100 μ l de KOH 2.0 M, dans une éprouvette (13 mm \times 10 cm) préalablement refroidie. Le mélange neutralisé possède un pH approximatif de 6.0. Le mélange est filtré avant analyse (Millex-GV₁₃, Millipore Products Division, Bedford, U.S.A.).

3.8 Détermination des protéines par la méthode de Lowry

L'analyse des protéines est effectuée selon la technique classique de Lowry *et al.* (1951). Cette technique permet le dosage de quantités aussi faibles que 0.2 μ g de protéine. La méthode de Lowry est une combinaison du test de Biuret et de Folin. Le test de Biuret se fait par la mesure de la densité optique d'un complexe coloré obtenu par la réaction entre l'ion cuivrique et un polypeptide comprenant au moins quatre liaisons peptidiques. Le test de Folin est basé sur la réduction de l'acide phosphomolybdique-phosphotungstique par les acides aminés aromatiques.

Deux solutions de réserve fraîchement préparées, sont nécessaires. La solution A contient 2 g de NaOH, 10 g de Na_2CO_3 , 0.1g de Na-K tartrate dans 500 ml d'eau. La solution B contient 0.5 g de $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ par 100 ml d'eau. La

solution réactive est préparée en mélangeant 10 ml de solution A avec 0.2 ml de solution B avant utilisation. Le réactif de Folin-Ciocalteu 2 N (Fisher Sci., Fairlawn, U.S.A.) est dilué de moitié avec de l'eau pour le test. Les échantillons à doser sont dilués de façon à obtenir idéalement une concentration en protéine située entre 2 et 8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. En parallèle, des solutions d'albumine de sérum bovin (Sigma Chemical Co., St-Louis, U.S.A.) contenant de 1 à 10 μg de protéines par μl sont préparées pour la courbe d'étalonnage. Le dosage s'effectue en mélangeant 75 μl d'échantillon et 750 μl de réactif. Après 20 minutes à température de la pièce, 75 μl de réactif Folin-Ciocalteu dilué sont ajoutés. Après 20 minutes à température de la pièce, la lecture est effectuée à 750 nm (Spectrophotomètre Bausch & Lomb, Rochester, U.S.A.).

3.9 Dosage du glucose et du maltose dans le milieu de culture.

La détermination des sucres réducteurs est effectuée selon la méthode de Somogyi-Nelson (Hatanaka et Kobara, 1980). Le test consiste à oxyder le sucre avec du Cu^{2+} , et à mesurer le cuivre métallique formé à l'aide de l'acide phosphomolybdique-phosphotungstique.

Le dosage du glucose et maltose se fait selon le même protocole expérimental, mais la courbe d'étalonnage doit être établie avec le sucre d'intérêt. Deux solutions de base sont fraîchement préparées. La solution A contient 25 g de Na_2CO_3 , 25 g de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ tartrate, 20 g de NaHCO_3 , et 200 g de Na_2SO_4

dissouts dans 1 litre d'eau et est conservée à la température de la pièce. La solution B contient 15% de CuSO_4 et 1 à 2 gouttes d' H_2SO_4 concentré dans 100 ml d'eau. La solution de travail est préparée en mélangeant 25 ml de solution A avec 1 ml de solution B.

Une solution concentrée contenant 2.0% de glucose dans du milieu de culture OGM est utilisée pour établir une courbe d'étalonnage (de 0 à 2.0% par saut de 0.25%). Pour le dosage, les échantillons et les solutions étalons sont dilués en mélangeant 50 μl à 10 ml d'eau. Le dosage s'effectue de la façon suivante. Un volume de 40 μl d'échantillon dilué est mélangé à 500 μl d'eau et 1.0 ml de solution de travail. Le tout est chauffé 20 minutes dans un bain d'eau bouillante. Après refroidissement, 1.0 ml d'eau et 1.0 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (2.0 N) sont ajoutés. La lecture s'effectue à 660 nm.

3.10 Analyse du glycogène et de la cellulose cellulaire

3.10.1 Purification du glycogène et de la cellulose

La procédure utilisée pour la purification du glycogène et de la cellulose a été élaborée à partir des articles de Weisman *et al.* (1970), de Rosness et Wright (1974) et de Seifter *et al.* (1950). Toutes les étapes de centrifugation utilisées dans cette procédure sont effectuées à 1500 *g* pendant 5 minutes, et 0°C (Refrigerated centrifuge, Damon/IEC Division).

Après l'extraction des cellules à l'éthanol 70% (section 3.6), le culot cellulaire (30 - 60 mg) est séché sous vide. Le culot est digéré 30 minutes à 95°C avec 0.5 ml d'une solution de KOH 30%. La paroi kystique est insoluble dans ces conditions. Après centrifugation, 400 µl du surnageant sont collectés pour la détermination du glycogène. Le culot contenant la cellulose est lavé deux fois avec 1 ml d'eau et resuspendu dans un volume de 4.0 ml d'eau. Un aliquot de cette suspension sera utilisé dans le test d'anthrone pour la détermination de la cellulose.

L'ajout de 1 ml d'EtOH 95% au surnageant précipite le glycogène. Il est ensuite récolté par centrifugation, lavé une fois avec 1 ml d'EtOH 95% et dissout dans 4.0 ml d'eau. La solution est mélangée et recentrifugée. Le surnageant contenant le glycogène dissout est utilisé pour le test d'anthrone.

3.10.2 Test d'anthrone

La procédure utilisée pour le test d'anthrone provient de Sheilds et Burnett (1960). Le réactif d'anthrone est préparé 3 à 4 heures avant l'analyse en dissolvant 200 mg d'anthrone dans 100 ml d'acide sulfurique concentré (qualité réactif). Les solutions et les échantillons sont préalablement refroidis dans un bain de glace. L'analyse de la cellulose est effectuée en mélangeant 50 µl de suspension avec 450 µl d'eau et 1.0 ml de réactif. Pour le glycogène, 20 µl d'extrait sont

mélangés à 480 μ l d'eau et 1.0 ml de réactif. Une courbe d'étalonnage est établie en parallèle avec une solution de glucose (10 mg/100 ml). Pour la courbe d'étalonnage, de 0 à 500 μ l de solution concentrée sont mélangés avec une quantité complémentaire d'eau et 1.0 ml de réactif. Le développement de la couleur s'avère optimal après 10 minutes à 95°C. La réaction est arrêtée en transférant les tubes dans un bain de glace. La lecture est effectuée à 620 nm. Les concentrations en glycogène et en cellulose sont calculées en équivalents de glucose par comparaison de l'absorbance avec la courbe d'étalonnage. Les résultats sont rapportés en μ g de glucose équivalent/ 10^6 cellules.

3.11 Purification des constituants pour la spectroscopie RMN

3.11.1 Extraction à l'acide perchlorique.

Les extraits à l'acide perchlorique sont utilisés pour la spectroscopie RMN des nucléotides (ATP, ADP, ...) et des composés phosphorylés, peu solubles dans les extraits à l'éthanol. Les sucres et les acides aminés peuvent aussi être visualisés en RMN de ^{13}C dans ce type d'extrait.

De 50 à 100 ml de culture sont versés dans des tubes à centrifugation de 50 ml. Les tubes sont refroidis quelques minutes dans un bain de glace et les cellules sont collectées par centrifugation. Après élimination du surnageant, les cellules sont lavées dans un volume équivalent de saline 0.4%.

Dans un bain de glace, le culot est resuspendu (1 ml/g de culot) dans une solution d'EDTA de sodium (10 mM). Un volume équivalent d'acide perchlorique 16% froid est ajouté. La suspension est sonifiée en présence de silice pendant 3 minutes (section 3.6). L'homogénat est ensuite centrifugé 3 minutes à 15,000 rpm dans une centrifugeuse réfrigérée (4°C), munie d'un rotor SS-34 (Ivan Sorvall Inc., Newtown, U.S.A.). Le surnageant est collecté et neutralisé avec une solution concentrée de KOH.

3.11.2 Extraction à l'éthanol

L'EtOH 70% permet une extraction plus sélective des composés. Beaucoup de composés très polaires (tels que les composés phosphorylés) ou de poids moléculaire élevé (protéines, polysaccharides, matériel génétique...) restent insolubles lors de l'extraction.

Les cellules sont collectées selon la méthode décrite à la section précédente. Le culot est extrait à 4°C avec un volume 5 fois supérieur en EtOH 70% pendant 24 heures à 4°C. L'échantillon est centrifugé (5 minutes, 1500 g), le surnageant est prélevé et le culot conservé au besoin pour l'extraction du glycogène. Le surnageant est évaporé à sec et conservé jusqu'à l'utilisation.

3.11.3 Purification du tréhalose

Le tréhalose est le seul sucre présent dans les kystes matures. La présence d'autres sucres tel que le maltose peut

cependant être observée dans les 48 heures suivant le début de l'enkystement. Le tréhalose isolé par l'extraction à l'EtOH 70%, peut être purifié par CLHP sur une colonne pour l'analyse des sucres, (Carbohydrate Analysis Column, 3.9 × 30 cm; Waters Scientific, Missisauga, Canada) en utilisant un mélange acétonitrile-eau dans des proportions de 85:15, à un débit de 2 ml par minute. L'échantillon est injecté en solution dans le solvant d'élution. La détection des composés se fait à l'aide d'un réfractomètre ou par U.V. à 190 nm. Les temps de rétention sont: glucose 8.8 min.; maltose 19.2 min.; tréhalose 24.0 min.

3.11.4 Purification et dégradation du glycogène

Le culot résiduel obtenu après extraction à l'EtOH 70% est mis en suspension dans un excédent d'eau et lyophilisé pour éliminer l'EtOH. A la poudre, nous ajoutons un volume d'une solution de KOH 30%, correspondant à 2.5 fois le poids frais (en gramme) du culot. La digestion du culot se fait à 95°C pendant 30 minutes. La solution refroidie, 2 portions d'EtOH 95% y sont ajoutées. Le glycogène précipité est collecté par centrifugation et lavé une fois avec 2 portions d'EtOH 95% (voir section 3.10.1). Le glycogène est dissout dans environ 1.8 ml d'eau et les particules non solubles sont éliminées par centrifugation.

L'hydrolyse du glycogène se fait par réaction enzymatique. Le glycogène est incubé en présence de 50 unités

d' α -amylglucosidase (de *Aspergillus niger*, Sigma Chemical Co., St-Louis, U.S.A.) à 50°C pendant 2 heures. Le spectre RMN du glucose résultant est obtenu après addition de 200 μ l de D₂O.

3.12 Méthylation du tréhalose pour l'analyse en GPC-SM

La méthylation des sucres se fait par réaction de l'iodure de méthyle avec le sucre dans des conditions de substitution nucléophile de type S_N2. La réaction est effectuée dans du DMSO anhydre en présence d'hydrure de sodium.

Le DMSO est chauffé à environ 100°C pendant plusieurs heures en présence d'hydrure de calcium puis distillé sous vide. Le DMSO est collecté et entreposé sous une atmosphère d'argon, sur du tamis moléculaire 4 Å fraîchement activé dans une bouteille scellée à l'aide d'un septum. Le solvant n'est pas utilisé avant une période de 24 heures. Les manipulations se font sous atmosphère inerte et dans des conditions anhydres.

Environ 2 g d'hydrure de sodium sont lavés avec de l'hexane et sont transférés dans une bouteille munie d'un septum. Le NaH est séché sous un jet d'argon et 20 ml de DMSO anhydre sont lentement ajoutés. Une seringue contenant du chlorure de calcium anhydre est utilisée pour l'échappement de l'argon et de l'hydrogène formé, tout en protégeant le réactif contre l'humidité de l'air. La réaction est poursuivie

pendant environ 2 heures à 60°C. Le réactif est alors prêt à être utilisé.

De 1 à 3 mg d'échantillon sont déposés dans des bouteilles de 2 drams et séchés pendant une nuit dans un dessiccateur en présence de pentoxyde de phosphore (P_2O_5). Les bouteilles sont munies d'un septum, d'un barreau magnétique, et d'une seringue remplie de $CaCl_2$ pour l'échappement des gaz. A l'aide d'une seringue, 1 ml de DMSO est ajouté pour dissoudre l'échantillon. Un ml de réactif est ensuite ajouté. Après 2 heures de réaction, 1 ml de CH_3I fraîchement distillé est ajouté lentement. La réaction est poursuivie pendant 3 heures. La réaction est arrêtée par l'addition lente de 2 ml d' H_2O . Les sucres perméthylés sont extraits avec 2 ml de CH_2Cl_2 . La phase organique est lavée avec 2 ml d'eau et séchée sur $MgSO_4$ anhydre. Les échantillons sont analysés par GPC-SM (chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse) pour identification et la mesure de l'abondance isotopique.

3.13 Dosage enzymatique et production du lactate et de l'éthanol

3.13.1 Préparation du cytosol

Les cellules provenant de 50 à 200 ml de culture (densité cellulaire de 5 à 12×10^6 cellules/ml) sont comptées, collectées par centrifugation et lavées dans de la saline froide 0.4% tel que décrit précédemment. Le culot peut être

congelé rapidement et entreposé à -30°C jusqu'à utilisation.

Les cellules sont suspendues dans un volume égal de tampon phosphate (phosphate de potassium 20 mM, pH 7.0) et lysées par sonification (5 minutes). L'homogénat est transféré dans des tubes à centrifugation de 15 ml et centrifugé à 5000 rpm 15 min (Centrifugeuse Sorvall, rotor SS-34). Le surnageant est prélevé et recentrifugé 45 min à 16,000 rpm. Le cytosol (surnageant) est conservé congelé à -30°C jusqu'à utilisation.

3.13.2 Dosage enzymatique de l'alcool déshydrogénase

Dans une cuvette de spectrophotomètre de 1 ml, on mélange 575 μl de tampon Tris 250 mM, pH 9.0, 300 μl d'une solution 100 mM de semicarbazide (un agent qui capte l'acétaldéhyde formé) et 50 μl de NAD^+ (13.7 mg/ml). Dans une première expérience, 25 μl de cytosol sont ajoutés et l'absorbance (340 nm) est enregistrée pendant 2 minutes pour mesurer la stabilité de la ligne de base. Ensuite, 50 μl d'éthanol sont ajoutés. L'absorbance est enregistrée en fonction du temps.

Dans une seconde expérience, l'éthanol est ajouté en premier pour déterminer la stabilité de la ligne de base et le cytosol est ensuite additionné.

Les expériences sont effectuées en duplicata. Au besoin, le cytosol est dilué d'un facteur connu afin d'obtenir des cinétiques enzymatiques initiales linéaires pour les premières minutes d'enregistrement.

Les calculs sont effectués sachant que la concentration équivalente d'alcool transformé est égale à :

$$C = \Delta A * 0.161 \text{ mM}$$

où ΔA est la pente initiale de l'absorbance (en unité min^{-1}) mesurée dans la zone linéaire de la cinétique. L'activité enzymatique du cytosol est exprimée en nmole de substrat transformé min^{-1} , mg de protéine $^{-1}$.

3.13.3 Dosage du lactate déshydrogénase

Dans une cuvette de spectrophotomètre de 1 ml, 825 μl de tampon Tris (pH 9.0) sont mélangés avec 50 μl de NAD^+ (13.7 mg/ml). Le test et les calculs sont effectués de la même façon que pour l'alcool déshydrogénase. L'éthanol est remplacé par une solution de lactate 1 M.

3.13.4 Dosage du malate déshydrogénase

L'activité de cette enzyme est utilisée comme contrôle afin de vérifier l'état de conservation du cytosol. L'activité enzymatique du malate déshydrogénase est déterminée de la même façon que celle du lactate déshydrogénase, en substituant la solution de lactate par une solution de malate 1 M.

3.13.5 Dosage enzymatique de l'acide lactique

Trente ml de tampon Tris 100 mM (pH 9.0) sont mélangés avec 25 mg de NAD^+ . A 15 ml du mélange est ajouté 300 μl de lactate déshydrogénase (1.0 unité/ μl de solution). Une courbe

d'étalonnage est établie à l'aide d'une solution d'acide lactique (0.4 mg/ml). Le dosage s'effectue en incubant 100 µl d'échantillon et 900 µl de solution de travail. Les tubes sont incubés pendant une heure à 37°C. L'absorbance est mesurée contre un tube témoin à 340 nm.

3.13.6 Détermination de l'éthanol par chromatographie gazeuse

L'éthanol produit par *Acanthamoeba castellanii* dans le milieu d'incubation est déterminé par chromatographie gazeuse. Les échantillons sont préparés en mélangeant 100 µl de milieu à 20 µl d'une solution d'isopropanol 0.4%. L'analyse est effectuée sur une colonne Carbowax 20M (10 m × 53 mm) en mode isothermique à 60°C.

CHAPITRE 4

TECHNIQUES D'ANALYSE DE CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE

4.1 Introduction

La chromatographie liquide a su imposer sa marque comme outil d'analyse grâce à la sensibilité élevée des nouveaux détecteurs, ainsi que la résolution accrue et la grande diversité des colonnes disponibles. Contrairement à plusieurs autres méthodes, les techniques chromatographiques permettent l'analyse simultanée de toute une classe de composés, par exemple les acides gras, les hydrates de carbone, les acides aminés et les nucléosides et nucléotides. Cette spécificité débute dans la préparation de l'échantillon. Un choix judicieux du type d'extraction à effectuer, parfois accompagné de quelques étapes complémentaires de purification, permet d'éliminer la plupart des sources d'interférence. La dérivation des composés est souvent nécessaire pour les analyses par chromatographie en phase gazeuse (CPG), pour augmenter la volatilité des échantillons. Cette approche est aussi utilisée en chromatographie liquide (CL), mais pour des raisons différentes. La dérivation permet de modifier la polarité et le degré de rétention d'un composé. Elle trouve cependant plus d'intérêt dans l'introduction d'un chromophore

sur les composés à analyser, facilitant ainsi leur détection à l'aide d'un spectrophotomètre d'absorption (ultraviolet-visible) ou d'émission (fluorescence). Elle permet du même coup une observation plus sélective des substances à analyser car seulement celles ayant un type de groupement fonctionnel particulier pourront réagir. Comme toutes les substances posséderont après réaction le même chromophore, leurs spectres ultraviolets seront tous similaires en autant que l'absorptivité des composés d'intérêt soit initialement négligeable par rapport à celui du marqueur. La mesure du rapport de deux longueurs d'onde sélectionnées pourra servir à confirmer l'identité et la pureté des pics observés.

Le choix de la technique de chromatographie et de la colonne complète la méthode d'analyse. Connaissant au départ les propriétés physiques du composé à analyser, certaines règles générales peuvent être appliquées afin de faciliter le choix du type de chromatographie à utiliser (Tableau 4.1). La chromatographie à basse ou haute pression sur gel de silice ou d'alumine est sans aucun doute le type de séparation le plus employé pour la purification sur une échelle semi-préparative ou préparative des composés en chimie organique. Le coût raisonnable des gels et leur efficacité ont fait de cette technique une méthode de purification de choix. La chromatographie liquide à haute performance (CLHP) se retrouve en tête de liste en terme de popularité dans l'analyse des composés biologiques. Les nouvelles particules de 3 et 5 μm de diamètre possèdent une résolution surprenante en

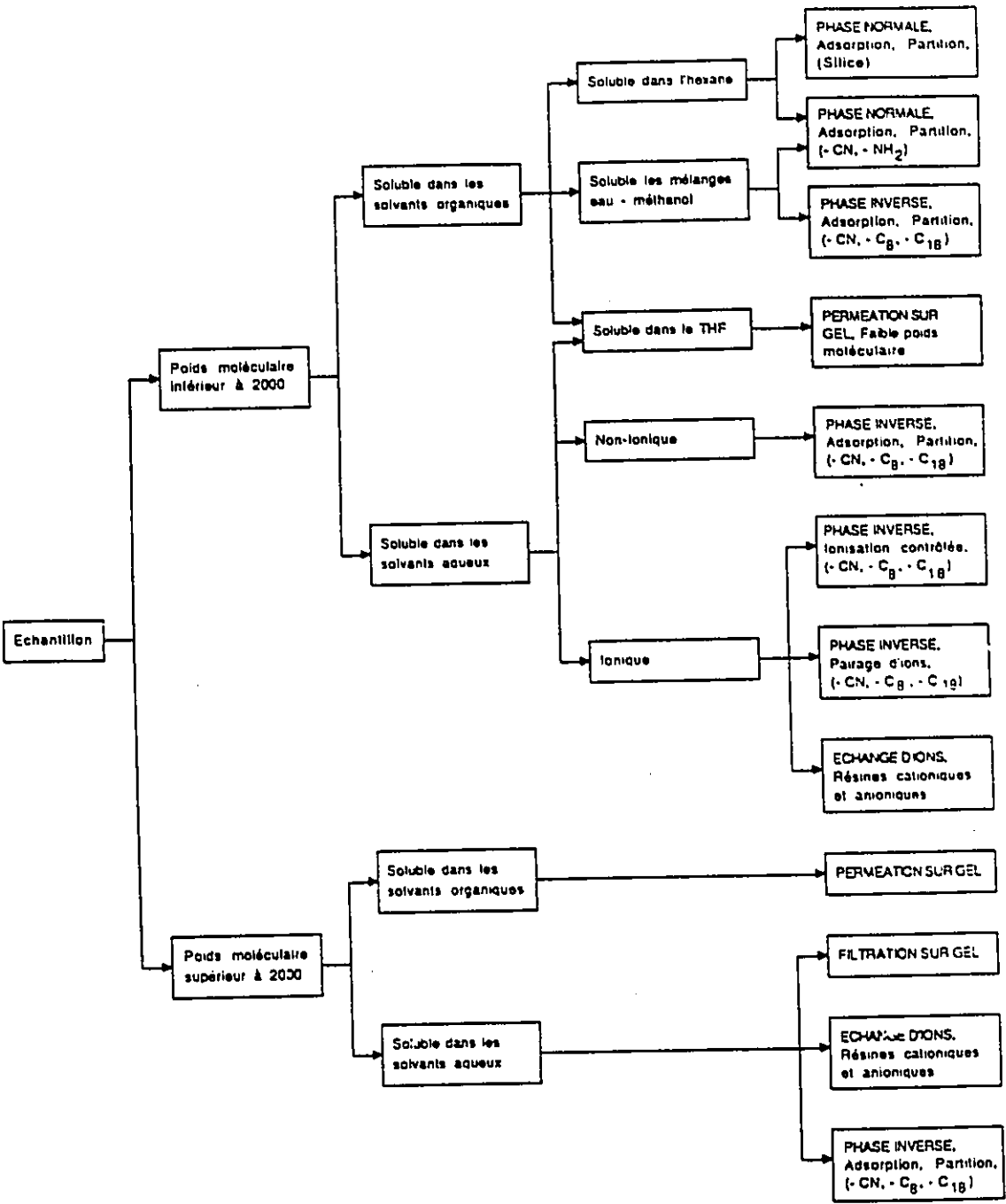


TABLEAU 4.1. Organigramme de sélection d'une technique de chromatographie liquide à haute performance.

comparaison avec les supports traditionnels de 10 μm et plus. Les supports sont disponibles avec une vaste gamme de groupements (-C18, -C8, -CN, -phenyl, -NH₂, etc...). Ils permettent la séparation de petites et de grosses molécules (ex.: protéines), de molécules neutres (adsorption, partition) ou chargées (ionisation contrôlée, pairage d'ions), soluble ou non dans les solvants aqueux (phase normale ou inversée). Les propriétés physiques des supports disponibles commercialement varient énormément. On retrouve une cinquantaine de supports de type -C18 sur le marché, chacun ayant ses caractéristiques propres en terme de charge organique (pourcentage de groupements greffés/gramme de silice), de tailles et de formes de particules (sphériques, irrégulières), de porosité, de diamètre des pores, et de degré de protection de groupements silanols libres (Hancock et Sparrow, 1984). Dans certaines applications, un support peut être substitué par un autre de caractéristiques plus ou moins semblables, en faisant un ajustement mineur de la composition de l'éluant. On ne peut cependant pas généraliser ce fait car le type d'interaction entre le support, le composé à analyser et l'éluant est souvent très complexe. D'ailleurs, certaines variations peuvent être observées d'une colonne à une autre provenant du même fabricant.

4.2 Chromatographe liquide à haute performance

L'appareil utilisé au début des travaux était un système de gradient binaire de Waters (Waters Chromatography Division,

Milford, U. S. A.) comprenant deux pompes M6000 reliées à un mélangeur et suivies d'un filtre hydraulique capacitif. Ce dernier module permet d'éliminer les soubresauts de pression et de débit engendrés par les doubles pistons à fonctionnement alternatif des pompes. L'injecteur était un U6K de Waters, équipé d'une boucle d'injection de 2 ml. Le détecteur était un modèle à longueur d'onde fixe fonctionnant avec une lampe au mercure (254 nm). Un réfractomètre était relié en série avec le détecteur UV. Un contrôleur semi-automatique de Waters permettait de générer des gradients binaires.

Le second appareil (Waters), était composé de deux pompes M510, chacune équipée d'une valve sélectrice à trois voies pour les solvants, et d'un filtre hydraulique capacitif. Les pompes sont reliées à deux mélangeurs de faible volume connectés en série, suivies par l'injecteur U6K. Le volume de la boucle d'injection utilisée est de 250 ou 500 μ l pour diminuer les temps de délai de génération du gradient à la colonne. Avec la boucle de 250 μ l, le délai est d'environ 600 μ l.

La détection des composés est effectuée avec un spectrophotomètre programmable UV-visible (190-600 nm), modèle M490 de Waters. Les résultats sont enregistrés sur le module d'intégration M730 et sur un enregistreur à deux canaux (Canlab, modèle 585, Mississauga, Canada). Le contrôleur (modèle M680) à mémoire statique a la capacité de générer des gradients ternaires et des gradients non-linéaires. Sauf

indication contraire, tous les gradients utilisés dans nos séparations sont linéaires.

Les composantes du système sont toutes reliées électroniquement. Ainsi, l'injection d'un échantillon initie automatiquement le gradient ainsi que l'enregistrement sur l'intégrateur. L'arrêt est programmé par le contrôleur.

4.3 Analyse des hydrates de carbone

4.3.1 Introduction

Lorsque les concentrations des hydrates de carbone sont suffisantes, leurs analyses se font le plus souvent par injection directe des produits en CLHP en utilisant un réfractomètre pour la détection. Dans le cas de concentrations plus faibles, la chromatographie en phase gazeuse (CPG) et la chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (CPG-SM) augmentent de façon appréciable les limites de détection des sucres prédérivés afin d'augmenter leur volatilité. L'analyse par CPG de disaccharides est cependant très difficile à effectuer, ceci à cause de leur rétention trop élevée. Nous avons mis au point une technique de CLHP très sensible permettant l'analyse du maltose et du tréhalose dans le but de suivre l'évolution des carbohydrates libres au cours de la croissance et des différents stages physiologiques d'*Acanthamoeba castellanii*. Les récents développements de la CLHP ont grandement amélioré les différentes techniques d'analyse des hydrates de carbone.

Trois principaux types de chromatographie sont habituellement utilisés :

- échange d'ions des hydrates de carbone complexés
- partition sur résines échangeuses d'ions
- partition sur phases chimiquement liées

Chacune des techniques possède certains avantages et inconvénients. L'analyse directe des sucres par CLHP présente l'avantage de minimiser les temps de préparation des échantillons. Les méthodes de détection applicables sont par contre limitées en sensibilité et coûteuses. Elles comprennent l'utilisation d'un réfractomètre, d'un détecteur ultraviolet fonctionnant à 195 nm ou d'un détecteur électrochimique. Le couplage CL-SM présente une sensibilité d'analyse élevée mais le prix d'un tel appareil restreint son accessibilité. Les techniques de post-dérivation avec des chromophores détectables par UV ou fluorescence sont peu employées dans ce type d'analyse. Cependant, les techniques de prédérivation des hydrates de carbone sont couramment appliquées, spécialement en chromatographie gazeuse. Cette approche s'est rapidement étendue à la CLHP à cause de ses avantages sur les limites de détection. Ainsi, deux approches sont généralement utilisées, la dérivaison du groupement carbonyle des sucres réducteurs et la dérivaison des groupements hydroxyles des sucres et polyols. Apenfels (1981) a utilisé le dansyl hydrazine comme réactif pour l'analyse des sucres réducteurs. La préparation des échantillons ne

nécessite que 15 minutes et l'analyse des hydrazones formées s'effectue sur une colonne de phase inversée de type -C18. La détection des échantillons se fait par fluorescence, avec une limite de détection de 10 pmole. La détection par absorption en ultraviolet (254 nm) peut aussi être utilisée mais avec une perte de sensibilité d'un facteur de 100.

Les techniques impliquant la dérivation des groupements hydroxyles permettent aussi bien l'analyse des sucres réducteurs et non-réducteurs. Les différents anomères des sucres sont souvent séparés. Comme certains sucres comportent souvent jusqu'à six anomères, l'analyse des chromatogrammes devient souvent complexe. Il est donc préférable de réduire les sucres avant leur dérivation. L'utilisation des techniques de prédérivation en CLHP a fait ses débuts dans le milieu des années 70 avec l'analyse de sucres et de polyols *O*-perbenzoylés (Lehrfeld, 1976). La formation de dérivés *O-p*-nitrobenzoylé par Nachtmann *et al.* (Natchmann *et al.*, 1976a et b; Natchmann 1976; Natchmann et Budna, 1977) permet de diminuer les limites de détection d'un facteur de 10 en déplaçant la longueur d'onde d'absorption maximum de 230 nm à 260 nm. Le gain en sensibilité est typiquement 10,000 fois supérieur à la détection par réfractomètre et de 10 à 100 fois supérieur à celui par CPG équipé d'un détecteur à ionisation à flamme. De plus, il a été démontré que le coefficient d'extinction molaire des dérivés est proportionnel à leur degré de substitution, indépendamment de leur structure ou de leur conformation (Natchmann, 1976). Chaque chromophore

augmente le coefficient d'extinction molaire d'environ 14,800 (Natchmann *et al.*, 1976a). La séparation des dérivés peut être effectuée en phase normale ou en phase inversée bien que le second type de chromatographie donne une meilleure séparation (Daniel *et al.*, 1981).

Dans nos travaux, nous nous sommes intéressés principalement à l'analyse du tréhalose, un disaccharide non réducteur. Pour ce faire, nous avons mis au point une technique d'analyse basée sur l'utilisation des dérivés *O-p*-nitrobenzoyle et la chromatographie en phase inversée.

4.3.2 Préparation des échantillons

Les cellules sont extraites à l'éthanol 70% selon les procédures décrites à la Section 3.6. Cent μ l d'extrait cellulaire sont ajoutés à 50 μ l de xylitol (0.5 mg/ml) dans des éprouvettes (12 \times 75 mm). Le xylitol est utilisé comme référence interne pour l'analyse. La réduction est amorcée par l'ajout de 500 μ l d'une solution aqueuse de NaBH_4 (10 mg/ml). L'acide borique formé au cours de la réaction se complexe facilement avec les alcools. Il doit donc être éliminé puisqu'il est susceptible d'interférer avec la réaction de nitro-benzoylation. Après 3 heures ou plus à la température de la pièce, la solution est neutralisée à l'aide de résine anionique (Rexyn 101, forme H^+ ; Fisher Scien. Co., Fair Lawn, N.J., U.S.A.). La présence de sucres aminés interdit l'emploi de résines anioniques. Les sucres aminés y

seraient adsorbés. Lorsque ceux-ci sont présents, les solutions sont acidifiées directement avec une solution d'HCl 1 N, une fois la réduction complétée. La formation abondante de NaCl ne semble pas interférer avec la dérivation. Les solutions sont transférées dans des fioles de 1 dram. L'eau est évaporée ou lyophilisée. L'acide borique est éliminé sous la forme de triméthylborate par coévaporation avec du méthanol (500 μ l) en présence d'une goutte d'HCl 1 N. L'opération est répétée 3 fois. Les échantillons sont ensuite séchés plusieurs heures, dans un dessiccateur sous vide en présence de P_2O_5 .

4.3.3 Dérivation à l'aide du chlorure de *p*-nitrobenzoyle

La procédure utilisée est la même pour les sucres réducteurs ou non réducteurs. Le *p*-NBCl est recristallisé dans l'éther de pétrole 60 - 100°C et conservé à l'abri de l'humidité. Environ 40 à 50 mg de *p*-NBCl est ajouté à chaque échantillon bien sec. Les fioles sont bouchées à l'aide de septums de silicone recouverts de Teflon (Pierce Chem. Co., Rockford, Il. U.S.A.). A l'aide d'un système d'aiguille, l'air est échangé pour de l'argon. Les échantillons sont refroidis dans un bain de glace et 500 μ l de pyridine anhydre (distillée et entreposée sur KOH en présence d'argon) sont ajoutés. Les échantillons sont sonifiés durant quelques minutes pour dissoudre le réactif. La réaction est complète après 1 heure à la température de la pièce ou 30 minutes à 37°C. Un volume de 10 μ l à 20 μ l d'eau est alors ajouté afin

de faire réagir le chlorure résiduel. Après 5 minutes, la pyridine est évaporée extensivement à l'aide du montage décrit à la Figure 4.1. La température du bain utilisé pour cette étape est maintenue à environ 50°C. Dans le cas d'analyse de sucres réducteurs labiles comme le fructose, la température ne doit pas dépasser 20 - 22°C tout au long de la réaction et de l'évaporation (Natchman et Budna, 1977). Les traces résiduelles de pyridine sont éliminées par coévaporation avec du toluène. La pyridine forme un azéotrope avec le toluène dans des proportions de 22:78 (CRC Handbook of Chemistry and Physics, 1976). Au besoin, les dérivés bien secs sont très stables et peuvent, sans danger, être entreposés plusieurs jours à la température de la pièce. Un ml de CHCl_3 est ajouté à chacun des échantillons qui, sont ensuite sonifiés jusqu'à dispersion du précipité. La majeure partie de l'acide *p*-nitrobenzoïque formé est insoluble. L'échantillon est alors déposé sur une colonne (pipette Pasteur) contenant environ 550 mg de gel de silice (Silica Gel 60, 70-230 mesh; Merck, Darmstadt, Allemagne) équilibrée avec du CHCl_3 . Les dérivés sont élués à l'aide de CHCl_3 . Des expériences effectuées sur une série de composés de référence ont montré qu'un volume de 5 ml permet d'éluier au-delà de 95% des dérivés. L'éluat est évaporé sous jet d'azote et conservé à la température de la pièce. Avant l'analyse, les échantillons sont dissouts dans 1 ml de CH_3CN et filtrés sur une membrane de 0.2 μm (Gelman LC 13 Acro filter). Un volume de solvant inférieur peut être utilisé pour les échantillons de plus faible concentration.

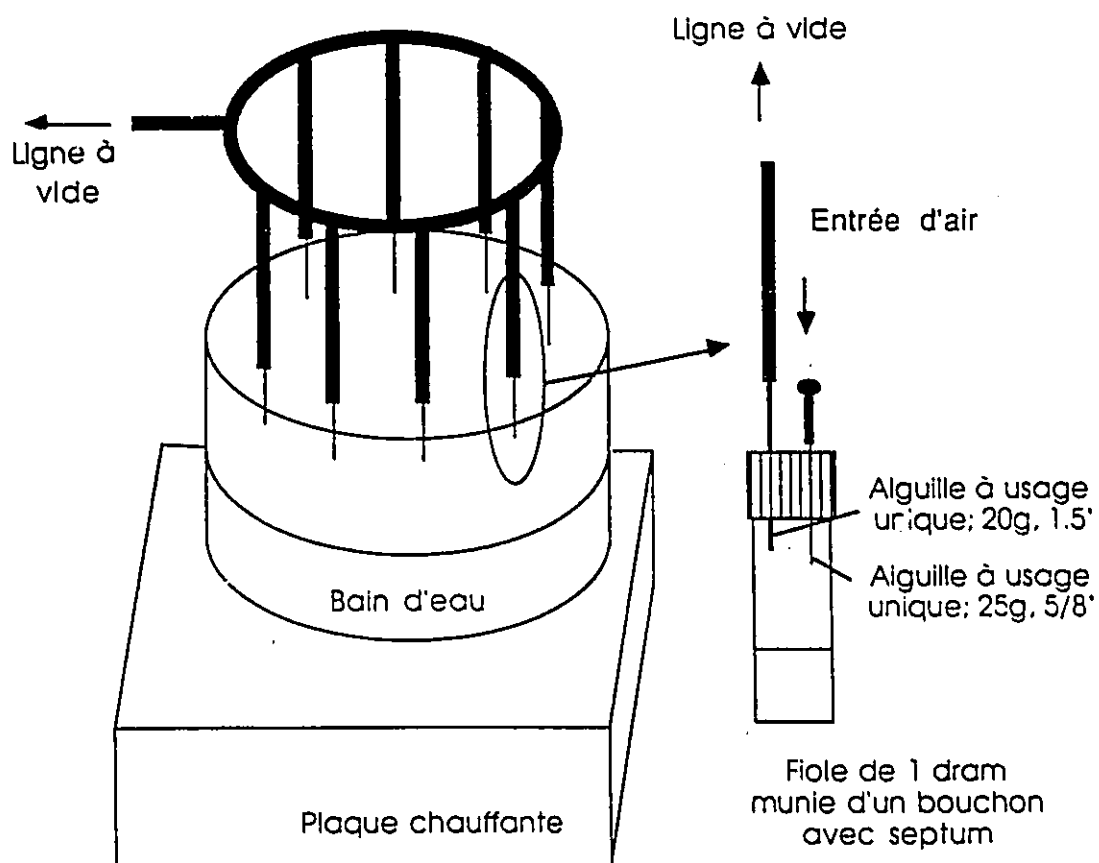


FIG. 4.1. Montage utilisé pour l'évaporation des solvants.

4.3.4 Stabilité des dérivés

Les dérivés sont très stables à l'état solide à la température de la pièce alors qu'il sont dégradés lentement dans le mélange acétonitrile-eau (70:30) utilisé pour la chromatographie. L'intensité des pics observés sur le chromatogramme décroît en fonction du temps en solution. Bien qu'aucune expérience concrète n'ait été menée à ce sujet, nous soupçonnons que ceci soit dû à la présence d'HCl libéré par l'hydrolyse de trace résiduelle de chlorure de *p*-nitrobenzoyle. Le HCl catalyse la conversion des esters en alcools. Dans l'acétonitrile pure, les composés ne montrent aucun signe de dégradation pour une période de 24 heures. L'injection des composés dissouts dans l'acétonitrile pure au lieu du solvant de départ n'affecte pas la séparation des composés.

4.3.5 Chromatographie

De façon générale, toutes les colonnes de type -C18 ou -C8 peuvent être utilisées pour ce type de séparation. Celle choisie pour la séparation des hydrates de carbone est une colonne à compression radiale Nova-Pak (10 cm L × 5 mm DI) de Waters. Son support de 4 μ m et le faible diamètre de la colonne assure la résolution et la sensibilité requises pour l'analyse. Une précolonne μ Bondapak Guard-Pak (Waters) prévient la contamination de la colonne par des composés irréversiblement adsorbés. Le programme utilisé pour la séparation est décrit dans le Tableau 4.2.

TABLEAU 4.2. Programme de CLHP utilisé pour la séparation des dérivés per-*p*-nitrobenzoyle d'hydrates de carbone.

Temps (min.)	Débit (ml/min.)	Solvant A (%)	Solvant B (%)	Commentaires
init	0.8	100	0	Injection et gradient
25.0	0.8	50	50	
26.0	1.2	0	100	Lavage de la colonne
30.0	1.2	0	100	
32.0	1.2	100	0	Rééquilibration avec le solvant initial
35.5	1.2	100	0	
36.0	0.8	100	0	Nouvelle injection

Solvant A: CH₃CN - H₂O (70:30)

Solvant B: CH₃CN

Le temps d'analyse est de 25 minutes et le temps de rééquilibration est de 11 minutes.

4.3.6 Séparation et temps de rétention

La Figure 4.2 montre un exemple de séparation d'une série de polyols. Les conditions utilisées (Section 4.3.5) sont optimisées pour permettre l'analyse dans un temps raisonnable, des monosaccharides réduits mais surtout, du maltose et du tréhalose provenant des extraits cellulaires d'*Acanthamoeba*. La présence de xylitol n'ayant jamais été observée dans les

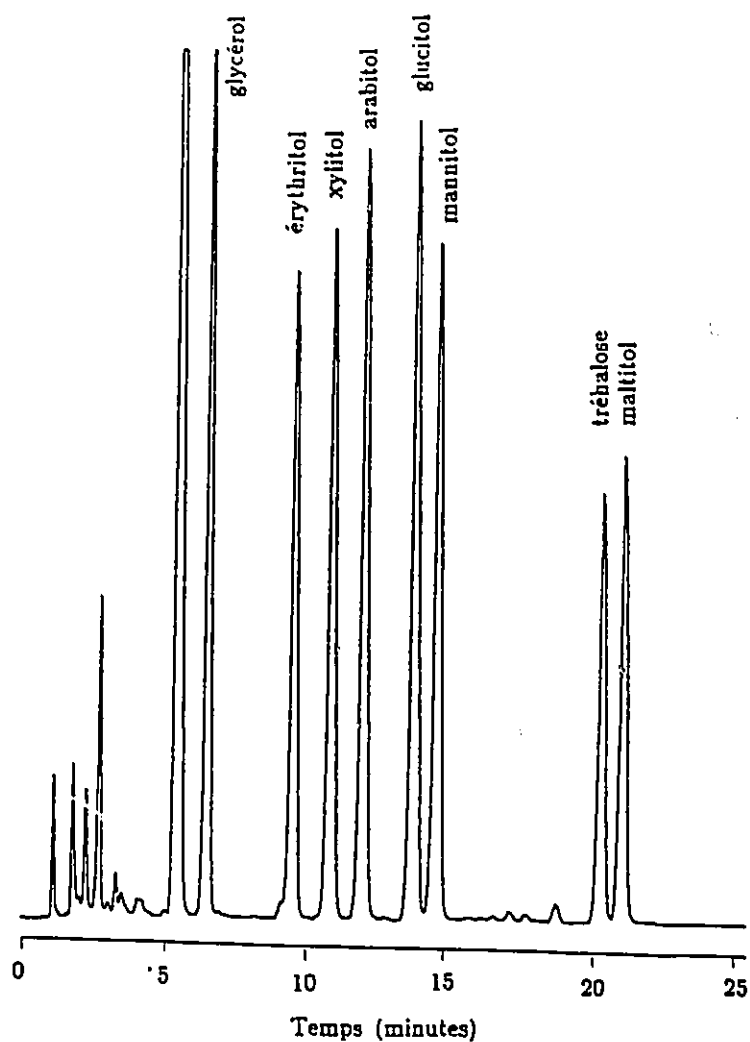


FIG. 4.2. Chromatogramme d'une série d'alditols de référence.

Les conditions de dérivation et de chromatographie sont décrites à la Section 4.3.5. La quantité injectée est équivalente à environ 750 pg de chaque sucre non-dérivé, soit de 2 à 8 picomoles selon le poids moléculaire du composé. L'absorbance du détecteur est de 0.250 UAPE.

extraits cellulaires chez l'organisme étudié, ce composé a été choisi comme référence interne pour la détermination quantitative des composés. Le Tableau 4.3 montre le temps de rétention des anomères d'une série d'hydrates de carbone dans leur forme réduite ou non. Parmi ceux-ci le mannitol, le maltose, le glucose et le tréhalose sont souvent présents dans les extraits cellulaires. Etant donné qu'un des quatre anomères du maltose interfère avec la quantification du tréhalose, il est donc nécessaire de réduire les échantillons pour simplifier leur analyse. Une meilleure séparation des sucres à 5 et 6 carbones pourrait aisément être obtenue en diminuant la pente du gradient aux dépens du temps de séparation.

4.3.7 Calcul des concentrations en hydrates de carbone

La quantité de chaque hydrate de carbone inconnu dans l'échantillon est calculée de la façon suivante:

$$fmol_{inc} = \frac{V_{ex}}{V_a} \times \frac{fmol_{xyl}}{V_c \cdot \rho_{cell}} \times \frac{A_{inc}}{A_{xyl}} \times \frac{nOH_{xyl}}{nOH_{inc}}$$

où:

$fmol_{inc}$ = fmole d'hydrate de carbone par cellule,

$fmol_{xyl}$ = fmole de xylitol ajouté ($\cong 8.2 \times 10^7$ fmole),

V_{ex} = volume total de l'extrait,

V_a = volume de l'échantillon analysé (100 - 200 μ l),

V_c = volume de milieu de culture collecté (20 ml),

ρ_{cell} = densité cellulaire exprimée en cellules/ml,

TABLEAU 4.3. Temps de rétention de divers hydrates de carbone.

Composé	Temps (min)	Composé	Temps (min)	Anomère (%)
glycérol	6.40			
thréitol	8.45			
érythritol	9.40			
xylitol	10.62			
arabitol	11.77	arabinose	7.80 8.07 8.70 9.07	5 46 43 6
ribitol	12.00			
dulcitol (galactitol)	13.75	galactose	12.17 12.75	55 45
mannitol	14.30	mannose	10.97 11.75	30 70
sorbitol (glucitol)	13.52	glucose	12.05	100
inositol	13.73			
rhamnitol	13.74	rhamnose (6-désoxy- mannose)	10.06 10.67	35 65
fucitol	13.82	fucose (6-désoxy- galactose)	9.33 10.22	64 36
glucosamine réduit	10.53	glucosamine	8.64	
galactosamine réduit	10.80	galactosamine	7.80	

TABLEAU 4.3. (suite).

Composé	Temps (min)	Composé	Temps (min)	Anomère (%)
		sucrose	20.35	100
lactitol	21.14	lactose	19.07	100
maltitol	20.75	maltose	17.35	29
			17.87	40
			20.12	13
			20.62	18
tréhalose	19.97			

A_{xyl} = aire du pic de xylitol obtenu par CLHP,

A_{inc} = aire du pic de l'inconnu obtenu par CLHP,

nOH_{xyl} = nombre de groupement hydroxyle du xylitol (5),

nOH_{inc} = nombre de groupement hydroxyle de l'inconnu.

La concentration molaire intracellulaire en hydrate de carbone peut être calculée en divisant la quantité molaire du sucre par le volume cellulaire.

4.4 Analyse des acides aminés physiologiques

4.4.1 Introduction

La chromatographie par échange d'ions est aujourd'hui un outil tout aussi important que lorsque Moore et Stein (1951) ont décrit le premier système d'analyse d'acides aminés automatisée au début des années 50. Bien que le principe de base ait relativement peu changé, des développements

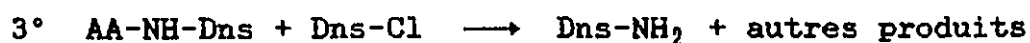
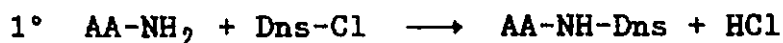
significatifs dans l'instrumentation et la méthodologie ont permis la mise au point d'une nouvelle génération d'analyseur automatisé d'acides aminés.

Par contraste avec les 18 acides aminés que l'on retrouve dans la plupart des hydrolysats de protéines, les fluides physiologiques peuvent contenir de 25 à 50 acides aminés et autres composés simultanément détectables. Les colonnes échangeuses d'ions, toujours plus performantes, permettent l'analyse de la plupart des acides aminés physiologiques dans un intervalle de 2 à 3 heures. Jusqu'à 5 tampons sont parfois utilisés pour former les gradients nécessaires à la séparation des composés. La détection se fait après une dérivation post-séparatoire avec de la ninhydrine. La majorité des complexes formés absorbent fortement à 570 nm. Seuls les acides iminés tels que la proline et l'hydroxyproline, de même que les acides aminés sulfhydryles, absorbent à une longueur d'onde différente, soit 440 nm. L'utilisation d'un détecteur UV à double canaux est donc nécessaire pour une quantification adéquate de tous les acides aminés. Lors de l'analyse d'échantillons de faible concentration, la détection par fluorescence après réaction post-colonne avec du *o*-phthalaldehyde permet la détection d'une cinquantaine de femtomoles de composé.

Malgré l'efficacité des systèmes automatisés d'analyse par échangeur d'ion, la recherche de techniques d'analyse plus rapides, moins dispendieuses et plus accessibles n'a pas

cessé d'évoluer. L'alternative la plus communément employée dans le cas des hydrolysats de protéines est l'utilisation de la chromatographie en phase inversée sur colonne octadécyl (-C18) des acides aminés pré-dérivés. Bien qu'aussi utilisée pour l'analyse des extraits physiologiques, la CLHP ne permet pas présentement une séparation totalement satisfaisante de tout les acides aminés. Pour les besoins de nos expériences nous avons donc décidé de s'attaquer à ce problème.

Le chlorure de dansyl (Dns-Cl: 1,1-N-diméthyl-5-chlorosulfonyl-aminonaphtalène) était un réactif couramment utilisé à cette fin dans les années 70. Ce réactif, qui a été précédemment utilisé en chromatographie sur couche mince, forme des composés facilement détectables par fluorescence. Plusieurs problèmes sont cependant associés avec l'utilisation d'un tel réactif. La réaction voulue est en compétition avec deux autres réactions:



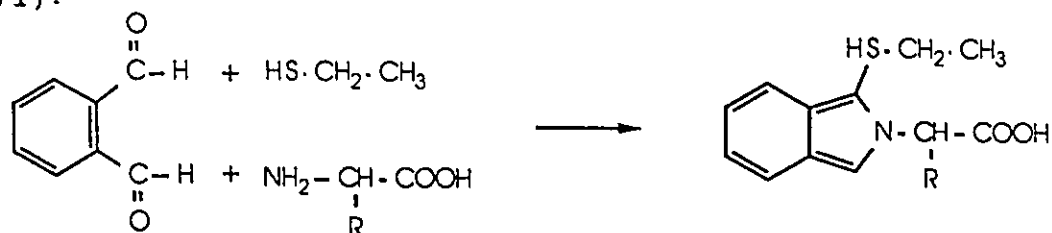
où Dns-OH est la forme acide sulfonique, et Dns-NH₂ est la forme amide. La réaction des acides aminés avec le réactif se fait en milieu basique. La réaction désirable s'accélère avec une élévation du pH du milieu réactionnel. Par contre, l'hydrolyse du réactif en Dns-OH est aussi plus rapide à un pH élevé. La conversion des acides aminés appropriés (ornithine,

lysine) en dérivé didansyl est aussi fonction du pH. Donc, les conditions de dérivation doivent être optimisées pour minimiser les réactions indésirables. Une séparation adéquate de la plupart des acides aminés d'hydrolysats de protéines peut être obtenue par CLHP. Cependant, des conditions de dérivation rigoureusement contrôlées sont nécessaires pour éviter la surproduction de Dns-OH et Dns-NH₂. Ces composés interfèrent avec l'analyse de certains acides aminés.

Le chlorure de dabsyl (4-N,N-diméthyle-4'-chlorosulfonyl-aminoazobenzène) est un substitut intéressant au Dns-Cl bien qu'il possède les mêmes problèmes associés à la dérivation. Les dérivés qu'il forme absorbent fortement dans la région du visible (420 nm), réduisant ainsi les sources d'interférence. Ses limites de détection, légèrement inférieures à celle du Dns-Cl, permettent la détection de quelques picomoles.

Une approche très populaire de nos jours est l'analyse des acides aminés sous la forme de dérivés *o*-phthalaldéhyde/mercaptoéthanol d'acides aminés. A cause de la forte fluorescence des dérivés, la limite de détection est inférieure à 50 fmoles (Tunell et Cooper, 1982). La détection des dérivés OPA et d'autres analogues peut aussi être effectuée avec un détecteur électrochimique, grâce à la présence d'un soufre dans les dérivés. La structure du composé formé par la réaction d'un acide aminé avec de l'OPA en présence de mercaptoéthanol a été déterminée par Roth

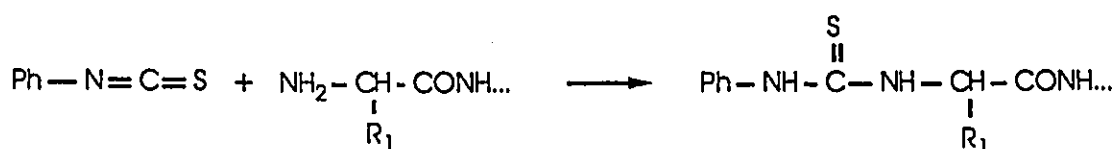
(1971):

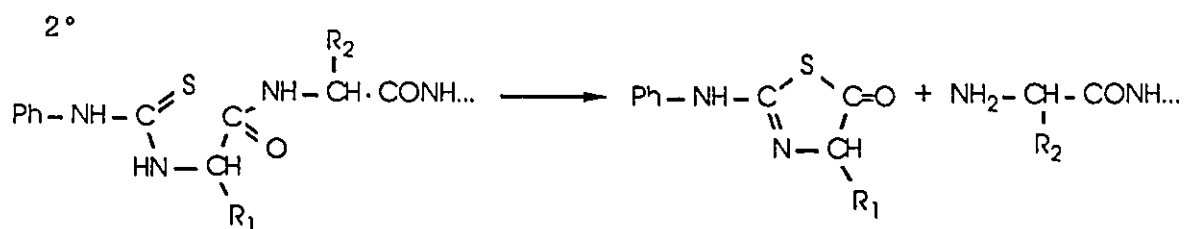


L'inconvénient majeur de ce type d'analyse est que le réactif ne réagit pas avec les amines secondaires. Donc la proline et l'hydroxyproline ne peuvent être analysées à l'aide de cette approche. Les dérivés étant instables, ils doivent être analysés dans les plus brefs délais en respectant un intervalle de temps constant, afin d'obtenir une quantification efficace. Idéalement, un système de dérivation pré-colonne automatisé devrait être utilisé pour ce type d'analyse.

Le phénylisothiocyanate (PITC) est utilisé depuis très longtemps pour l'analyse du résidu N-terminal des protéines, Ce processus connu sous le nom de dégradation d'Edman implique deux étapes: 1° le couplage du réactif sur l'amine terminale de la protéine (condition alcaline); 2° la cyclisation et le clivage du réactif et de l'acide aminé (condition acide). La séquence réactionnelle s'illustre comme suit:

1°





Cette opération peut être appliquée de façon successive à la même protéine et permet l'analyse séquentielle de sa composition en acides aminés à partir du groupement N-terminal. Le processus se limite habituellement à l'analyse de 30 à 70 résidus. En 1981, Knoop *et al.* ont démontré la possibilité d'utiliser ce réactif pour l'analyse des acides aminés libres. Le couplage des acides aminés se fait en milieu basique. Les phénylthiocarbamoyles d'acides aminés résultants sont directement analysés par chromatographie liquide. Depuis, la technique a été optimisée pour l'analyse des hydrolysats de peptides et de protéines. L'avantage de cette méthode est que les dérivés sont relativement stables et que la détection se fait par UV à 254 nm. L'analyse est donc effectuée sur un appareil conventionnel de CLHP, muni d'un détecteur à longueur d'onde fixe opérant à 254 nm.

La technique idéale d'analyse des acides aminés physiologiques par chromatographie liquide en phase inversée doit répondre à plusieurs critères:

- 1° le réactif doit permettre l'analyse des acides aminés primaires et secondaires dans les fluides physiologiques.
- 2° le réactif ne doit pas interférer avec l'analyse des

composés.

- 3° les dérivés doivent être suffisamment stables pour permettre une quantification précise.
- 4° les dérivés doivent avoir un coefficient d'absorption suffisamment élevé pour permettre la détection et la quantification de quelques picomoles de composé.
- 5° les dérivés doivent avoir une résolution chromatographique intrinsèque (largeur de pic) suffisante pour permettre une analyse rapide avec une résolution adéquate pour permettre la quantification des composés d'intérêt.

La résolution intrinsèque d'un composé est fonction de la stabilité de sa structure conformationnelle. Un composé subissant des changements conformationnels très rapides ou extrêmement lents par rapport au temps de séparation aura une interaction uniforme avec le support chromatographique. Sa résolution intrinsèque sera élevée. Par contre, les molécules possédant des changements conformationnels lents par rapport au temps de séparation, présenteront des interactions instables avec le support chromatographique et il en résultera un élargissement de la bande d'élution.

Dû aux limitations de l'instrumentation disponible, nous avons développé une technique d'analyse en chromatographie en phase inverse basée sur la détection UV à longueur d'onde fixe (254 nm) et sur l'utilisation d'un gradient binaire. La technique choisie devait former des dérivés suffisamment

stables pour permettre la dérivation des échantillons par groupe et leur conservation jusqu'à l'analyse.

4.4.2 Analyse des dérivés *p*-nitrobenzoyles d'acides aminés

4.4.2.1 Introduction

Le chlorure de *p*-nitrobenzoyle est un réactif qui comme les chlorures d'acides précédents, réagit bien avec les acides aminés primaires et secondaires. Les dérivés ainsi formés absorbent fortement dans l'UV, à environ 260 nm, ce qui permet l'utilisation d'un détecteur à lampe de mercure (254 nm). Pour ces deux raisons fondamentales, ce réactif fut sélectionné pour l'analyse des acides aminés.

4.4.2.2 Dérivation

Le chlorure de *p*-nitrobenzoyle (Aldrich Chem. Co., Milwaukee, U. S. A.) est recristallisé dans l'éther de pétrole (60 - 110°C) avant utilisation.

La dérivation des composés se fait de la façon suivante: 100 µl de milieu de culture ou 200 µl d'extrait cellulaire (Section 3.5) sont mélangés avec 100 µl d'une solution 0.25 M de carbonate de sodium et 200 µl d'une solution fraîche de chlorure de *p*-nitrobenzoyle (10 mg/ml) dans le dioxane. Après 30 minutes d'agitation à la température de la pièce, le mélange est neutralisé à l'aide d'HCl 2N et filtré.

4.4.2.3 Chromatographie

La séparation des dérivées *p*-nitrobenzoyle d'acides aminés est effectuée sur une colonne Radial-Pak Resolve C18, 8 mm × 10 cm (grosseur de particules: 10 µm) de Waters. Plusieurs paramètres affectent la séparation des acides aminés. Le pH de l'éluant joue un rôle primordial dans la rétention des produits. Son influence se révèle considérable, bien que le pK_a des groupements carboxyliques des acides aminés libres se situe dans une gamme de valeurs relativement étroite (1.8 - 2.6). La Figure 4.3 illustre l'effet du pH sur la rétention d'une série d'acides aminés par rapport à l'alanine. Pour ce faire, un mélange composé d'acide aspartique, d'acide glutamique, de sérine, de glycine, de thréonine et d'alanine fut dérivé et injecté en mode isocratique (débit: 1.2 ml min⁻¹) dans le tampon d'éluion (50 mM acétate de sodium, 10% méthanol) à des pH variant entre 4.0 et 7.0. A la Figure 4.3, le facteur de sélectivité (α) est défini comme étant:

$$\alpha = \frac{V_{aa} - V_0}{V_{ala} - V_0}$$

où V_{ala} est le temps de rétention de l'alanine, V_{aa} , le temps de rétention de l'acide aminé d'intérêt, et V_0 , le volume mort de la colonne. Sur la Figure, on peut voir les inversions induites par les changements de pH, dans l'ordre d'éluion des composés. La technique d'ionisation contrôlée doit être utilisée pour obtenir la séparation voulue. Nous avons ainsi déterminé que l'interférence de l'acide *p*-nitrobenzoïque avec

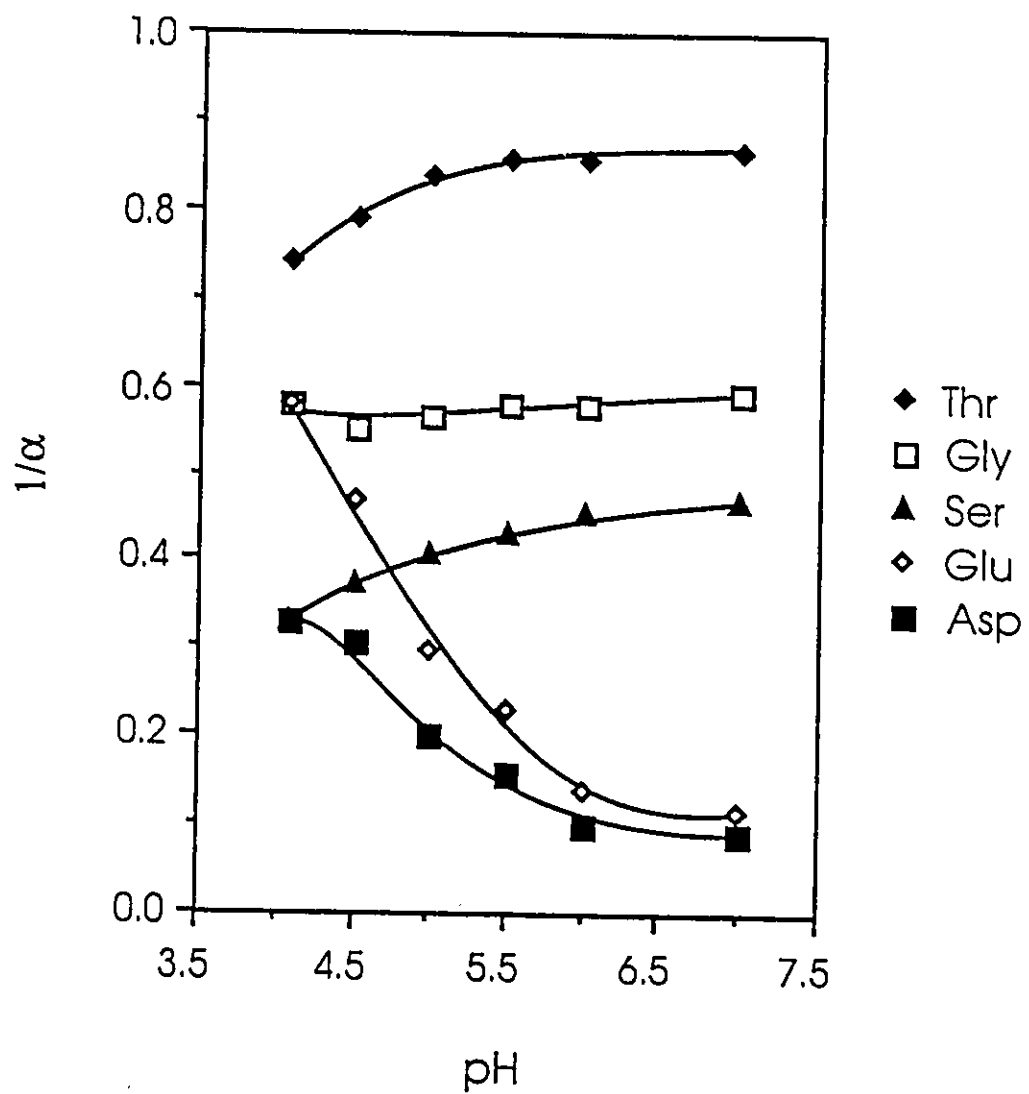


FIG. 4.3. Effet du pH sur la rétention des acides aminés par rapport à l'alanine.

Sur cette Figure, l'alanine est considérée comme ayant une rétention relative ($1/\alpha$) de 1. Les conditions d'élution sont décrites dans le texte.

la glycine et la sérine était minimisée à pH 5.0. La séparation d'un mélange de 18 acides aminés est illustrée à la Figure 4.4. Les conditions de séparation sont données dans le Tableau 4.4.

TABLEAU 4.4. Programme utilisé pour la séparation des dérivés *p*-nitrobenzoyles d'acides aminés.

Temps (min.)	Débit (ml/min.)	Solvant A (%)	Solvant B (%)	Commentaires
init	1.2	93	7	Injection et gradient
35.0	1.2	70	30	
40.0	1.2	50	50	Lavage de la colonne
45.0	1.2	50	50	
50.0	1.2	93	7	Rééquilibration et
55.0	1.2	93	7	nouvelle injection

Solvant A: 50 mM acétate de sodium (pH 5.0), 5% acétonitrile.

Solvant B: acétonitrile.

Le temps d'analyse est de 35 minutes et l'intervalle entre deux injections est de 55 minutes.

Plusieurs autres solvants dont le méthanol ont été testés comme substituts à l'acétonitrile, afin d'améliorer la séparation. Aucun des solvants utilisés n'a donné une largeur de pic comparable et une aussi bonne séparation que celle obtenue avec l'acétonitrile.

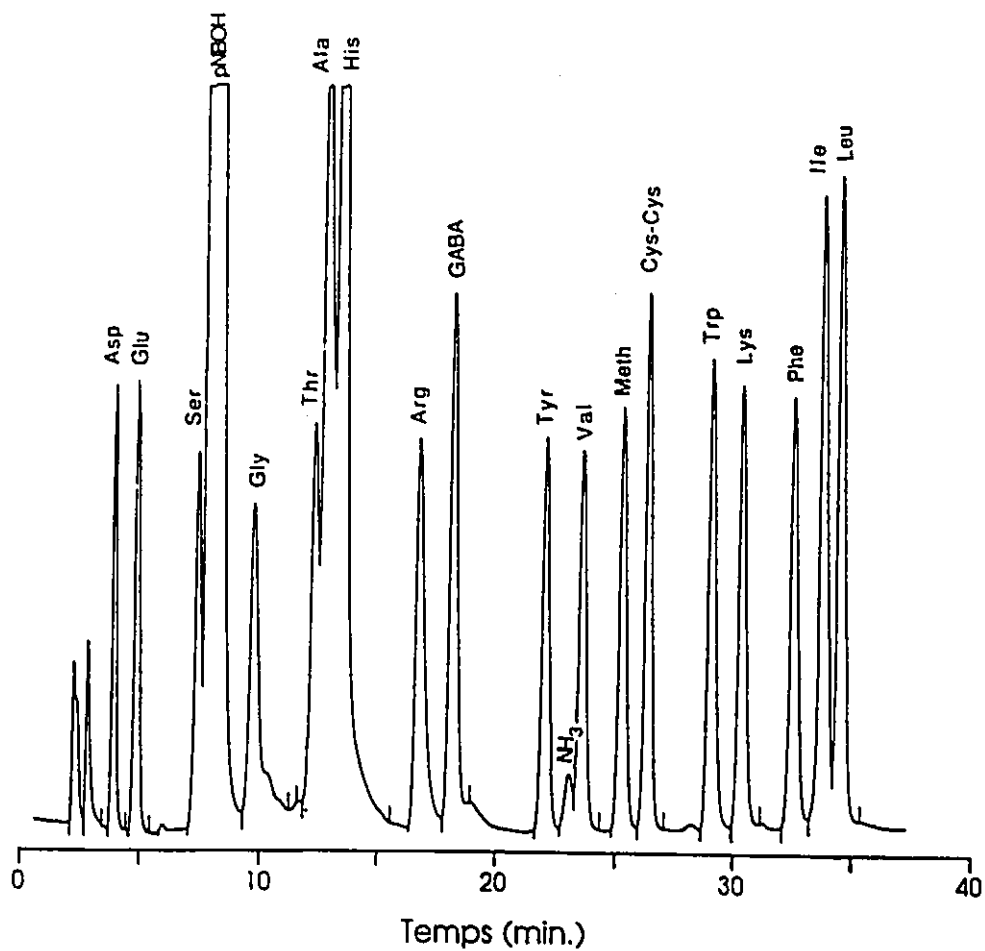
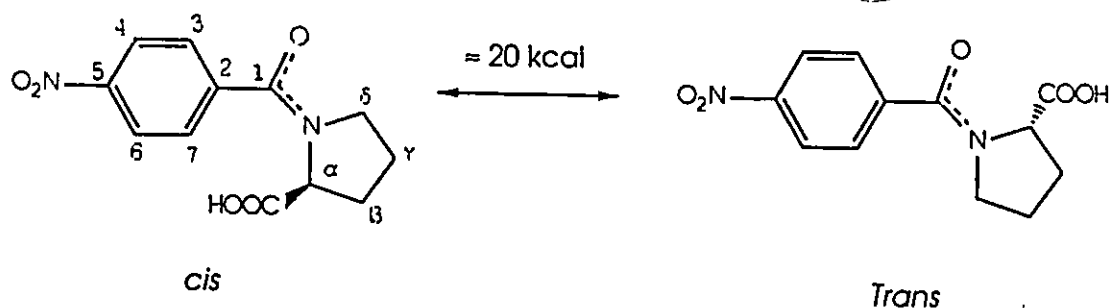


FIG. 4.4. Séparation d'un mélange standard d'acides aminés.

Un volume de 10 μ l d'une solution contenant 1.2 mg/ml de chaque acide aminé, fut injecté. Les conditions de séparation sont données dans le Tableau 4.4.

4.4.2.4 Discussion de la méthode

Les avantages de cette technique sont la facilité de dérivation et le coefficient d'absorption élevé des dérivés formés. Elle comporte cependant plusieurs inconvénients majeurs. Premièrement, l'acide benzoïque formé par la dégradation du réactif en excès interfère avec l'analyse de plusieurs acides aminés tels que l'asparagine, la sérine, la glutamine et la glycine. Cette technique ne peut donc pas être utilisée pour l'analyse des acides aminés physiologiques. En second lieu, bien que la proline réagisse avec le réactif, le dérivé formé ne peut être aisément quantifié et ce dû à la largeur inhabituelle du pic (Fig. 4.5). Ce phénomène d'élargissement peut être expliqué de la façon suivante: contrairement aux acides aminés primaires, la proline forme un lien amide semi-rigide avec le groupement *p*-nitrobenzoyle. La molécule peut donc adopter deux conformations distinctes:



Si on considère que les formes *cis* et *trans* du composé n'ont pas le même degré de rétention sur la colonne, et que le temps de passage d'une conformation à une autre est de l'ordre de

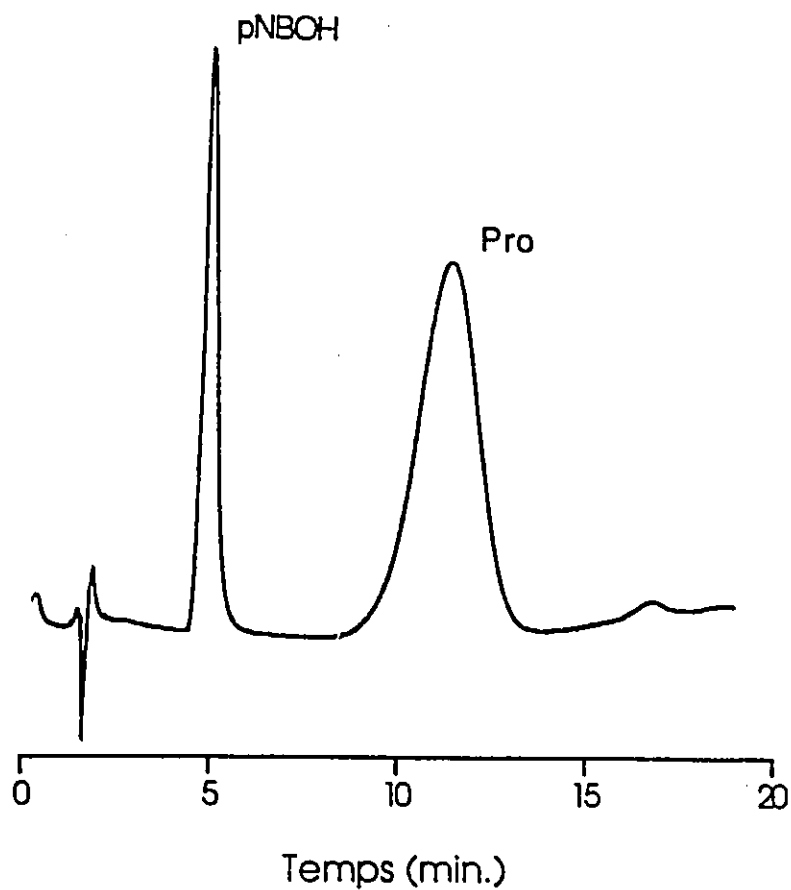


FIG. 4.5. Chromatogramme du dérivé *p*-nitrobenzoylé de la proline.

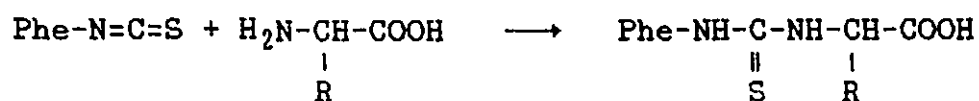
Les conditions d'élution sont les suivantes: le solvant A est un tampon d'acétate de sodium 30 mM (pH 5.0) contenant 5% d'acétonitrile, et le solvant B est de l'acétonitrile pur. L'élution se fait avec un gradient linéaire de 2 à 10% de B en 10 minutes.

plusieurs secondes, le composé possède un caractère polymorphe vis-à-vis le support chromatographique. La largeur de la bande d'éluion sera alors fonction de la vitesse d'échange entre les deux conformères et de leur polarité apparente. Par comparaison avec une série de composés similaires, Stewart et Siddall (1970) ont estimé que l'énergie de la barrière de rotation se situe aux environs de 20 kcal. Le spectre RMN de ^{13}C du dérivé confirme la présence des deux isomères en abondances approximativement égales (Fig. 4.6). Le Tableau 4.5 montre le déplacement chimique des raies ainsi que leur attribution probable.

4.4.3 Dérivés phénylthiocarbamoyles d'acides aminés: méthode 1

4.4.3.1 Dérivation des acides aminés

La réaction du PITC avec les acides aminés est décrite par le schéma général suivant:



où R représente les différentes chaînes latérales sur le squelette le plus commun des acides aminés physiologiques. Contrairement à d'autres techniques d'analyse, la réaction permet aussi bien la détermination des acides aminés primaires que secondaires tels que la proline et l'hydroxyproline. Par conséquent, la lysine, l'ornithine et la cystine, ainsi que tout acide aminé portant plusieurs groupes aminés réagit de

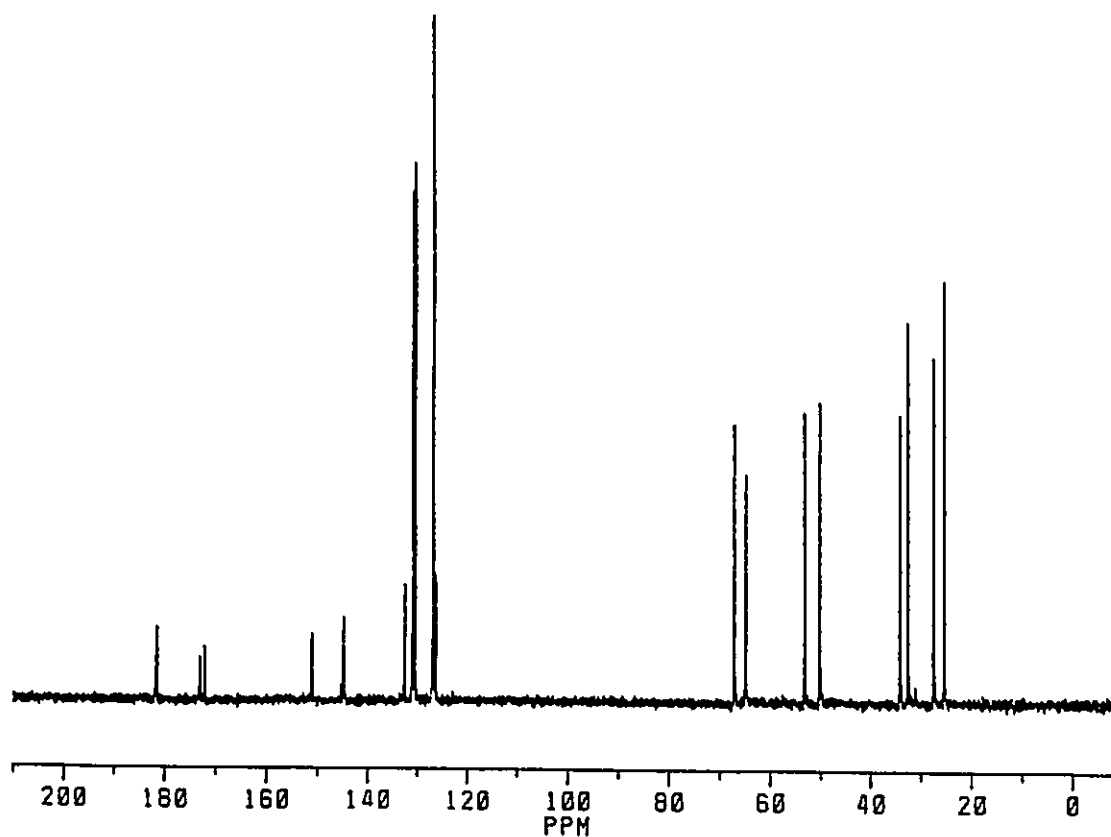


FIG. 4.6. Spectre RMN en ^{13}C du dérivé *p*-nitrobenzoyle de la proline.

Le solvant utilisé pour la spectroscopie est un tampon 100 mM KH_2PO_4 pH 7.4 contenant 5% de D_2O . (FS: 90.56 MHz; AP: 60° ; TR: 3 sec.; NA: 2050; ER: 1.0 Hz; DW; les abréviations sont définies en Annexe).

TABLEAU 4.5. Déplacements chimiques et tentative d'attribution des raies d'absorption des isomères rotationnels du dérivé *p*-nitrobenzoyle proline.

Atome #	δ (ppm)	conformère
COOH	181.579	<i>cis</i>
	181.440	<i>trans</i>
α	67.039	<i>cis</i>
	64.814	<i>trans</i>
β	25.343	<i>cis</i>
	27.432	<i>trans</i>
γ	32.521	<i>cis</i>
	34.113	<i>trans</i>
δ	50.116	<i>cis</i>
	53.113	<i>trans</i>
C-1	172.041	<i>cis</i>
	173.009	<i>trans</i>
C-2	144.677	<i>cis</i>
	144.483	<i>trans</i>
C-3, C-7	130.311	<i>cis</i>
	130.726	<i>trans</i>
C-4, C-6	126.665	<i>cis</i>
	126.704	<i>trans</i>
C-5	150.878	<i>cis</i>
	151.114	<i>trans</i>

L'assignation des raies a été effectuée selon leur intensité dans les spectres RMN de dérivés de composition en isomères rotatoires légèrement différente, et selon l'article de Torchia et al. (1974).

façon stoechiométrique avec le réactif.

La méthode utilisée pour la dérivation est relativement simple et permet de traiter plusieurs échantillons à la fois. Le PITC (Aldrich Chem. Co., Milwaukee, U.S.A.) est distillé sous vide et entreposé à 4°C dans des bouteilles scellées de 1 dram. Aucune perte de réactivité n'a ainsi été notée même après plusieurs années d'utilisation. La pyridine (Pyr) et la triéthylamine (TEA) sont distillées sur KOH avant utilisation. L'éthanol (EtOH) est de qualité spectrophotométrique. Un volume de 100 µl de milieu de culture ou de 200 µl d'extrait cellulaire est déposé dans une série de bouteilles de 1 dram. Cinquante µl de norleucine (2.5 µmoles/ml) sont ajoutés comme référence pour le dosage. Le mélange standard d'acides aminés utilisé pour établir le chromatogramme de référence provient de Sigma (Sigma Chem. Co., Solution standard d'acides aminés contenant de la norleucine, pour l'analyse d'hydrolysats de protéines). Les acides aminés ont une concentration de 0.5 µmole/ml à l'exception de la cystine dont la concentration est de 0.25 µmole/ml. Pour la dérivation, 100 µl de solution standard et 50 µl d'une solution contenant 1 µmole/ml d'asparagine, de glutamine, d'hydroxyproline, d'acide γ-aminobutyrique (GABA) et d'ornithine sont utilisés.

Un volume de 750 µl de mélange EtOH:Pyr:TEA (7:1:1), est ajouté. Les bouteilles sont hermétiquement fermées à l'aide de septum de silicone recouvert de Teflon (Tuf-Bond silicone-Teflon septum; Pierce Chemical Co., Rockford, Ill. U. S. A.)

et les échantillons sont évaporés à l'aide d'un jet d'air sous pression négative, en utilisant le montage décrit à la Figure 4.1. Un bain d'eau à 40 - 45°C est utilisé pour faciliter l'évaporation. L'opération est répétée une seconde fois avec le même volume de mélange. Cette étape permet d'éliminer l'ammoniac habituellement présent en solution et facilite la dérivation. Le réactif est préparé en mélangeant 50 µl de PITC à 10 ml de solution EtOH:Pyr:TEA:H₂O (36:7:3:4). Ce mélange possède la polarité adéquate qui permet une réaction uniforme avec tous les acides aminés, polaires ou non-polaires. Un volume de 500 µl de ce mélange est alors ajouté aux acides aminés, puis est mélangé vigoureusement et sonifié environ 5 minutes dans un bain ultrason pour désorber les acides aminés des parois du verre. La réaction est complète après 20 minutes à la température de la pièce. Les échantillons sont alors évaporés à sec. L'utilisation d'une pompe à vide est conseillée pour éliminer les traces résiduelles de réactif. Les échantillons sont conservés à -30°C jusqu'à leur analyse.

Avant l'analyse, 200 µl d'un mélange de tampon acétate (utilisé pour la chromatographie), contenant 15% d'acétonitrile est ajouté à l'échantillon. Contrairement aux procédures recommandées en chromatographie, le mélange n'est pas dissout dans le solvant de départ car celui-ci ne permet pas de solubiliser convenablement certains dérivés d'acides aminés, principalement ceux portant plusieurs groupements phénylthiocarbamoyles (la cystine, l'ornithine et la lysine).

Le mélange est soigneusement mélangé et sonifié plusieurs secondes afin de remettre les dérivés en solution. Après filtration (filtre GV de 0.2 μm ; Millipore Co., Mass., U. S. A. ou Acro LC13 filter; Gelman Sci., Ann Arbor, U. S. A.), le mélange est prêt à être injecté.

4.4.3.2 Méthode de séparation rapide

Parmi les multiples facteurs affectant la séparation des dérivés phénylthiocarbamoyles (PTC), le pH reste parmi ceux qui prédominent. Les acides aminés libres et les dérivés PTC peuvent être divisés en trois catégories principales selon la structure de leur chaîne latérale: les acides aminés acides (ex: ac. aspartique), les acides aminés neutres (ex: valine) et les acides aminés à caractère basique (ex: histidine). Les dérivés PTC de la lysine et de l'ornithine ont perdu leur caractère alcalin conféré par le groupement aminé de la chaîne latérale par leur réaction avec le PITC. Les pK_a du groupement carboxylique libre des acides α -aminés courants se situent entre 1.82 (histidine) et 2.83 (tryptophane). On peut s'attendre à ce que les dérivés PTC présentent de même un tel écart de pK_a . Malgré une différence de 2 à 3 unités entre le pK_a des acides aminés et le pH du tampon d'élution, de faibles variations du pH de l'éluant ont un effet significatif sur la rétention.

La séparation requiert donc un contrôle de l'ionisation des acides aminés. La nature du tampon, sa concentration et le solvant organique utilisé pour l'élution des acides aminés

sont aussi des paramètres importants impliqués dans la séparation. L'éluant utilisé pour l'équilibration de la colonne est composé de 25 mM d'acétate de sodium, pH 5.45 contenant 1.25% d'un mélange dioxane-THF (2:1). L'ajout de ces solvants organiques modifie sélectivement l'interaction de certains types d'acides aminés avec le support. L'acétonitrile s'est avéré le solvant le plus performant pour l'élution des composés. L'effet des paramètres sur la séparation d'un mélange modèle a été évalué: les modificateurs organiques, la concentration du tampon d'élution, le pH, l'effet du volume de délai du gradient et la concentration initiale en acétonitrile. Le programme utilisé dans cette étude est illustré dans le Tableau 4.6.

4.4.3.3 Effet des modificateurs organiques

En absence de modificateur organique, les dérivés PTC de l'asparagine et de la sérine, de même que ceux de la glutamine et de la glycine, ne peuvent être séparés dans les conditions décrites. La triéthylamine, qui semble affecter spécifiquement la rétention des composés contenant un amide terminal ou un groupement azoté ionisable, permet la résolution des paires asparagine/sérine et glutamine/glycine lorsqu'elle est ajoutée à une concentration de 0.5% à la phase mobile. Cependant, une diminution marquée des temps de rétention de l'histidine et l'arginine provoque leur fusion avec les pics de la thréonine, de l'alanine et de la proline. La quantification de ces produits est donc difficile. Le

TABLEAU 4.6. Programme utilisé pour la séparation des dérivés PTC d'acides aminés (méthode 1).

Temps (min)	Débit (ml/min)	Solvant A (%)	Solvant B (%)	Commentaires
init	1.2	95	5	Injection
(0-2) [†]	1.2	95	5	Délai variable
20.0	1.2	50	50	Gradient
22.0	1.2	0	100	Lavage de la colonne
27.0	1.2	0	100	
30.0	1.2	95	5	Rééquilibration et
35.0	1.2	95	5	nouvelle injection

Solvant A: 25 mM acétate de sodium (pH 5.45), 1.25% dioxane-THF (2:1) sauf indication du contraire.

Solvant B: mélange acétonitrile:eau (60:40).

[†] Délai variable (égale à 0 sauf si mentionné).

dioxane et le THF ajoutés permettent la résolution des deux paires, et diminuent spécifiquement le temps de rétention de la proline sans affecter le reste de la séparation (Fig. 4.7). Une bonne séparation des 26 acides aminés de la solution standard est obtenue avec 3% de dioxane ou 0.5% de THF. Le dioxane sépare légèrement mieux la paire glutamine/glycine et le trio thréonine/alanine/proline. Le THF est légèrement plus efficace pour la séparation de la paire asparagine/sérine.

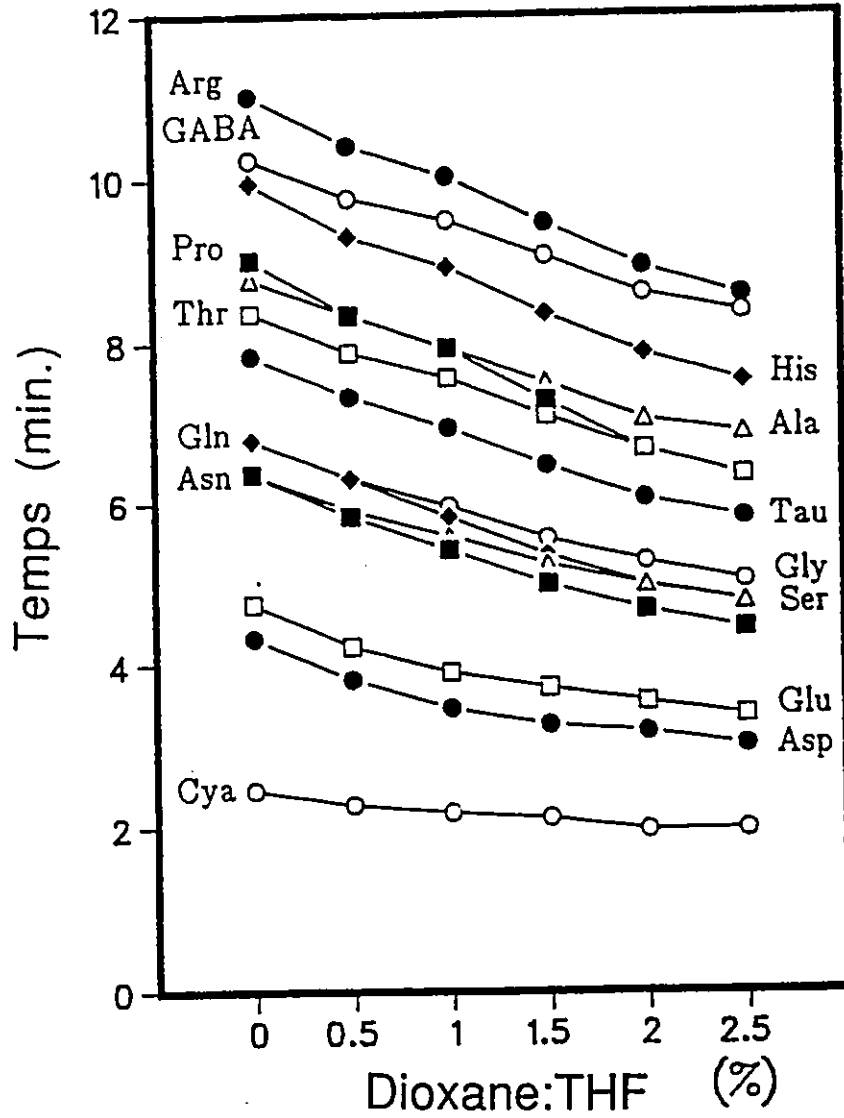


FIG. 4.7. Effet du mélange dioxane:THF sur la séparation des dérivés PTC d'acides aminés.

Les conditions d'élutions sont décrites dans le texte.

Cependant, les deux composés ajoutés à une concentration supérieure à 2% diminuent significativement l'absorbance des dérivés PTC les plus retenus. Pour toutes ces raisons, un mélange dioxane:THF (2:1) semble un excellent compromis. Une bonne séparation de tous les acides aminés est obtenue à une concentration de 1.25%. L'effet des modificateurs organiques utilisés sur le temps de rétention de la proline, est marqué. A une concentration de 1.5% du mélange, la proline est éluée avant la thréonine et l'alanine, alors qu'en absence de ce mélange, elle sort en dernier. D'autres exemples de l'effet du dioxane et du THF sur la sélectivité des colonnes ont été notés dans la littérature (Tanaka et al., 1978). Cependant, aucune explication n'a été émise sur le mécanisme d'interaction.

4.4.3.4 Effet du pH

La Figure 4.8 montre l'effet du pH du tampon d'élution sur la séparation des 26 dérivés PTC. A pH 5.0, l'ornithine et la phénylalanine, ainsi que la cystine, la méthionine et la valine coéluent. De même, la sérine et la glutamine ne sont pas bien séparées. Lorsque le pH augmente, la séparation de ces composés s'améliore, mais les temps de rétention des dérivés de l'acide aspartique, l'acide glutamique et de l'acide γ -aminobutyrique diminuent rapidement. Deux zones de pH sont inutilisables pour la séparation de l'acide γ -aminobutyrique. Autour du pH 5.30, le pic de l'acide γ -aminobutyrique croise celui de l'arginine, et à un pH de 5.55,

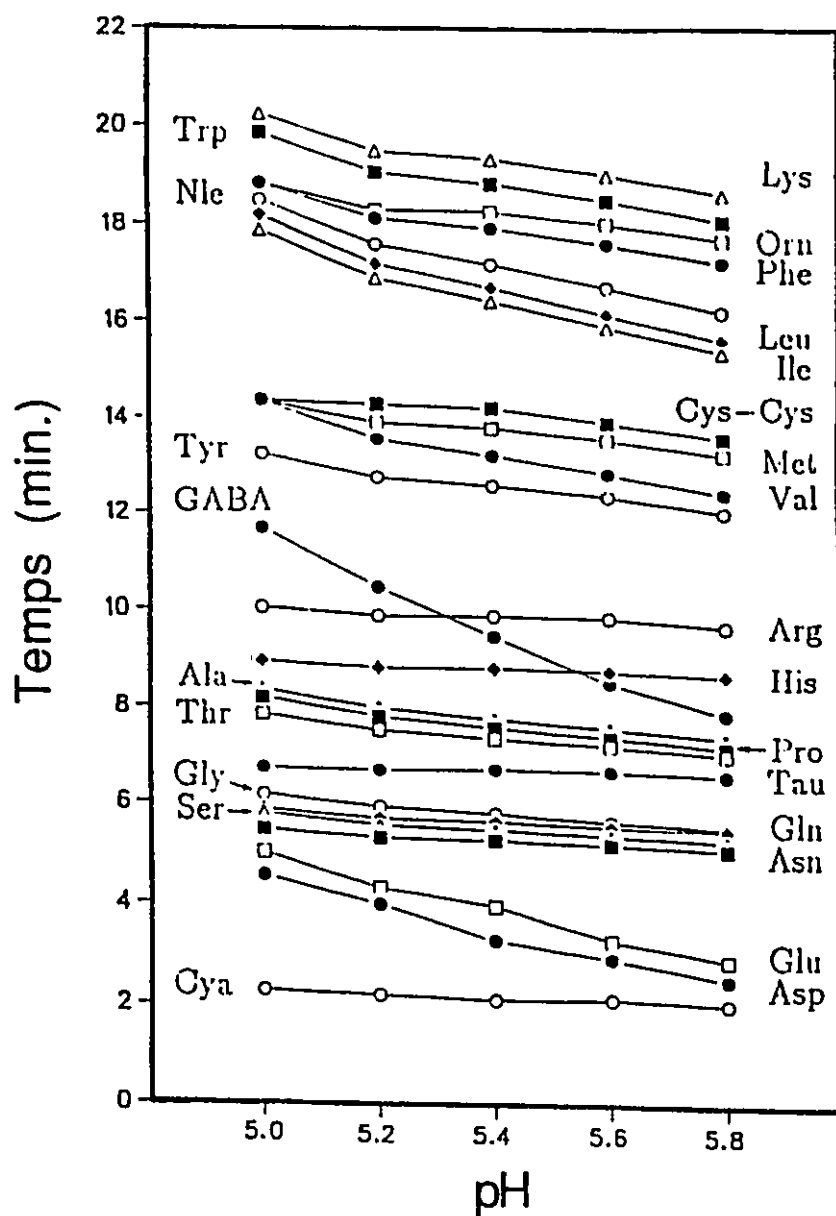


FIG. 4.8. Effet du pH sur la séparation des dérivés PTC d'acides aminés.

Les conditions d'éluion sont mentionnées dans le texte.

il croise celui de l'histidine. D'après ces observations, deux pH peuvent être retenus pour la séparation des dérivés. Le premier se situe à 5.25 où l'histidine et l'arginine sont éluées avant l'acide γ -aminobutyrique. Le second est de 5.45 où l'acide γ -aminobutyrique est élué entre l'histidine et l'arginine. Pour l'ensemble des acides aminés, la séparation est plus efficace au second pH.

4.4.3.5 Effet de la concentration du tampon

Le temps de rétention de la plupart des dérivés augmente avec la concentration en tampon d'acétate de sodium. Seul l'histidine et l'arginine font exception à cette règle (Fig. 4.9) en conservant un temps de rétention relativement constant. A une concentration élevée de tampon, ces composés interfèrent avec l'analyse de l'acide γ -aminobutyrique et de l'alanine. Comme la séparation de ces composés est aussi affectée par le pH, plusieurs combinaisons ont été évaluées. Le meilleur compromis trouvé fut 25 mM tampon acétate, pH 5.45.

4.4.3.6 Effet du volume de délai du gradient et de la concentration initiale en acétonitrile.

Le volume de délai du gradient est augmenté en ajoutant un temps de délai (0 à 2 min) dans le programme (Tableau 4.6) avant le début du gradient. La concentration initiale en acétonitrile est variée en modifiant la concentration initiale du solvant B (0 à 8%) dans le programme. La modification de

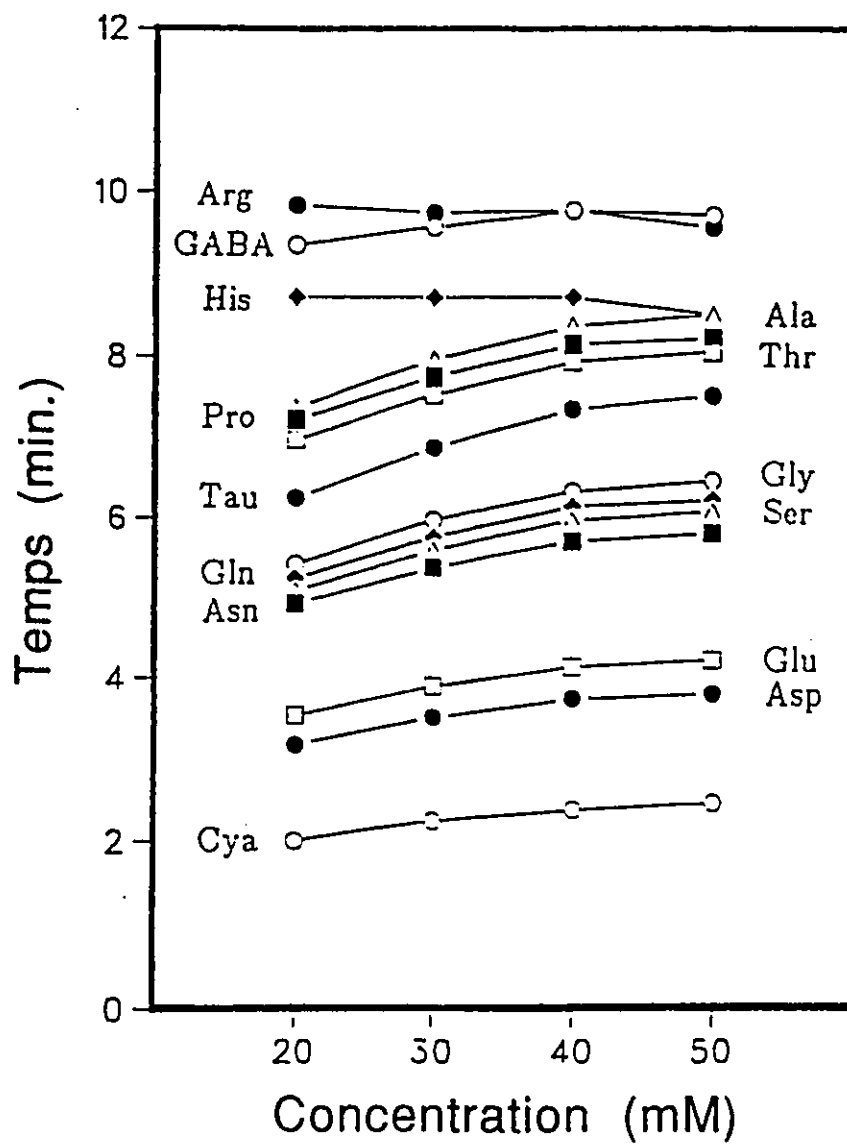


FIG. 4.9. Effet de la concentration du tampon sur la séparation des dérivés PTC d'acides aminés.

Les conditions d'élution sont mentionnées dans le texte.

ces données n'affecte que le degré de rétention des composés, dans la plupart des séparations. Cependant, à cause de la grande diversité de groupements que peuvent posséder les acides aminés, la séparation est sensible à ces paramètres. Etant donné qu'un gradient est utilisé pour la séparation, le volume de délai du gradient et la concentration initiale en acétonitrile affectent surtout la séparation des acides aminés les moins retenus. Une augmentation du délai de gradient diminue la séparation entre la glycine et la glutamine. La séparation des autres dérivés n'est pas changée de manière significative. Avec une boucle d'injection de 250 μ l, le volume de délai intrinsèque du gradient est d'environ 600 μ l. Une faible concentration initiale en acétonitrile a le même effet qu'une augmentation du délai du gradient. A 0% du solvant B, la glutamine et la glycine, de même que la thréonine et la proline ne sont aucunement séparées. Lorsque la concentration du mélange acétonitrile:eau augmente, la séparation s'améliore jusqu'au point où la sérine et la glutamine se fusionnent (8% du solvant B). Sur notre appareil, les meilleures séparations furent obtenues sans aucun délai de gradient ajouté et en utilisant une concentration en mélange acétonitrile:eau de 5%. Ces conditions devront probablement être modifiées afin d'adapter la méthode à un autre instrument.

4.4.3.7 Chromatogramme

La Figure 4.10 montre la séparation du mélange standard contenant de l'hydroxyproline. Les conditions utilisées pour la séparation sont celles mentionnées dans le Tableau 4.6. On peut voir que la séparation des paires asparagine/sérine et glutamine/glycine, de même que celle du trio thréonine/proline/alanine est difficile. La quantification est cependant possible lorsque l'intensité des pics adjacents ne présente pas d'écart trop élevé. Un second problème observé avec cette technique est que l'intensité des pics des dérivés de la lysine et de l'ornithine devrait être approximativement le double de celui des autres composés (la concentration de la cystine est de deux fois inférieure à celle des autres produits). Ces trois produits deviennent disubstitués lors de la réaction avec le PITC, et par conséquent, possèdent un coefficient d'absorption environ deux fois supérieur à celui des autres acides aminés. Pour la même raison, il semble que leur solubilité soit relativement faible malgré les 15% d'acétonitrile utilisés dans le tampon pour la solubilisation des échantillons. Une plus forte augmentation de la concentration d'acétonitrile perturbe la séparation. Etant donné que les résultats des analyses sont reproductibles à environ 10 - 15% près pour ces composés (environ 5% pour les autres acides aminés) et qu'ils sont d'un intérêt secondaire pour ce projet, cette méthode de séparation s'avère satisfaisante.

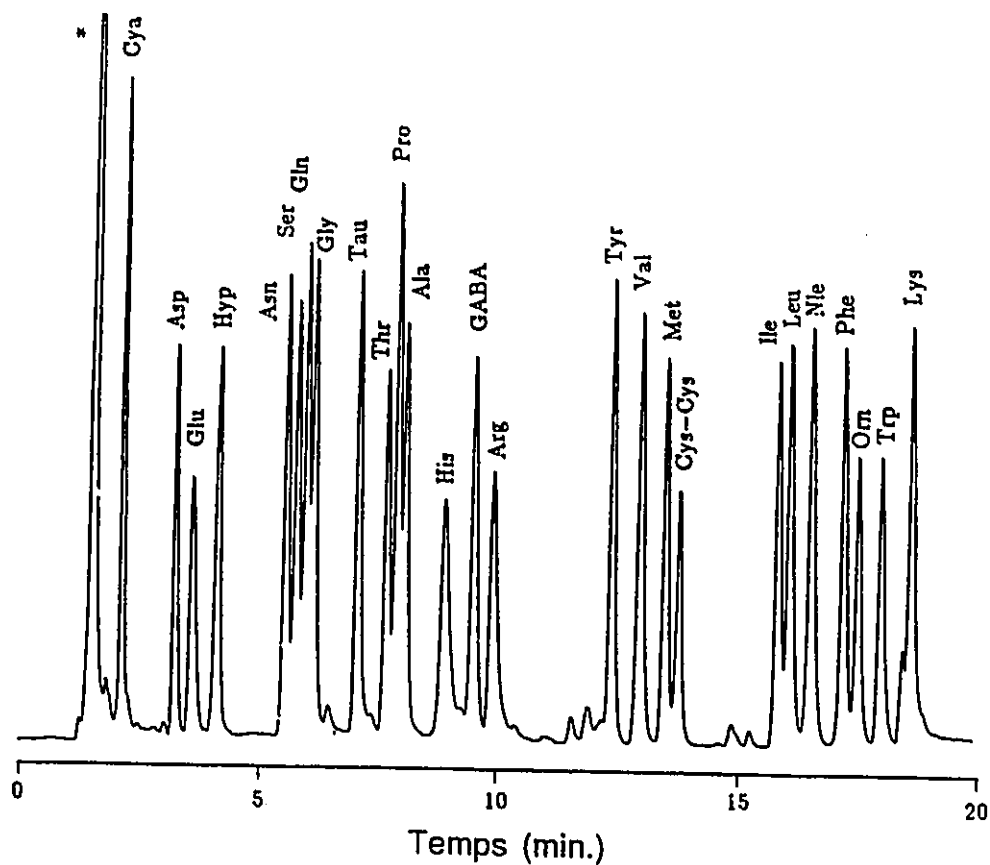


FIG. 4.10. Séparation d'une mélange standard d'acides aminés.

Les conditions de dérivation sont décrites à la section 4.4.3.1. Les conditions d'élutions sont données dans le Tableau 4.6. Un volume de 5 μ l de solution, contenant 0.5 nmole de cystine et 1 nmole des autres acides aminés, fut injecté. La sensibilité de l'enregistreur est de 0.100 UAPE (unité d'absorbance à pleine échelle) et la détection s'effectue à 254 nm.

4.4.4 Dérivés phénylthiocarbamoyles d'acides aminés: méthode 2

4.4.4.1 Dérivation

Plusieurs problèmes reliés à la technique précédente nous ont incité à perfectionner la séparation et à améliorer la quantification des dérivés PTC. Waters (Bidlengmeyer et al., 1984; Cohen et al., 1986) a développé cette technique dans le but de quantifier les acides aminés des hydrolysats de protéines et a aussi porté beaucoup d'attention sur la dérivation des composés, l'influence des sels inorganiques présents sur la vitesse de réaction, ainsi que la stabilité des dérivés. En outre, ils ont noté que le méthanol était un meilleur solvant que l'éthanol pour la dérivation et que la pyridine générait des impuretés qui interféraient avec l'analyse chromatographique. Nous avons donc modifié notre solvant de réaction ainsi qu'une partie du protocole expérimental.

La procédure utilisée reste essentiellement la même que celle décrite à la Section 4.4.3.1. Les échantillons et la référence interne (norleucine) sont placés dans des fioles de 1 dram. Un volume de 750 μ l de mélange MeOH:TEA (7:1) est ajouté. Le solvant est évaporé comme décrit précédemment et l'opération est répétée une seconde fois. L'ammoniac pouvant être présent se trouve ainsi éliminé. Le réactif est préparé en mélangeant 50 μ l de PITC à 10 ml de solution MeOH:TEA:H₂O (7:1:1). Un volume de 500 μ l de ce mélange est alors ajouté aux acides aminés, puis est mélangé vigoureusement et sonifié

environ 5 minutes dans un bain ultrason pour désadsorber les acides aminés des parois du verre. La réaction est complète après 20 minutes à la température de la pièce. Les échantillons sont alors évaporés à sec et conservés à -30°C jusqu'à leur analyse. A ce moment, l'échantillon est dissout à la température de la pièce, dans 200 μl d'un mélange $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (97:3). De 5 à 10 μl de l'échantillon, préalablement filtré, sont habituellement utilisés pour la chromatographie.

4.4.4.2 Séparation

Les deux principales zones où la séparation nécessite une amélioration sont celle de l'asparagine, la sérine, la glutamine, la glycine et celle de la thréonine, de la proline et de l'alanine. L'utilisation de modificateurs organiques (dioxane-THF) a été exclue en raison de la difficulté d'obtenir le dosage précis nécessaire à la séparation.

L'approche utilisée afin d'optimiser la séparation désirée, a été d'augmenter le temps de résidence des composés sur la colonne (temps d'interaction avec la colonne), au détriment du temps de séparation. L'effet de trois paramètres essentiels à la séparation a été étudié de façon indépendante: 1° le pourcentage initial d'acétonitrile dans le solvant d'élution; 2° la pente du gradient d'élution; 3° le débit. Pour compléter l'étude, l'effet de la concentration du tampon et l'effet du pH ont été de nouveau analysés, sous de nouvelles conditions.

Le Tableau 4.7 décrit les conditions optimales trouvées pour la séparation. A partir de celles-ci, les paramètres ont été modifiés individuellement pour analyser leurs effets.

TABLEAU 4.7. Programme utilisé pour la séparation des dérivés PTC d'acides aminés (méthode 2).

Temps (min.)	débit (ml/min.)	Solvant A (%)	Solvant B (%)	Commentaires
fnit	1.00	100	0	Injection et gradient
45.0	1.00	55	45	
46.0	1.40	0	100	Lavage de la colonne
51.0	1.40	0	100	
53.0	1.40	100	0	Rééquilibration avec le solvant initial
58.0	1.00	100	0	

Solvant A: 25 mM acétate de sodium, pH 5.8, 0.2% CH₃CN.

Solvant B: acétonitrile : eau (60:40)

4.4.4.3 Effet du pH

La Figure 4.11 montre l'effet du pH sur la séparation. Les résultats sont semblables à ceux obtenus précédemment. A un pH inférieur à 5.3, l'hydroxyproline est éluée avant l'acide aspartique et glutamique. Cette situation s'inverse à un pH de 5.5. Le pH a peu d'effet sur la séparation de la sérine, de l'asparagine, de la glutamine et de la glycine. Il

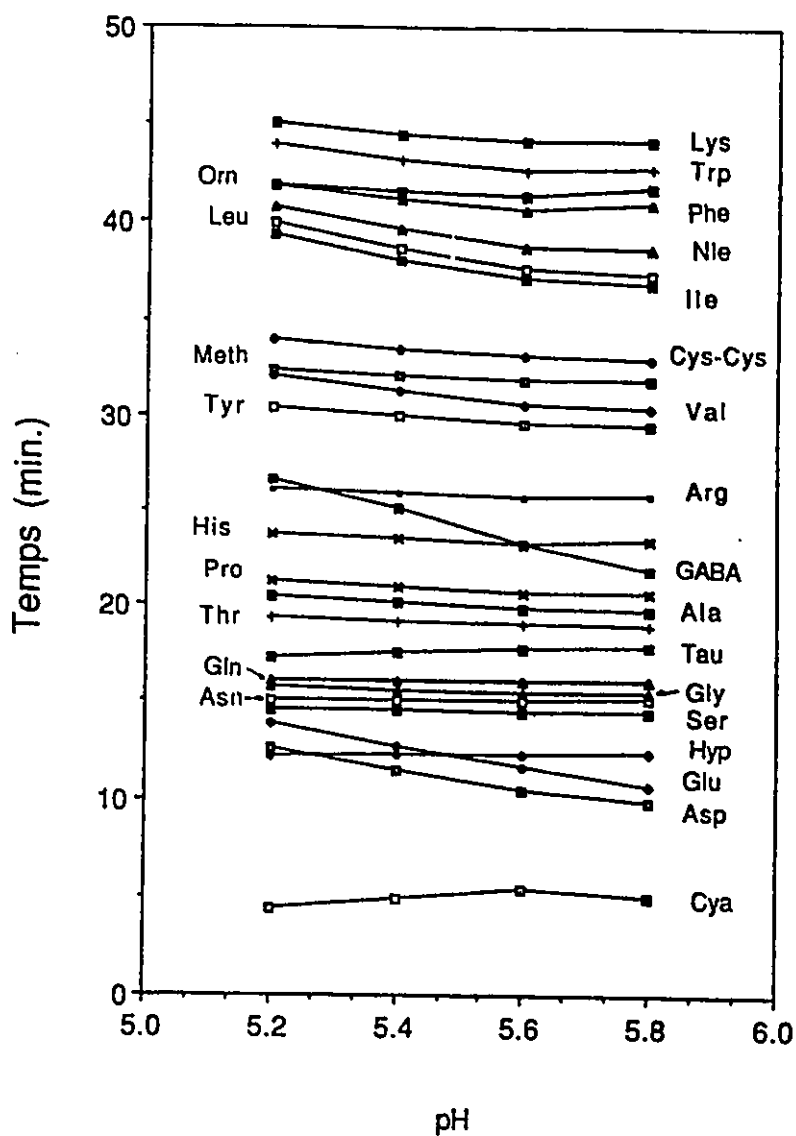


FIG. 4.11. Effet du pH sur la rétention des dérivés PTC d'acides aminés.

Les conditions chromatographiques sont mentionnées dans le texte.

est à noter que l'ordre d'élution de ces quatre acides aminés est inversé par rapport à celui de la Figure 4.10. Les deux amides sortent après les deux acides aminés neutres et non comme dans les exemples précédents alors qu'un "modificateur organique" était utilisé. La proline est aussi éluee après l'alanine et ce, dû à l'absence de modificateurs organiques. La séparation de la proline et de l'alanine s'améliore à des pH inférieurs à 5.4. Par contre, l'ornithine et la phénylalanine se chevauchent dans ces conditions. Les pics élués entre l'isoleucine et la lysine (le dernier) sont mieux répartis à des pH élevés (5.6 - 5.8). A partir de ces résultats, nous avons choisi d'utiliser un pH de 5.8 pour la séparation. A pH supérieur, la rétention des acides aminés acides diminue fortement et l'acide γ -aminobutyrique coéluée avec la proline.

4.4.4.4 Effet de la concentration du tampon

Une augmentation de la concentration du tampon augmente la rétention de la plupart des acides aminés sauf celle de l'arginine et de l'histidine, deux acides aminés à caractère basique, et de l'acide cystéique. La séparation est adéquate dans la zone comprise entre 20 et 40 mM. A des concentrations supérieures, la glycine et la glutamine tendent à se chevaucher et l'histidine s'approche de plus en plus de l'acide γ -aminobutyrique. La concentration choisie pour la séparation est de 25 mM.

4.4.4.5 Effet de la concentration initiale en acétonitrile.

La concentration initiale en acétonitrile est modifiée dans cette étude en augmentant le pourcentage du solvant B dans le programme de gradient. La colonne est aussi équilibrée dans les mêmes conditions. La Figure 4.12 illustre les résultats obtenus. Comme prévu, une augmentation du pourcentage d'acétonitrile réduit surtout la rétention des composés faiblement retenus sur la colonne. L'effet s'atténue par la suite. La séparation de la proline est légèrement affectée par la diminution de la polarité du tampon d'élution. L'effet est beaucoup plus marqué chez les couples sérine/asparagine et glycine/glutamine où les quatre composés se fondent en deux pics distincts lorsque la concentration atteint 8% en solvant B. Nous avons donc choisi d'utiliser 0% de B comme solvant d'équilibration afin de s'assurer une meilleure séparation.

4.4.4.6 Effet de la pente du gradient.

La pente du gradient a été modifiée en changeant la concentration du tampon B à 45 min; seul le temps de rétention des produits élués les derniers sont affectés par le gradient. A l'exception de la cystine et de la méthionine qui tendent à se superposer, la séparation des autres pics ne semble pas être affectée outre mesure. Cependant la qualité de la séparation décroît avec l'augmentation de la pente. Un pourcentage final de 45% en mélange acétonitrile-eau a donc été choisi. Le choix d'une valeur inférieure augmenterait

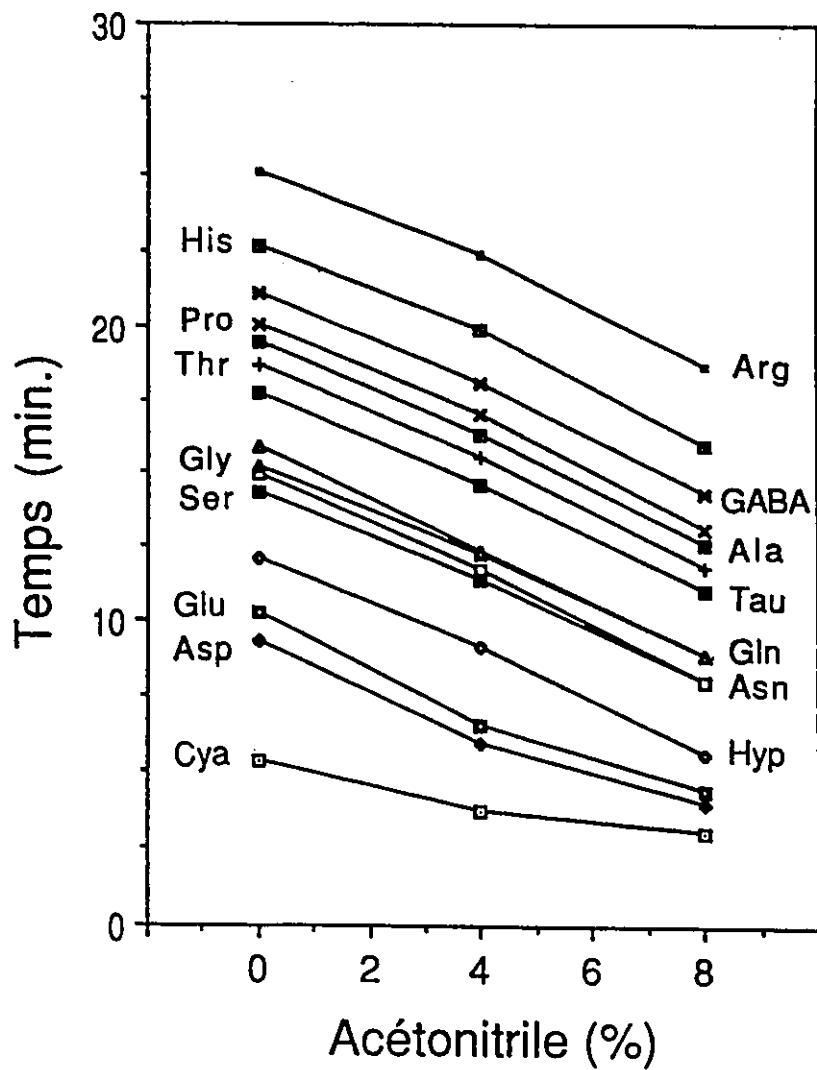


FIG. 4.12. Effet de la concentration initiale en acétonitrile sur la séparation des dérivés PTC d'acides aminés.

Les conditions chromatographiques sont décrites dans le texte.

inutilement le temps d'analyse.

4.4.4.7 Effet du débit

Le débit est un facteur qui a été négligé dans les études précédentes puisqu'on s'attendait à ce qu'il n'affecte que la résolution et le temps d'analyse, et non pas la séparation des composés en tant que tel. Ce n'est cependant pas le cas pour les dérivés d'acides aminés (Fig. 4.13). En plus de diminuer le temps de rétention des composés, les pics de l'asparagine et de la glycine se fusionnent avec une augmentation du débit. Un débit de 1.0 ml/min offre une séparation adéquate des produits. L'utilisation d'un débit inférieur n'a donc pas été jugée nécessaire.

4.4.4.8 Chromatogramme

La Figure 4.14 illustre la séparation obtenue en employant les conditions décrites dans le Tableau 4.7. A l'exception de l'isoleucine et de la leucine, tous les acides aminés sont séparés à la ligne de base. Les acides aminés étudiés ne possèdent aucun chromophore naturel, sauf la phénylalanine et le tryptophane. Outre ces deux exceptions, l'absorbance U.V. des dérivés est donc caractéristique du groupement phénylthiocarbamoylé. Nous avons utilisé les rapports des longueurs d'onde 260/280 nm pour confirmer l'identité des dérivés. Ce rapport se situe entre 2.2 et 2.5 pour tous les acides aminés à l'exception de la proline et l'hydroxyproline (3.2), et du tryptophane (1.6).

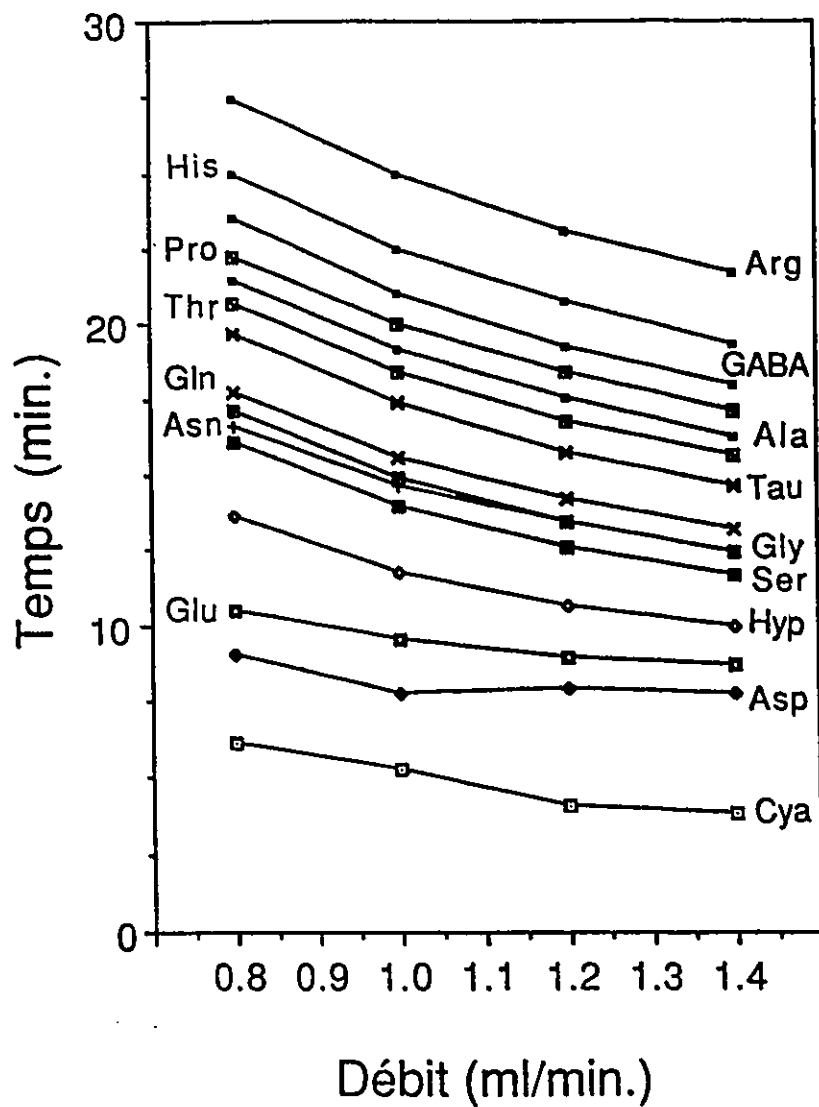


FIG. 4.13. Effet du débit sur la séparation des dérivés PTC d'acides aminés.

Les conditions chromatographiques sont décrites dans le texte.

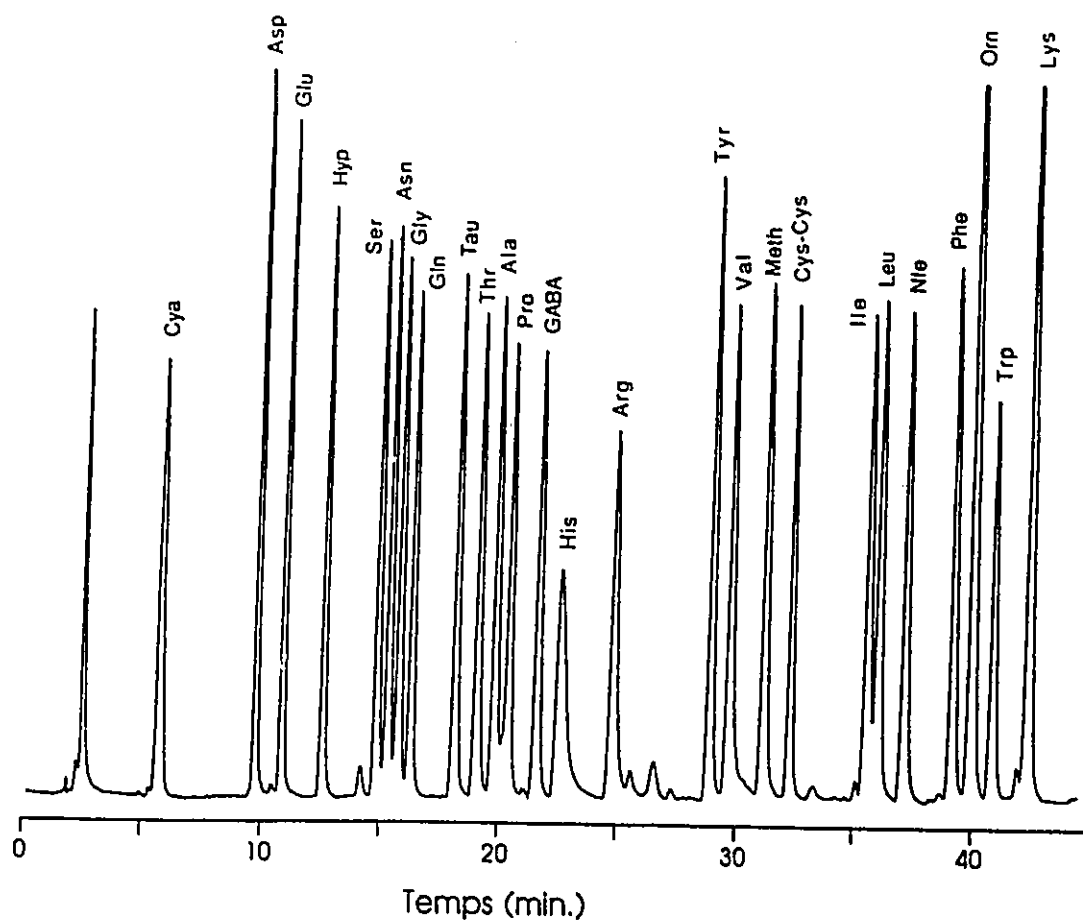


FIG. 4.14. Chromatogramme illustrant la séparation d'un mélange standard d'acides aminés.

Les conditions d'élution sont décrites dans le Tableau 4.7. Cinq μl du mélange contenant $0.5 \mu\text{mole ml}^{-1}$ de cystine et $1 \mu\text{mole ml}^{-1}$ des autres acides aminés, sont injectés. La détection se fait à 260 nm (0.100 UAPE).

Les études précédentes permettent d'adapter les procédures selon la variabilité de séparation obtenue d'une colonne à une autre. Elle permet aussi de modifier les conditions pour tenir compte des changements de comportement de la colonne avec l'âge. Avec les conditions décrites plus de 300 analyses sur la même colonne ont été obtenues sans aucun problème de séparation. La reproductibilité de la technique est aussi très bonne (environ 5% pour tous les acides aminés à l'exception de la cystine, l'ornithine et la lysine dont l'écart s'élève à environ 10-15%).

4.4.4.9 Quantification

La concentration des acides aminés dans le milieu de culture est déterminée comme suit:

$$[AA] = \mu\text{mol}_{\text{Nle}} \times \frac{A_{\text{inc}}}{A_{\text{Nle}}} \times \frac{1000}{V_{\text{an}}} \times F_c$$

[AA] = concentration en acide aminé (mM),

$\mu\text{mol}_{\text{Nle}}$ = μmole de norleucine ajoutée ($\approx 1.25 \mu\text{mole}$),

A_{Nle} = aire du pic de Nle obtenue par CLHP,

A_{inc} = aire du pic de l'acide aminé d'intérêt (CLHP),

V_{an} = volume de l'échantillon analysé (0.100 - 0.200 ml),

F_c = rapport $A_{\text{Nle}}/A_{\text{inc}}$ déterminé dans le mélange de référence analysé dans les mêmes conditions que l'échantillon.

Le facteur 1000 ramène les unités en $\mu\text{mole/ml}$.

La quantité d'un acide aminé (exprimée en fmoles/cellule)

dans l'extrait cellulaire est calculée de la façon suivante:

$$f\text{mol}_{aa} = \frac{V_{ex}}{V_{an}} \times \frac{f\text{mol}_{Nle}}{V_{col} \cdot \rho_{cell}} \times \frac{A_{inc}}{A_{Nle}} \times F_c$$

où:

$f\text{mol}_{aa}$ = fmoles d'acides aminés par cellule,

$f\text{mol}_{Nle}$ = fmoles de norleucine ajoutées ($\approx 1.25 \times 10^8$ fmoles),

V_{ex} = volume total de l'extrait (volume EtOH + culot),

V_{col} = volume de culture collecté (≈ 20 ml),

ρ_{cell} = densité cellulaire de la culture.

La concentration molaire intracellulaire de l'acide aminé est calculée en divisant $f\text{mol}_{aa}$ par le volume cellulaire déterminé à partir de ρ_{cell} et du volume du culot cellulaire, en tenant compte des unités.

4.5 Analyse de l'adénine 3',5' monophosphate cyclique.

4.5.1 Introduction

La concentration de l' AMP_c chez *Acanthamoeba castellanii*, se situe dans une gamme de concentrations qui varient entre 0.2 et 1.0 μM (Gessat et Jantzen 1974). A cause de sa faible concentration, sa détermination est habituellement effectuée l'aide de radioisotopes (Gilman, 1970). Une seconde technique, de plus en plus utilisée, est l'analyse par CLHP. L' AMP_c possède un chromophore naturel ayant un coefficient d'absorption élevé à 260 nm ($\epsilon \cong 15,000$, $\lambda_{\text{max}} \cong 260$ nm à pH 7.0; "CRC Handbook of Biochemistry and Molecular Biology,

Nucleic Acids", 1975). Conséquemment, l'utilisation d'un détecteur ultraviolet permet la détermination de quelques picomoles de produit. Une revue complète des différentes approches utilisées pour la quantification par CLHP des nucléotides cycliques a été publiée par Burgoyne (1984). La chromatographie en mode inversé à l'aide d'une colonne d'efficacité élevée et de faible diamètre (haute sensibilité) a été employée pour quantifier l'AMP_c.

4.5.2 Préparation des échantillons

Les cellules sont collectées et extraites selon la méthode décrite à la Section 3.6. Connaissant le volume du culot cellulaire, un facteur de dilution est calculé. Ainsi, les valeurs de dosage obtenues peuvent être corrigées en conséquence. A partir des données de Gessat et Jantzen (Section 4.5.1), nous avons estimé que la concentration d'AMP_c dans les extraits atteignait environ 75 à 500 pmoles ml⁻¹, ce qui est en principe détectable, sous de bonnes conditions chromatographiques.

4.5.3 Chromatographie et discussion

La séparation est effectuée sur une colonne à compression radiale Nova-Pak (5 mm × 10 cm) de Waters. L'élution se fait en mode isocratique à un débit de 0.8 ml/min avec un mélange tampon de phosphate de potassium 100 mM, pH 6.0 et de méthanol (90:10). Le détecteur mesure l'absorbance de l'effluent à une longueur d'onde de 260 nm. La Figure 4.15 illustre un exemple

de séparation d'un extrait cellulaire injecté conjointement avec 50 pmoles d'AMP_c. Comme nous pouvons le voir, l'AMP_c ne produit qu'un pic mineur sur le chromatogramme. De plus, les nombreux pics voisins rendent difficile la quantification.

Aucun extrait cellulaire ne semblait contenir une quantité appréciable d'AMP_c. Pour un dosage adéquat de l'AMP_c par CLHP, il serait donc nécessaire de développer une méthode d'extraction plus sélective et d'obtenir des extraits plus concentrés. Ce projet ne fut pas poursuivi.

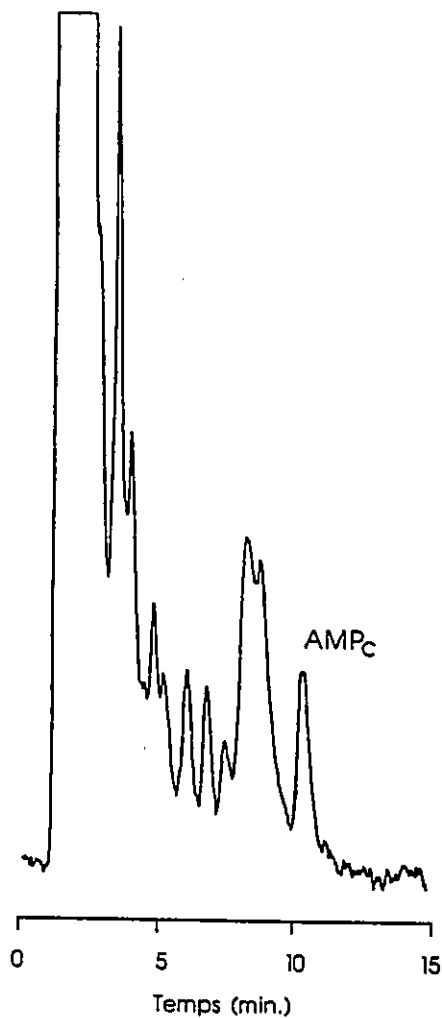


FIG. 4.15. Chromatogramme illustrant la séparation d'un extrait cellulaire contenant de l' AMP_c .

Cent μl d'extrait cellulaire sont coinjectés avec 50 pmoles d' AMP_c . Les conditions chromatographiques sont mentionnées dans le texte. La détection s'effectue à 260 nm (0.010 UAPE).

CHAPITRE 5

TECHNIQUES DE SPECTROSCOPIE DE RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE

5.1 Introduction

La RMN est un outil de plus en plus employé pour l'étude du métabolisme cellulaire. Nous avons appliqué cette technique non perturbante et non destructrice à l'étude du métabolisme d'un microorganisme protozoaire, *Acanthamoeba castellanii*. Deux techniques de perfusion ont été utilisées pour maintenir l'organisme en vie dans l'appareil de RMN. La première consiste à encapsuler les cellules dans des filaments d'agarose. Dans la seconde technique, les cellules sont insérées dans des fibres de dialyse rénale. Ces techniques sont décrites de façon détaillée dans ce chapitre.

La spectroscopie RMN a aussi été utilisée à d'autres fins, telles que la détermination du pH intracellulaire et l'analyse d'extraits cellulaires. La spectroscopie RMN du ^{13}C nous a permis de faire des études du métabolisme cellulaire basées sur l'incorporation de produits enrichis en ^{13}C .

5.2 Spectromètres RMN

Deux spectromètres ont été utilisés dans nos travaux: un Bruker CXP-300 (Bruker Spectrospin Canada, Milton, Canada) équipé d'un aimant de 7.4 Tesla à large orifice (10 cm), et un Bruker AM-360 possédant un aimant de 8.5 Tesla, aussi à orifice large.

Deux types de sonde ont été utilisés avec les systèmes de perfusion. Le premier type est une sonde utilisant des tubes de 15 mm de diamètre et ajustable sur une large gamme de fréquences, permettant entre autre l'acquisition de spectres de ^{31}P et de ^{13}C . Le second type est une sonde utilisant des tubes de 20 mm de diamètre et ajustable sur deux fréquences différentes, permettant d'automatiser l'acquisition alternative de spectres de ^{13}C au ^{31}P . Les sondes utilisées possèdent un canal pour le découplage (^1H) et un autre de verrouillage à la fréquence du ^2H .

Les spectres de ^{13}C et de ^{31}P d'extraits cellulaires ont été principalement acquis avec une sonde de 10 mm à large bande de fréquences. Tout les spectres présentés dans cette thèse ont été obtenus sous découplage de ^1H à large bande de fréquence ou avec une séquence Waltz-16 (Shaka *et al.*, 1983).

5.3 La perfusion des cellules

5.3.1 Introduction

L'étude du métabolisme cellulaire de microorganismes par

spectroscopie RMN doit se faire dans des conditions physiologiquement saines afin d'obtenir de bons résultats. La technique nécessite le confinement de cellules en densité très élevée dans un volume restreint, soit la région visible d'un tube RMN. Les cellules doivent être pourvues en oxygène et en substances nutritives, et l'accumulation de déchets métaboliques doit être évitée. La perfusion des cellules permet de répondre à ces conditions.

5.3.2 Système de perfusion

Comme indiqué précédemment, le système de perfusion a pour principale fonction d'approvisionner en oxygène et en substances nutritives les cellules entassées dans la région visible du tube de RMN. La spectroscopie RMN impose cependant plusieurs contraintes à la conception d'un tel système. La plus sévère est que tout matériau susceptible à l'attraction d'un champ magnétique, doit se trouver à une distance de plus de 2 mètres de l'aimant. La pompe péristaltique utilisée pour la perfusion doit donc être à une distance relativement éloignée, et par conséquent, le perfusé qui est saturé en oxygène, doit être acheminé sur une distance assez grande. Un problème important découlant de ce fait et qu'il ne faut pas sous-estimer, est la diffusion de l'oxygène à travers les lignes de perfusion. Si aucune précaution n'est prise pour contrer cette perméabilité indésirable, la concentration en oxygène à l'arrivée au tube RMN est significativement inférieure à celle obtenue à la sortie du réservoir.

Le système que l'on a fabriqué opère en circulation fermée, ce qui permet l'utilisation de produits marqués (enrichis en ^{13}C). Le volume de perfusat utilisé est de 50 à 75 ml selon les expériences, mais peut être réduit à 35 ml au besoin. La Figure 5.1 décrit ce système. L'oxygène utilisé (95% O_2 , 5% CO_2) est humidifié et décontaminé par son passage dans une solution de 250 ml de KCl 1 M. Le milieu de culture, contenu dans un cylindre, est oxygéné dans le réservoir par barbotage. Il est acheminé ensuite au tube de RMN par une pompe péristaltique (Masterflex model 7014, Cole Palmer Inst., Chicago, U.S.A.) à trois têtes, à travers un tube de silicone (1.5 mm DI \times 2.0 mm DE) de 3 mètres de long. Ce tube perméable au gaz, ainsi que la ligne de retour en polyéthylène (1.67 mm DI \times 2.41 mm DE), sont entourés d'un tube Tygon (6.35 mm DI \times 9.50 mm DE) où circule de l'oxygène. On obtient ainsi une oxygénation plus complète du milieu de culture tout en empêchant la perte d'oxygène à travers les lignes. Deux têtes de pompe fonctionnant en parallèle sont utilisées pour le retour du milieu au réservoir. Ceci élimine tout risque de débordement au niveau du tube de RMN. La stérilisation du système est effectuée par lavage soit avec de l'EtOH 75% suivi d'eau distillée stérile, soit avec une solution de NaOH 0.2 N suivi d'eau et de tampon PIPES 10 mM jusqu'à neutralité. Un mélange d'antibiotiques (pénicilline-streptomycine 0.01%) est ajouté au perfusat pour prévenir toute contamination. Du D_2O (5%) est ajouté au perfusat pour permettre le verrouillage de fréquence pour la spectroscopie RMN.

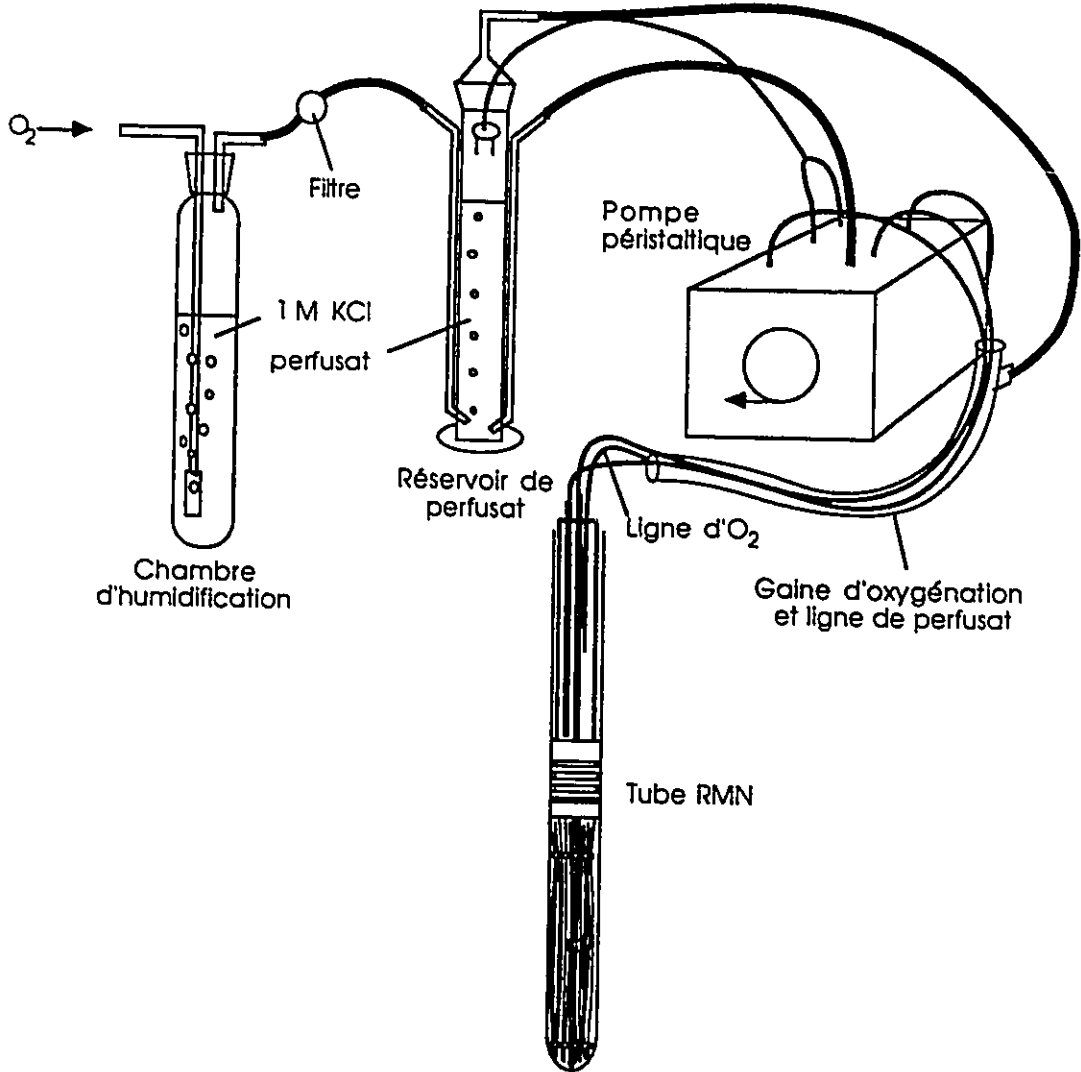


FIG. 5.1. Système utilisé pour la perfusion des cellules.

Pour nos études, la régulation de la température n'est pas un facteur essentiel. Une version thermorégularisée du même système a été mise au point pour la perfusion d'organes (Geoffrion *et al.*, 1985). En résumé, le système est semblable à celui de la Figure 5.1 et comprend en plus un bain à température contrôlé où est incubé le perfusé et une pompe permettant la circulation de l'eau du bain dans une seconde gaine entourant celle d'oxygénation et les lignes de perfusé. Les lignes de transport sont isolées pour minimiser les pertes de chaleur.

5.3.3 Perfusion avec les filaments d'agarose.

5.3.3.1 Description du système

La Figure 5.2 illustre le système utilisé pour la perfusion des fibres d'agarose, au niveau du tube de RMN. Il comporte deux parties. La première achemine le perfusé à la base du tube de RMN de 15 mm. Les filaments sont perfusés de bas en haut par le milieu. La ligne de perfusion est un tube de polyéthylène (1.19 mm DI × 1.70 mm DE) de 34 cm. Un second tube de 2.8 cm (1.78 mm DI × 2.80 DE) est inséré sur le premier pour augmenter le diamètre de la ligne à sa base. Les tubes ont été évasés à la flamme dans le bas pour former un renflement. Un disque de Teflon comprenant 8 trous périphériques et un central, est inséré sur les tubes. Ce disque formera un joint étanche entre la ligne d'arrivée du perfusé et les parois du tube de RMN. Un morceau de tube de silicone (1.6 mm DI × 4.8 mm DE) retient le disque en place. Dans la

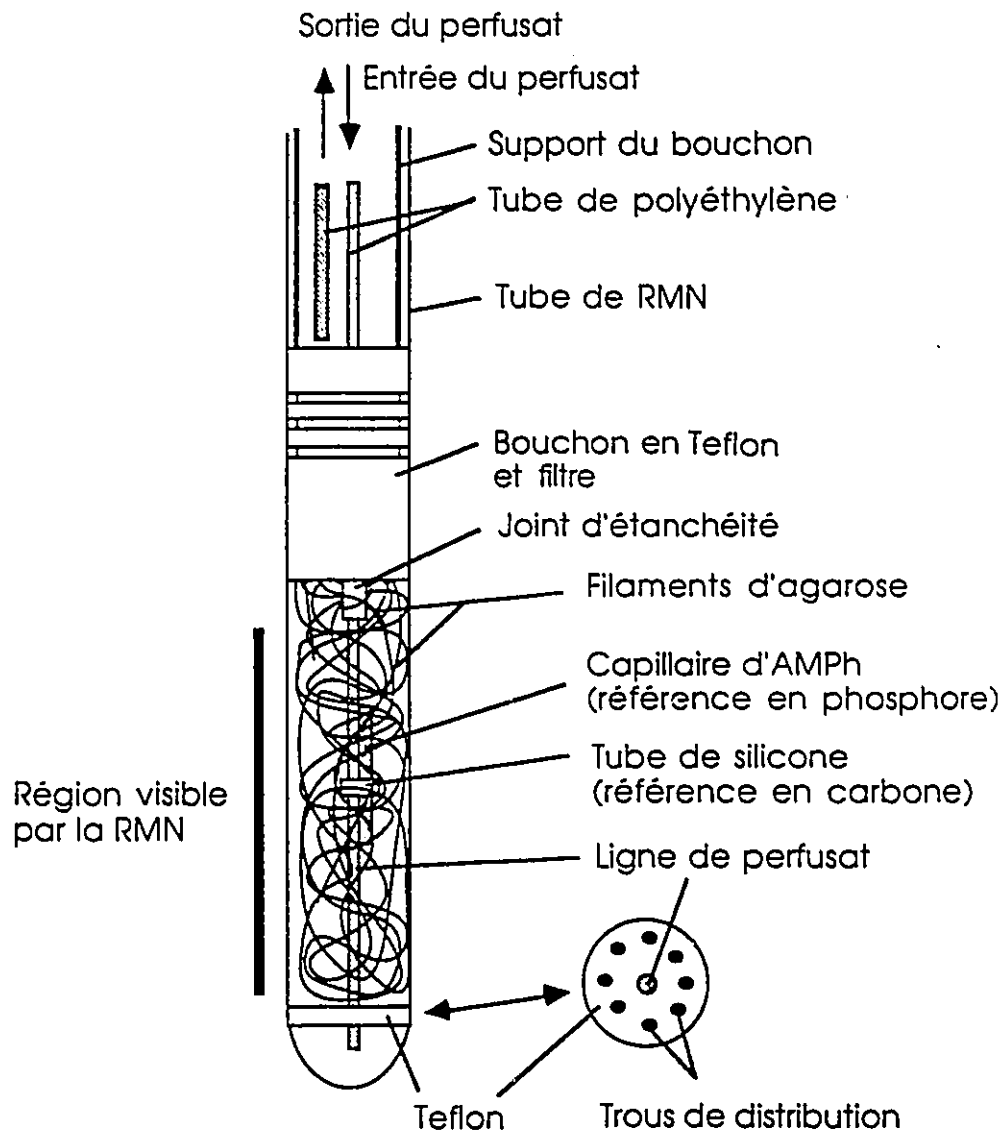


FIG. 5.2. Système utilisé pour la perfusion des cellules emprisonnées dans les filaments d'agarose.

zone d'observation du tube RMN, un capillaire d'aminométhylphosphonate (250 mM, pH 6.0) est retenu par un tube de silicone de 2 mm (0.86 mm DI × 3.2 mm DE). Le capillaire sert de référence (11.66 ppm) pour les spectres de ^{31}P alors que le tube de silicone donne une résonance à 0.8 ppm en ^{13}C . Un second tube de silicone (5 mm × 1.5 mm × 2.0 mm) sert de joint d'étanchéité entre les deux parties du système.

La partie supérieure du système de perfusion comprend un bouchon de Teflon partiellement creux, attaché à un support de plastique à l'aide d'une ficelle. La partie de Teflon possède trois trous périphériques permettant à la fois d'attacher le bouchon à son support et d'évacuer le perfusé. Un morceau de caoutchouc mousse est inséré dans la partie creuse du bouchon et permet de retenir les fibres d'agarose dans le tube RMN. Un tube de polyéthylène (34 cm × 1.57 mm DI × 2.08 mm DE) attaché au support sert à l'évacuation du milieu.

5.3.3.2 Préparation des fibres d'agarose

La technique consiste à préparer un mélange de cellules et d'agarose à environ 40°C. Le mélange est alors forcé dans un capillaire de faible diamètre à l'aide d'une seringue. La suspension est recueillie sous forme de filaments dans le milieu de culture refroidi du tube de RMN. Durant le processus, la température du mélange agarose/cellules doit être maintenue à une température supérieure à la celle de gélification de l'agarose utilisée (36°C). Durant cette étape, les cellules sont en anoxie et exposées à une température

relativement élevée. Les manipulations doivent donc être exécutées rapidement.

Le capillaire utilisé pour la fabrication des filaments est un tube de polyéthylène de 25 cm de longueur et 0.38 mm de diamètre interne (1.09 mm DE). Il est fixé sur une seringue de 3 ml à l'aide d'une aiguille (grosseur 23, 1"). Un second tube de polyéthylène de 20 cm (1.14 DI × 1.57 mm DE) est inséré par dessus le premier pour augmenter sa rigidité.

Dans un erlenmeyer de 25 ml, fermé à l'aide d'un papier d'aluminium, 400 mg d'agarose (Sigma Chem. Co, agarose type I) sont dissouts à chaud dans 25 ml de milieu OGM 1/2. La solution devenue translucide est transférée dans un bain thermorégularisé à 40 - 42°C jusqu'à utilisation.

Le tube RMN (15 mm) stérile est rempli aux deux tiers de milieu de perfusion et la partie inférieure du système de perfusion est mise en place. Le tube est par la suite placé dans un bain de glace.

Les étapes suivantes doivent être effectuées rapidement. Les cellules provenant de 100 ml de culture (densité cellulaire de 7 à 12×10^6 cellules/ml) sont récoltées à la température de la pièce par centrifugation (centrifugeuse Internationale modèle V, rotor modèle 250, 3 minutes à 110 g). Le surnageant est enlevé par succion. Environ 3 ml de culot cellulaire est mélangé à 2 ml d'agarose. Trois ml de ce mélange sont transférés dans la seringue munie du tube

capillaire. Les filaments formés à un débit constant sont récoltés directement dans le milieu refroidi du tube RMN. Cette opération doit être effectuée le plus rapidement possible pour éviter que l'agarose ne fige dans la seringue. Un fois cette étape terminée, la partie supérieure du système de perfusion est mise en place et les raccords sont effectués avec le reste du montage. La perfusion est effectuée à un débit de 8 ml/min.

5.3.4 Fibres à dialyse.

5.3.4.1 Confection du faisceau de fibres à dialyse.

Les fibres utilisées pour la perfusion proviennent de dialyseurs rénaux (modèle 12•11, Travenol Laboratories Inc., Deerfield, U.S.A.). Le dialyseur commercial utilisé est composé de 6100 fibres de rayonne modifiées au cupramonium et possède un poids moléculaire d'exclusion de 15,000 Daltons. Les fibres ont un diamètre interne de 200 μm et une épaisseur de 11 μm . Humides, elles deviennent très flexibles et résistantes.

Pour fabriquer les unités de perfusion, un dialyseur est décortiqué et les fibres sont extraites avec leurs embouts de colle. Six unités pour la perfusion peuvent être fabriquées à partir d'un dialyseur. Les fibres sont d'abord coupées en deux parties de longueur égale. Chaque moitié est ensuite divisée en trois groupes contenant chacun environ 2000 fibres. L'extrémité libre des fibres est attachée à l'aide d'une

ficelle. Les embouts de colle des fibres sont enlevés.

Un nouvel embout doit être fabriqué à chaque unité afin de permettre l'insertion des cellules dans les fibres à l'aide d'une seringue. Les fibres sont enveloppées dans du papier laissant dépasser environ 1.5 cm de l'extrémité non attachée des fibres. Cette partie est copieusement enduite de colle Epoxy (Lepage Ltd., Bramalea, Canada) préalablement diluée avec un peu de méthanol jusqu'à la fluidité voulue. Un bout de tube de polyéthylène de 3 à 4 cm (1.19 mm DI × 1.70 mm DE) est inséré au centre de l'embout pour permettre le moulage d'un orifice. Cet orifice servira ultérieurement à l'insertion de la ligne de perfusion. Un moule tubulaire de polyéthylène fabriqué à l'aide d'un morceau de seringue de 10 ml à usage unique (2 cm × 14 mm DI × 17 mm DE) est glissé sur les fibres collées. Ceci permet de donner une forme parfaitement sphérique à l'embout. Un peu avant que la colle atteigne sa rigidité maximale (environ 2 heures), 2 à 3 mm de l'embout sont coupés à l'aide d'une lame tranchante. La lumen des fibres est ainsi dégagée. Une fois le durcissement complété, les fibres sont démoulées et un tube de polyéthylène (1.19 mm DI × 1.70 mm DE) est inséré au centre de l'embout à la place du tube ayant servi de moule. L'extrémité du tube a été préalablement évasée à la flamme pour limiter son insertion. Ce tube servira ultérieurement à l'arrivée du milieu de culture durant la perfusion des cellules. Un petit morceau de tube de silicone (3 mm × 1.6 mm DI × 3.2 mm DE) est

glissé sur cette ligne jusqu'au centre des fibres et sera utilisé comme référence en ^{13}C . Un petit capillaire d'aminométhylphosphonate peut être inséré au même endroit si nécessaire. Un second bout de tube en silicone (6 mm \times 1.6 mm DI \times 4.8 mm \times 1/16" DE) est inséré sur la ligne juste au-dessus des fibres et servira à retenir la partie supérieure du système de perfusion.

5.3.4.2 Perfusion des fibres à dialyse

Le système utilisé pour la perfusion des cellules avec les fibres de dialyse est illustré à la Figure 5.3. Il est constitué d'un bouchon de Teflon pouvant être inséré dans le tube RMN de 20 mm. Le bouchon comporte 3 trous périphériques servant à l'évacuation du perfusé et permettant d'attacher celui-ci à son support. Un orifice central permet l'insertion de la ligne de perfusion lors de l'assemblage du système. Une ligne d'évacuation du perfusé (34 cm \times 1.57 mm DI \times 2.08 mm DE) attachée au support, récolte le perfusé à la sortie du bouchon.

5.3.4.3 Insertion des cellules dans les fibres à dialyse

Une seringue de plastique de 5 cc (11 mm DI \times 13 mm DE) amputée de l'extrémité servant à la pose d'aiguille est couplée à l'embout d'époxy des fibres à l'aide d'un morceau de tube Tygon (2.5 cm \times 12.7 mm DI \times 15.9 mm DE). Avant l'utilisation, les fibres sont lavées à l'eau distillée pour permettre leur gonflement. Une ficelle de soie chirurgicale

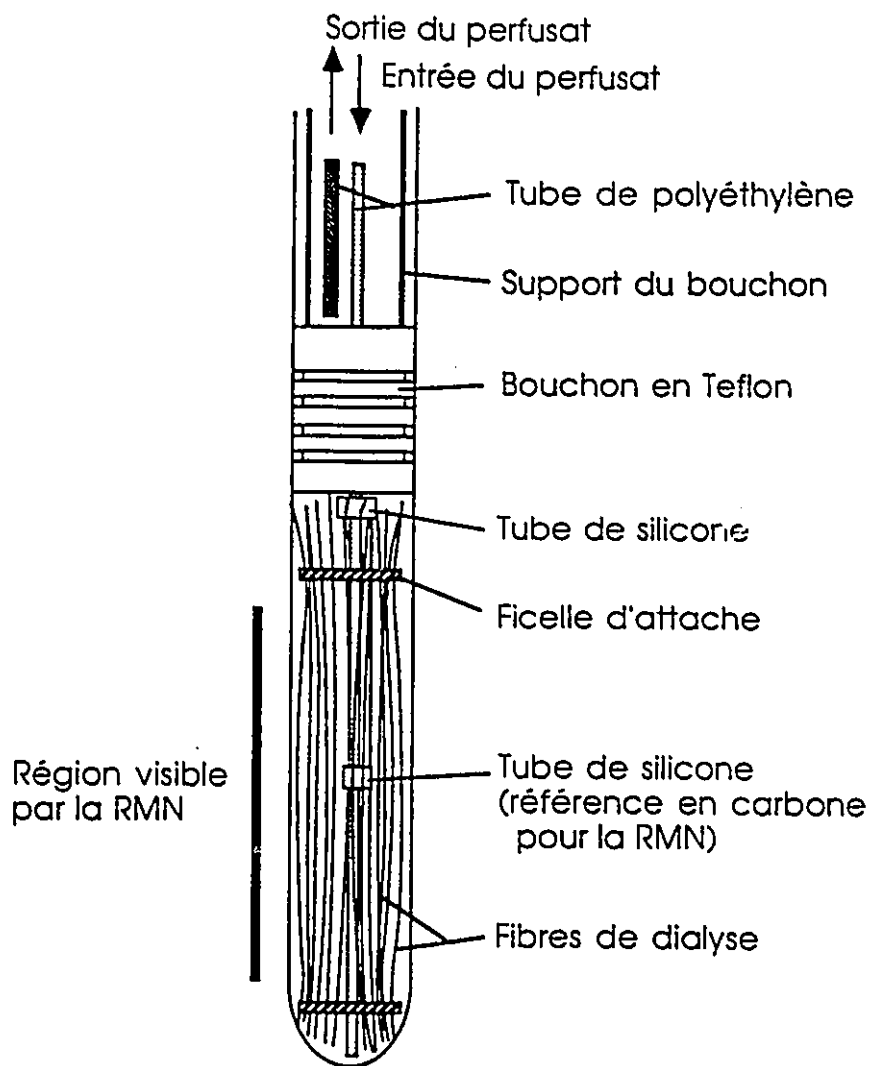


FIG. 5.3. Système utilisé pour la perfusion des cellules emprisonnées dans les fibres à dialyse.

(grosseur 2.0) est attachée à l'aide d'un noeud plat très lâche autour des deux extrémités des fibres. Les unités de perfusion sont ensuite enveloppées d'une pellicule plastique pour les protéger contre la contamination. La capacité des unités est mesurée en injectant 5 ml d'eau dans les fibres. La quantité d'eau pouvant par la suite en être retirée à l'aide de la seringue donne approximativement la capacité de l'unité (environ 4 ml). Les unités sont stérilisées soit par lavage à l'éthanol 95% suivi d'eau stérile, soit par lavage au NaOH 0.2 N suivi d'eau et de tampon PIPES 10 mM pH 7.0 jusqu'à neutralité. Les unités pourraient éventuellement être stérilisées par autoclavage en remplaçant le tube de perfusion de polyéthylène par un tube en Teflon.

Pour l'insertion des cellules, les manipulations doivent être effectuées dans une hotte stérile et avec la plus grande précaution. Le tube de perfusion est bouché à l'extrémité opposée aux fibres pour empêcher le passage des cellules. Un volume de 5 ml de culot cellulaire est introduit dans la seringue par l'ouverture du piston. Le piston est mis en place et le tout est placé en position verticale, les fibres étant orientées vers le haut. Les bulles d'air sont chassées et les cellules sont introduites lentement dans les fibres. Une fois l'opération effectuée, la pellicule plastique est retirée. Les ficelles sont serrées fermement de manière à fermer l'ouverture des capillaires et empêcher la fuite des cellules. L'embout d'Epoxy est coupé à l'aide d'une lame de rasoir et l'unité de perfusion est insérée dans le tube RMN de

20 mm préalablement rempli de milieu OGM 1/2. Le bouchon de Teflon et son support sont mis en place. La perfusion est amorcée à un débit de 12 ml/min aussitôt que les raccordements avec les lignes de perfusion sont effectués.

5.3.5 Comparaison des techniques de perfusion.

Les deux techniques de perfusion décrites ont été utilisées successivement et toutes deux ont donné de bons résultats lors de nos études. La technique des filaments d'agarose permet d'obtenir un rapport signal sur bruit légèrement supérieur à celui de fibres de dialyse, mais comporte plusieurs inconvénients. En premier, la fabrication des filaments implique la soumission des cellules à des chocs thermiques importants dont les effets sur le métabolisme cellulaire sont difficilement prévisibles. En second, la fabrication des fibres est plutôt fastidieuse car elle implique des manipulations rapides dans une marge de température restreinte. Une température trop élevée tuerait les cellules et une température inférieure à 36°C induit la gélation de l'agarose. Le processus de fabrication prend environ 10 - 15 minutes durant lesquelles les cellules sont maintenues à haute densité, à température élevée, et en anoxie. Les filaments sont en général fragiles et supportent mal la perfusion à débit élevé.

La technique des fibres à dialyse a été plus fréquemment utilisée en raison de la simplicité des manipulations

impliquant les cellules. Le faible diamètre des fibres assure une bonne distribution des éléments nutritifs ainsi que l'oxygène aux cellules. Des expériences effectuées dans des conditions semblables avec les deux techniques de perfusion n'ont montré aucune différence significative quant au métabolisme cellulaire. Ni l'agarose, ni les fibres de dialyse n'interfèrent avec la spectroscopie RMN des cellules.

5.3.6 Evaluation du système de perfusion.

Le milieu utilisé pour la perfusion des cellules (OGM 1/2) a été élaboré pour maintenir les cellules en vie et pour ne pas masquer les signaux intéressants en RMN de ^{31}P et de ^{13}C . Pour cette dernière raison, le milieu ne contient pas de glucose et que la moitié de la concentration du milieu OGM, en protéose peptone et en extrait de levure. De plus, outre le phosphate déjà présent dans l'extrait de levure et la protéose peptone, aucune source de phosphate inorganique n'a été ajoutée au milieu. Ainsi, lorsque le pH du milieu de perfusion diffère suffisamment de celui du cytoplasme cellulaire, le pH intracellulaire (pH_i) peut être déterminé à partir du déplacement chimique de la raie de phosphate inorganique intracellulaire. Le milieu ainsi composé ne supporte pas la croissance des cellules mais permet de les maintenir en vie plusieurs jours sans induire l'enkystement.

L'oxygénation est probablement le facteur limitant lors de la perfusion des cellules. Bien que *Acanthamoeba castellanii* puisse s'adapter à une vaste gamme de tensions

d'oxygène (Edwards et Lloyd, 1977), il est raisonnable d'affirmer que le métabolisme cellulaire soit modifié suivant les conditions d'oxygénation. Le symptôme prépondérant de l'anoxie est l'acidification des cellules, suivi d'une diminution du niveau d'ATP et d'une augmentation de la concentration en phosphate inorganique. On peut donc déterminer si les cellules sont adéquatement oxygénées en mesurant ces paramètres. Comme nous l'expliquons à la Section 5.4, le pH intracellulaire est déterminé en spectroscopie RMN de ^{31}P à partir du déplacement chimique de la raie de phosphate inorganique. Le pH_i , les niveaux d'ATP et de P_i peuvent donc être déterminés par RMN de ^{31}P . Chez des microorganismes eukariotes, le pH_i se situe entre 7.0 et 7.5 (Section 6.3.4). Pour étayer notre argumentation de l'effet de l'anoxie sur le pH_i nous avons, lors d'une expérience de perfusion, substitué l'oxygène (95% O_2 , 5% CO_2) qui sature habituellement le perfusé, par de l'azote (95% N_2 , 5% CO_2). La Figure 5.4a montre un spectre RMN de ^{31}P de cellules perfusées dans des fibres de dialyse en présence d'oxygène. Le pH_i calculé est de 7.11. Lorsque l'oxygène est substitué par de l'azote, l'effet est immédiat. Le pH intracellulaire et le niveau d'ATP diminuent immédiatement. La baisse en ATP varie entre 30 et 70% selon les expériences. Après cette perte initiale, le niveau d'ATP reste stable pour plusieurs heures. La Figure 5.4b montre les cellules après environ 50 minutes de perfusion en présence d'azote. La perte exacte en ATP est difficile à mesurer en employant les hauteurs de raie

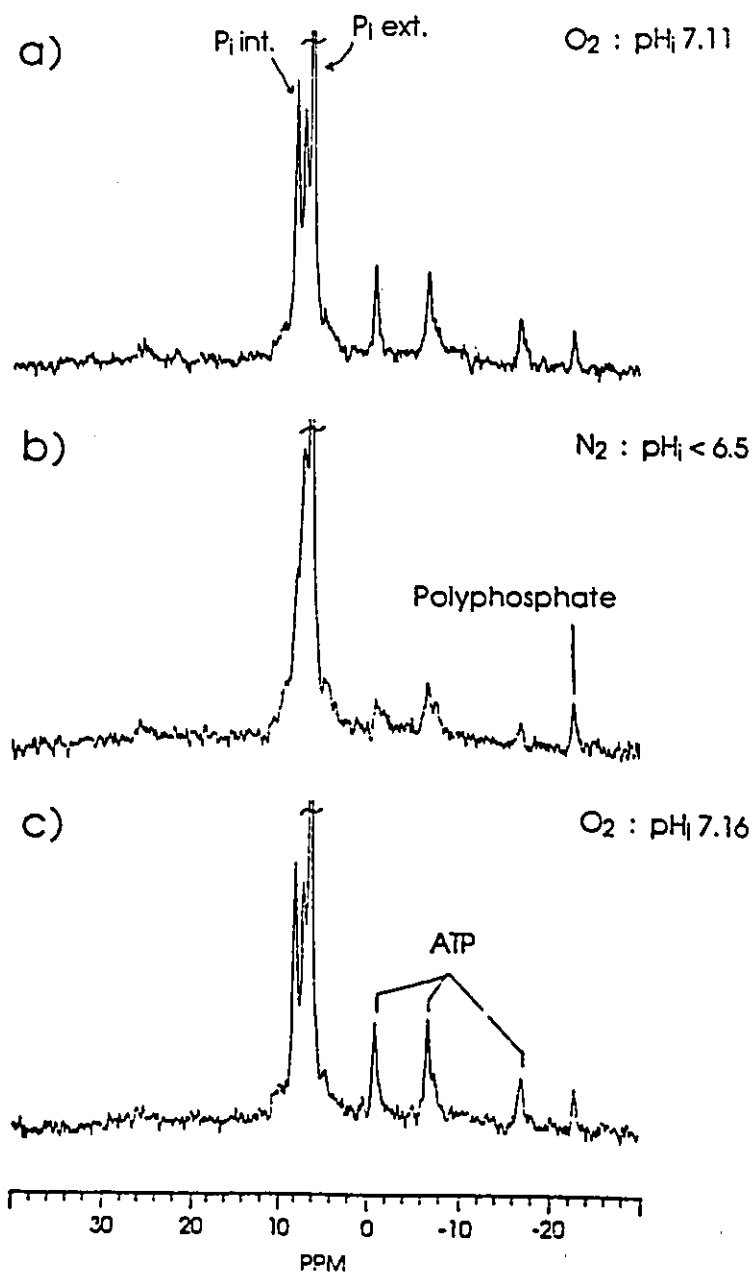


FIG. 5.4. Effet de l'oxygénation sur le pH intracellulaire.

Les détails sont mentionnés dans le texte.
(FS: 145.81 MHz; AP: 60°; TR: 1.0 sec. ; NA : 900;
ER: 15 Hz; DW; voir annexe)

car la largeur des raies de l'ATP (surtout celles des groupements phosphates en position β et γ) augmente lorsque le pH décroît. Le pH_i diminue à une valeur inférieure à 6.5 dès la substitution de l'oxygène à l'azote. Comme Lloyd *et al.* (1983) l'ont aussi noté, les cellules survivent sans problème plusieurs heures dans ces conditions de totale anoxie. Au cours de l'expérience illustré à la Figure 5.4, la période d'anoxie fut restreinte à 1 heure. La Figure 5.4c montre le spectre acquis immédiatement après le retour à l'oxygène. Le pH_i et le niveau d'ATP sont rétablis dès l'oxygénation du milieu de perfusion.

Nous avons perfusé les amibes emprisonnées dans des fibres d'agarose à des débits variant entre 0 et 12 ml/min. Des spectres de phosphore ont été accumulés à intervalles réguliers afin d'observer les changements dans le niveau d'ATP et de suivre le pH_i . Aucune variation notable du pH_i n'a été observée sauf à des débits inférieurs à 1 ml/min. Ces résultats nous laissent penser que, même à faible débit, l'apport d'oxygène est adéquat. Un débit de 8 ml/min a été utilisé pour les expériences avec les fibres d'agarose (tube RMN de 15 mm) et de 12 ml/min pour celles avec les fibres de dialyse (tube RMN de 20 mm). Le pH du milieu extracellulaire augmente significativement tout au long de la perfusion. Cette augmentation du pH est causée par la libération d'ammoniaque dans le milieu de culture par les cellules (Section 6.3.5).

Comme nous allons le voir plus loin, les expériences de perfusion avec des produits enrichis en ^{13}C ont montré que les cellules peuvent rapidement métaboliser le pyruvate et l'acétate. Par contre, le glucose n'est en général que lentement consommé. Nous pensons que dans les conditions de perfusion utilisées, le métabolisme des cellules s'apparente davantage à celui de cultures en phase stationnaire plutôt qu'à des cultures en phase logarithmique.

Le milieu utilisé pour la perfusion n'est sûrement pas sans effet sur le comportement métabolique des cellules. Pour évaluer l'efficacité du système, nous avons perfusé des cellules durant plus de 24 heures avec du milieu OGM normal. Ensuite, le milieu fut échangé pour du milieu OGM 1/2 et un spectre RMN de ^{31}P fut acquis. Le spectre obtenu, présenté à la Figure 5.5, se compare très favorablement avec les spectres acquis immédiatement après le début des perfusions. Avec les deux techniques décrites, nous avons régulièrement maintenu sous perfusion des amibes trophozoïtes pour des périodes supérieures à 48 heures sans aucune difficulté.

5.4. Détermination du pH intracellulaire

Le pH intracellulaire est rapproché d'un pK_a du phosphate inorganique ($\text{H}_2\text{PO}_4^- \rightleftharpoons \text{HPO}_4^{2-} + \text{H}^+ : \text{pK}_a = 7.21$). Conséquemment, le déplacement chimique de la raie de P_i est très sensible aux variations de pH. Malheureusement, le déplacement chimique est aussi sensible à la composition du milieu particulièrement à celle des ions divalents. Pour

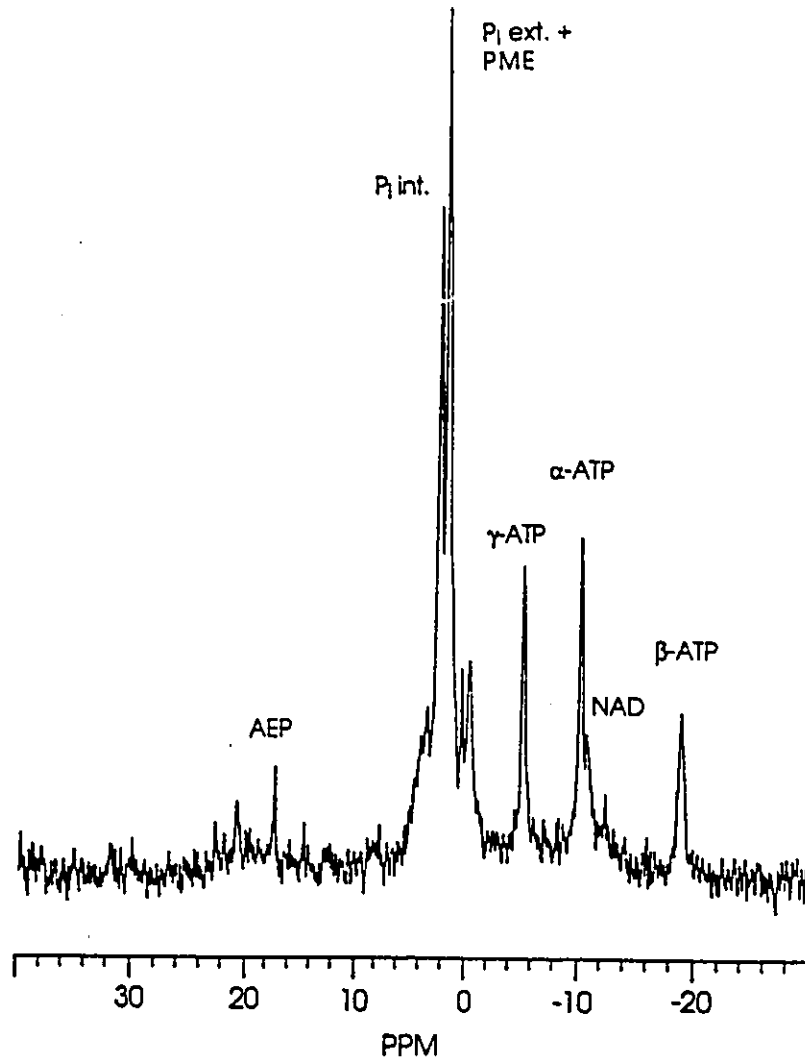


FIG. 5.5 Spectres de cellules après 24 heures de perfusion.

(FS: 145.78 ; AP: 60°; TR: 1.0 sec.; NA : 1800;
ER: 10 Hz; DW)

cette raison, la spectroscopie RMN est très sensible à de faibles variations de pH mais ne permet pas aisément de déterminer de valeur absolue précise.

La courbe d'étalonnage utilisée pour l'estimation du pH a été effectuée avec une solution contenant 1.0 mM de Na_2HPO_4 , 0.5 mM d'ATP, 120 mM de KCl, 2.0 mM de MgCl_2 , 10 mM de tampon PIPES et 5% de D_2O . Le pH, mesuré à la température de la pièce, est ajusté entre 5.5 et 8.0 et une série de spectres de ^{31}P est accumulée en présence d'un capillaire d'aminométhylphosphonate, servant de référence externe. La courbe d'étalonnage est construite en utilisant la raie de α -ATP, relativement insensible aux variations de pH, comme référence interne. La Figure 5.6 montre la relation obtenue entre le pH et le déplacement chimique du phosphate inorganique. La courbe peut être décrite par l'équation polynomiale suivante:

$$\text{pH}_i = -1066.02 + 269.977 \Delta\delta - 22.6883 \Delta\delta^2 + 0.63660 \Delta\delta^3$$

où $\Delta\delta$ est la différence de déplacement chimique entre la raie de P_i et de l' α -ATP. Bien que le déplacement chimique des raies soit sensible à la température, l'équation utilisée, est valide pour des températures situées entre 4 et 36°C.

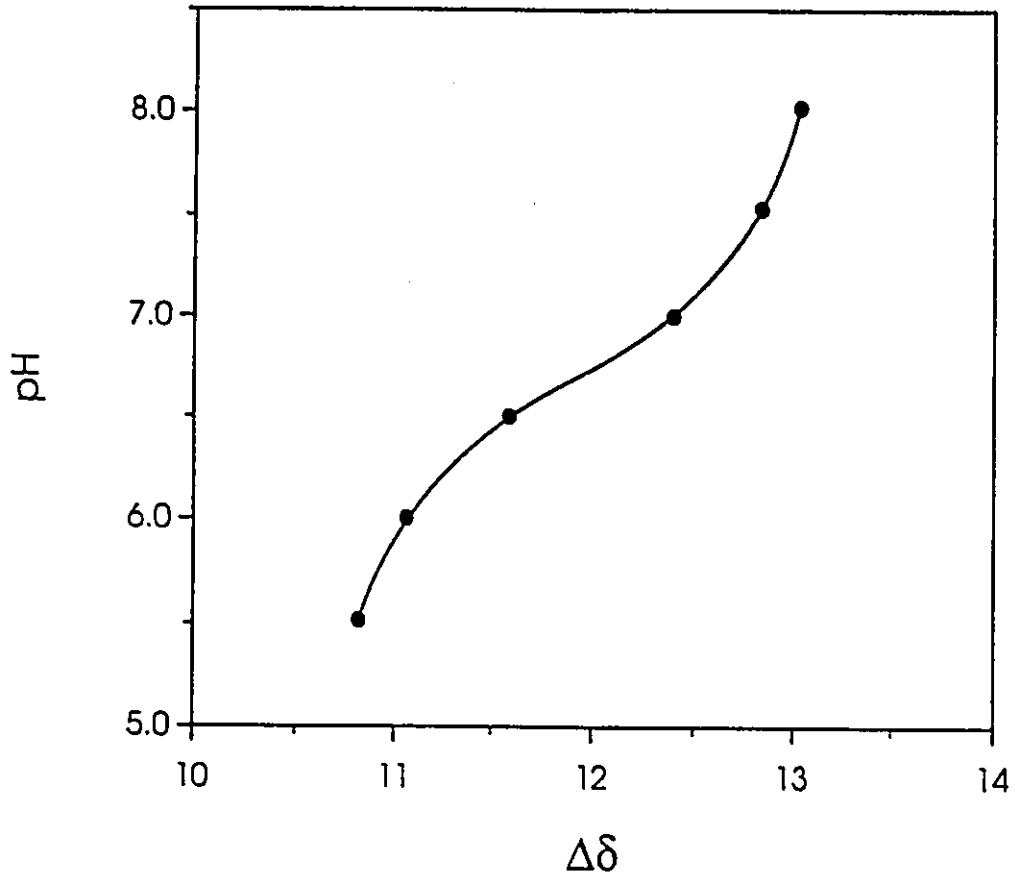


FIG. 5.6. Courbe d'étalonnage utilisée pour la détermination du pH intracellulaire.

CHAPITRE 6

L'INITIATION DE L'ENKYSTEMENT CHEZ *ACANTHAMOEBA CASTELLANII*

6.1 Introduction

Acanthamoeba castellanii est un modèle intéressant pour l'étude du mécanisme de la différenciation cellulaire. Cet organisme possède des capacités d'osmorégulation, de différenciation et d'endocytose, propriétés qui se retrouvent chez les organismes supérieurs. Ainsi, plusieurs parallèles peuvent être tracés avec le mécanisme de différenciation chez les cellules de mammifères.

L'enkystement des amibes survient lorsque les conditions de croissance et de division ne sont plus favorables. Dans la nature, les conditions responsables ou susceptibles d'initier l'enkystement sont la déshydratation, les concentrations élevées en sels (Band, 1963), une diminution de la tension d'oxygène (Byers *et al.*, 1969) et les changements de pH (Neff *et al.*, 1964). Il est difficile de savoir si une seule ou plusieurs de ces conditions doivent être simultanément présentes pour l'induction de l'enkystement. D'autre part, chaque substance agit-elle selon son propre mécanisme ou existe-t-il un mécanisme commun d'induction de l'enkystement?

Dans ce chapitre, nous avons tenté d'aborder ces questions. Comme Byers (1979) l'a noté, le comportement des amibes envers certaines substances peut varier avec le temps. Les résultats obtenus doivent donc être interprétés avec précaution.

6.2 Techniques d'enkystement

En culture, les souches *Acanthamoeba* peuvent parfois et sans aucune raison apparente, s'enkyster spontanément à l'arrivée de la confluence. A l'opposé, elle peuvent refuser de répondre à un inducteur reconnu tel que les sels de magnésium. Afin d'obtenir une souche pouvant s'enkyster de manière consistante, les cellules ayant une réponse positive au stimulus d'induction ont été sélectionnées de la façon suivante: les cellules ayant atteint la phase stationnaire sont enkystées par l'ajout de 25 - 50 mM (concentration finale) de sulfate de magnésium. Au début de la sélection, les taux d'enkystement obtenus étaient inférieurs à 10%. Trois jours après l'induction, les cellules non enkystées meurent et se désagrègent. Les cultures sont entreposées à température de la pièce et sans agitation pour une période de 2 semaines. Ces cultures, ne contenant que des kystes matures, sont utilisées pour en semer de nouvelles. Les nouvelles cultures sont à leur tour enkystées et ainsi de suite. Après plusieurs cycles d'enkystement-déenkystement, nous avons réussi à sélectionner une souche d'amibes ayant un taux de réponse élevé en présence de Mg^{2+} . Dans ces cultures,

le rapport kyste-trophozoite peut facilement atteindre 90%, 36 heures après induction, lorsque les conditions d'enkystement sont bien contrôlées. Durant le processus, de 30 à 50% des cellules semblent se désagréger et disparaissent complètement. La perte cellulaire est reliée à la concentration de la culture et augmente rapidement avec celle-ci.

Les souches de cellules sélectionnées sont conservées à l'aide de la méthode décrite dans la Section 3.3. Les souches perdent souvent, après plusieurs transferts, leur facilité d'enkystement. Afin d'assurer la constance dans les caractéristiques des cultures utilisées, de nouvelles cultures ont été inoculées périodiquement à partir des souches congelées.

Dans nos études, l'effet de deux inducteurs a été étudié de façon plus approfondie: le Mg^{2+} et le DMSO. Des techniques ont été élaborées afin d'obtenir un taux élevé d'enkystement de façon contrôlée et reproductible. Un enkystement synchronisé des cellules est obtenu en manipulant les conditions de culture de façon appropriée. Les cellules provenant de cultures en début de phase statonnaire sont transférées dans un milieu de composition appauvrie (OGM 1/2) exempt de glucose, pour une période de 6 à 12 heures. Ce milieu, qui ne supporte pas la croissance cellulaire, permet d'obtenir un taux plus élevé d'enkystement et une meilleure synchronisation. Pour de bons résultats, la concentration cellulaire ne doit pas être supérieure à 8×10^6 cellules/ml. Après quelques heures d'incubation, les cellules multinuclées

disparaissent du milieu. Selon Pigon (1972), l'accumulation d'une substance non-identifiée dans le milieu de croissance serait à l'origine de la formation des cellules possédant plusieurs noyaux. Comme plusieurs autres groupes (Byers, 1979), nous pensons que les cellules doivent se trouver dans une phase spécifique du cycle de croissance-division pour s'enkyster. En présence d'un inducteur, les cellules doivent parcourir le cycle cellulaire jusqu'à ce stade afin d'entrer dans le cycle d'enkystement. Il est probable que certains inducteurs ou certaines conditions empêchent les cellules d'atteindre cet état, de sorte qu'elles ne peuvent répondre adéquatement au stimulus. L'incubation des cellules dans le milieu appauvri semble immobiliser les cellules toutes au même endroit dans le cycle de croissance-division. L'induction synchronisée de l'enkystement est provoquée par l'addition de $MgSO_4$ (25 à 50 mM finale) et une élévation simultanée du pH à une valeur de 7.2 - 7.4 unités. La seconde méthode d'induction consiste à transférer les cellules dans le milieu inorganique Na-PIPES (Tableau 3.3) contenant 0.5% de DMSO. Bien que le Mg^{2+} soit efficace en milieu inorganique et que le DMSO puisse agir en milieu OGM 1/2, le taux d'enkystement qu'ils génèrent est largement supérieur lorsqu'ils sont utilisés de la façon décrite ci-haut.

6.3 Modifications métaboliques

6.3.1 Introduction

Les tentatives d'induction de l'enkystement effectuées sur des cultures de cellule à différents stades de croissance nous ont clairement démontré que l'enkystement ne peut être initié de façon significative que lorsque les cellules ont atteint la phase stationnaire. En effet, l'ajout de Mg^{+2} (20 à 50 mM) aux cultures en phase logarithmique n'induit que peu d'enkystement (<30%) alors que le taux d'enkystement devient important après le passage à la phase stationnaire. Nous avons donc comparé le métabolisme des amibes durant les différents stades de croissance. Pour cette étude, l'organigramme de travail illustré à la Figure 6.1 a été appliqué. Les techniques d'analyse utilisées sont décrites dans les Chapitres 3 et 4.

6.3.2 Courbe de croissance

La Figure 6.2 nous montre une courbe de croissance typique de cellules en culture. Après une courte période de latence, la culture montre une augmentation logarithmique de la densité cellulaire. Contrairement aux courbes de croissance habituellement observées chez *Acanthamoeba castellanii*, les courbes obtenues avec nos souches sélectionnées présentent un double plateau plus ou moins prononcé à la phase stationnaire. La différence de densité entre les deux plateaux varie entre 5 et 30% selon les

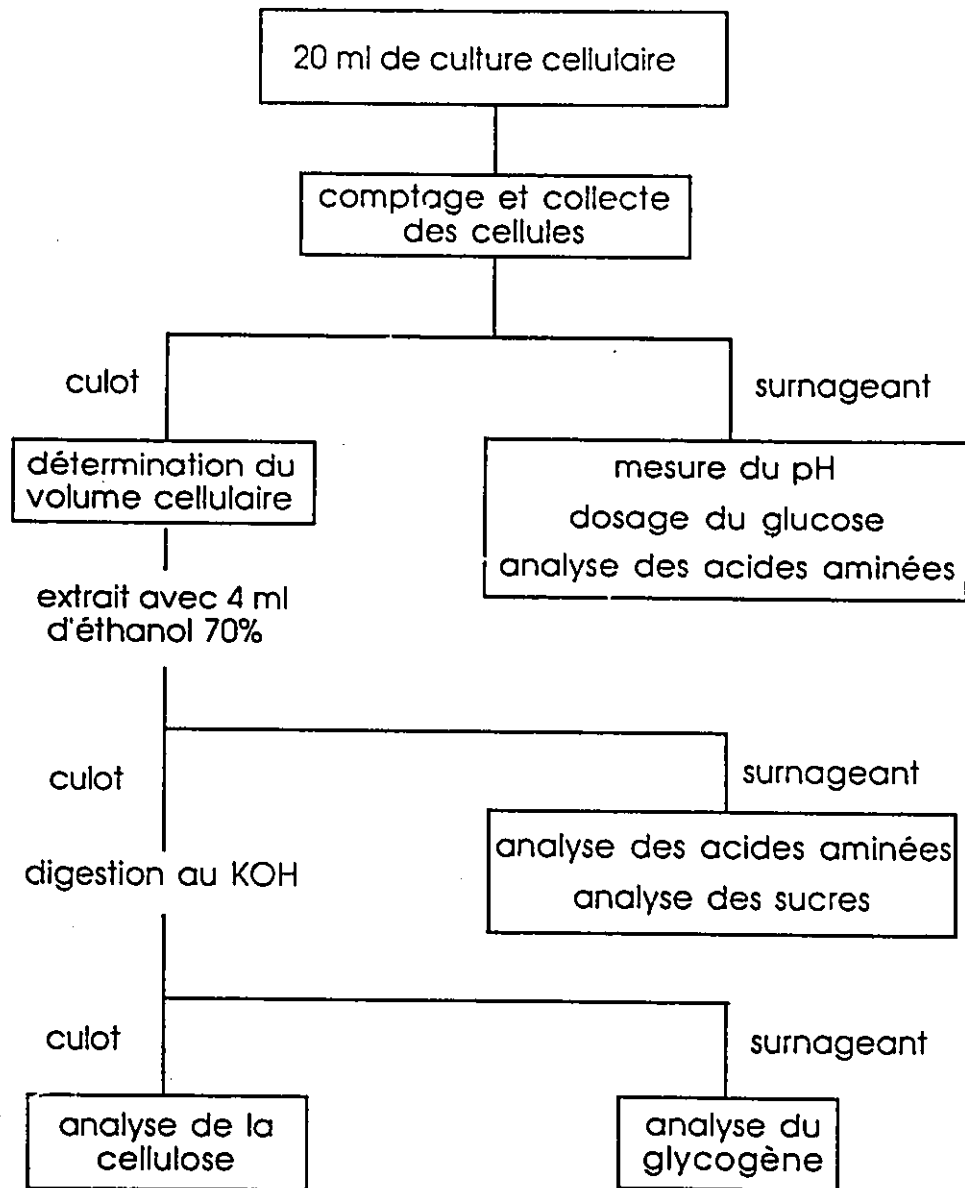


FIG. 6.1. Organigramme d'analyse de la composition cellulaire et du milieu de culture.

Les techniques d'analyse employées sont décrites dans les Chapitres 3 et 4.

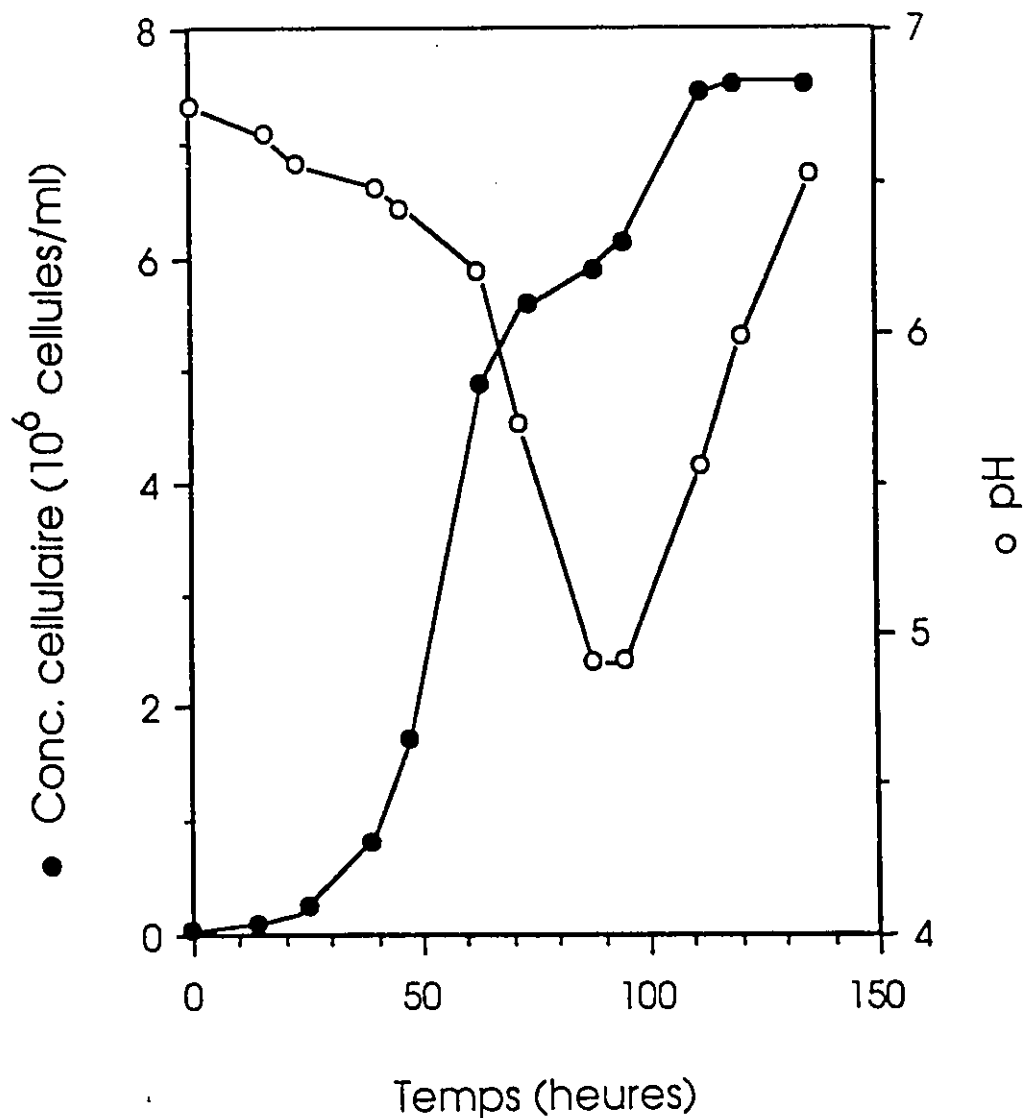


FIG. 6.2. Courbe de croissance et fluctuations du pH du milieu d'une culture typique.

Les cellules sont cultivées dans un flacon à bas profil de 2.5 l contenant 600 ml de milieu de culture. Les détails sont décrits à la Section 3.1.

expériences. Cette caractéristique inattendue fut fréquemment observée dans nos expériences. Nous n'avons cependant pu expliquer de manière définitive la raison de l'allure générale de cette courbe. Deux hypothèses ont été émises. Une première possibilité est qu'un certain nombre de cellules ayant atteint le plateau s'adaptent à l'environnement et recommencent à se diviser jusqu'à ce qu'ils se heurtent à un nouveau facteur limitant. Une seconde possibilité est la présence dans la culture, d'amibes possédant des génotypes différents. Si nous supposons la présence d'un premier type d'amibe plus sensible aux facteurs limitant la croissance qu'un second type, nous aurions alors une courbe de croissance qui serait la somme des deux courbes individuelles. Chaque courbe atteignant un plateau à un temps différent, nous obtenons alors une courbe exponentielle biphasée telle qu'observée dans nos cultures.

Chez les levures *Saccharomyces cerevisiae*, des cinétiques de croissance similaires ont été observées (Panek, 1962). Le premier plateau survient lorsque le glucose du milieu de culture est épuisé. Cette période de latence est considérée comme une période d'adaptation durant laquelle les levures changent leur métabolisme en vue de l'utilisation de nouveaux substrats. Durant cette période, il est intéressant de noter que les levures amorcent la synthèse de tréhalose, tout comme chez *Acanthamoeba*. Il est fort probable que le premier plateau observé chez *Acanthamoeba castellanii* corresponde aussi à une période d'adaptation. Comme nous le verrons dans

les prochaines sections, plusieurs changements métaboliques coïncident avec cette période.

6.3.3 Métabolisme des hydrates de carbone

La consommation de glucose est maximale au tout début de la croissance. Les valeurs initiales obtenues, imprécises dû à la faible concentration cellulaire, se situent aux environs de $0.3 \mu\text{mole}/10^6$ cellules/heure. La consommation diminue cependant rapidement et se stabilise à une valeur approximative de $0.1 \mu\text{mole}$ de glucose à l'approche de la phase stationnaire. A la fin de la croissance, la consommation aura encore diminué jusqu'à environ $0.06 \mu\text{moles}$ de glucose/ 10^6 cellules/heure.

Dans nos conditions expérimentales, il est difficile de récolter suffisamment de cellules pour mesurer le niveau de glycogène au début de la phase exponentielle de croissance. Au milieu de celle-ci, les quantités atteintes exprimées en équivalents de glucose, sont de l'ordre de 350 ± 50 fmoles cellule⁻¹ ($n = 4$). Cette valeur correspond à 8 - 12% du poids sec cellulaire. A l'amorce de la phase stationnaire, les réserves de glycogène décroissent de façon continue à un rythme d'environ 25 fmoles cellule⁻¹ par jour. Les cellules semblent suppléer à une diminution de glucose par la dégradation des réserves de glycogène. Nous pensons que cette diminution résulte principalement du ralentissement des processus d'endocytose observés à la phase stationnaire (Chambers et Thompson, 1976) plutôt qu'à la baisse de la

concentration de glucose qui n'est que de 30 à 40%.

Lors de la transition d'une phase à l'autre, Gessat et Jantzen (1974) ont noté une élévation transitoire d'un facteur de 2 à 3, de la concentration en AMP_c . Il est bien connu que l'activité d'une variété d'enzymes est modulée par les changements de répression catabolique produits par le passage des cellules de la phase logarithmique à la phase stationnaire. Chez les microorganismes procaryotes, la plupart sinon tous les systèmes agissent en fonction de la disponibilité du glucose via un système régulateur sous le contrôle de l' AMP_c (Panek et Mattoon, 1977). Le niveau d' AMP_c reste faible tant que l'apport en glucose est suffisant. Lorsque celui-ci diminue, la concentration d' AMP_c augmente et induit la transcription de messages génétiques permettant l'utilisation de sources d'énergie autres que le glucose (Lehninger, 1975). L' AMP_c est ainsi directement impliqué dans le contrôle de la synthèse et la dégradation du glycogène (White et al., 1978). Comme nous l'avons mentionné au cours de ce chapitre, le métabolisme des hydrates de carbone chez *Acanthamoeba* est en plusieurs points comparable à celui des champignons (levures et moisissures). Il est possible que le système régulateur soit aussi sous le contrôle de l' AMP_c .

L'analyse par CLHP des sucres provenant d'extraits cellulaires, nous a permis de détecter la présence de sucres et de polyols. Le glycérol, l'érythritol, l'arabitol et le mannitol sont présents mais en faibles quantités (< 0.2

fmole/cellule). A part le mannitol, deux autres hexitols sont présents à des concentrations inférieures à 2 fmoles/cellule. Dû au nombre de composés possédant un temps de rétention similaire dans cette zone (Tableau 4.3), la chromatographie ne permet pas une identification positive de ces composés. La RMN de ^{13}C confirme la présence de polyols dans les cellules mais n'est pas plus explicite quant à leur nature. La similarité du métabolisme d'*Acanthamoeba* avec celui des levures laisse envisager la présence de sorbitol et de dulcitol (Touster et Shaw, 1962).

Le mannitol se retrouve chez les algues, les lichens, les plantes supérieures et aussi chez les champignons (levures et moisissures). Chez ces derniers, le mannitol est considéré comme étant un produit de réserve, et coexiste souvent avec le tréhalose et le glycogène. Il se retrouve habituellement en quantité importante dans les spores de champignons (Lewis et Smith, 1967). Les concentrations de ces produits sont souvent reliées, la diminution d'un de ces produits entraînant généralement l'augmentation d'un autre (Lewis et Smith, 1967). Dans nos cultures, les niveaux de mannitol détectés sont très faibles (inférieurs à 0.2 fmole/cellule). Ce n'est donc pas un produit de réserve activement utilisé chez *Acanthamoeba castellanii*, du moins dans nos conditions de culture. Comme l'ont démontré Dukena *et al.* (1985), les conditions de culture tels que la nature de la source de carbone, le degré d'aération et la composition de milieu de culture ont des

effets prononcés sur l'importance des réserves de polyols.

Outre le maltose et le tréhalose, seul le glucose est présent en concentration importante (1 à 5 fmoles/cellule) dans les cellules végétatives. Il est difficile de déterminer la proportion de glucose présent dans les extraits provenant du milieu de culture emprisonné dans les vacuoles cellulaires. Quoiqu'il en soit, le glucose est toujours présent mais en quantité de 2 à 3 fois inférieure, après le transfert des cellules dans le milieu OGM 1/2 ne contenant pas de sucre. Le tréhalose, le sucre principal des kystes, est présent en quantité appréciable (30 - 40 fmoles/cellule; $n = 4$) dans les cellules au début de la phase de croissance logarithmique. Le tréhalose devient difficilement détectable à l'approche de la phase stationnaire, mais sa concentration augmente de nouveau à la phase stationnaire. Les valeurs détectées peuvent atteindre 8 - 10 fmoles/cellule. Jusqu'alors, la présence de tréhalose n'avait été détectée en quantité appréciable que chez la forme dormante des amibes (Deslauriers *et al.*, 1980a). Le maltose devient nettement visible à la phase stationnaire. Sa concentration peut alors atteindre des valeurs proches de 20 fmoles/cellule. Le maltose est le produit de dégradation du glycogène. Dans nos expériences, sa présence est toujours associée à celle du tréhalose.

Les concentrations de tréhalose visible dans les cellules restent faibles en comparaison avec celles observées chez les kystes matures. Chez les levures, la substitution du glucose

par le maltose dans le milieu de culture stimule la production de tréhalose (Panek et al., 1978). Nous avons fait croître *Acanthamoeba castellanii* sur du maltose afin de voir si l'accumulation de tréhalose était possible lors de la croissance. La Figure 6.3a montre la courbe de croissance obtenue lors de cette expérience. Elle ne diffère aucunement de celle obtenue lorsque le glucose est utilisé comme source de carbone. La vitesse de consommation du maltose (exprimée en $\text{g}/10^6$ cellules) est aussi comparable à celle du glucose. Le maltose constitue donc une aussi bonne source de carbone que le glucose pour les amibes, tels que l'avait déjà constaté Adam et Blewett (1967). La Figure 6.3b montre les concentrations de maltose et de tréhalose présentes dans les amibes. La courbe du tréhalose est toujours légèrement décalée par rapport à celle du maltose. Cette constatation s'adapte bien avec l'hypothèse que la concentration de tréhalose est intimement liée à celle du maltose durant cette phase de croissance. Les concentrations de tréhalose dans les kystes matures atteignent 100 - 120 fmoles/cellule. Les résultats montrent que le système enzymatique de synthèse du tréhalose est fonctionnel durant tous les stades de la croissance. Selon Panek et al. (1978), le maltose stimule la synthèse de tréhalose alors que la présence de glucose aurait un effet inhibiteur. Il propose la présence d'une α -glucosidase qui pourrait séparer les unités glycosyles du maltose sans libérer de glucose fermentable dans le cytoplasme. Les auteurs n'excluent pas la possibilité que la

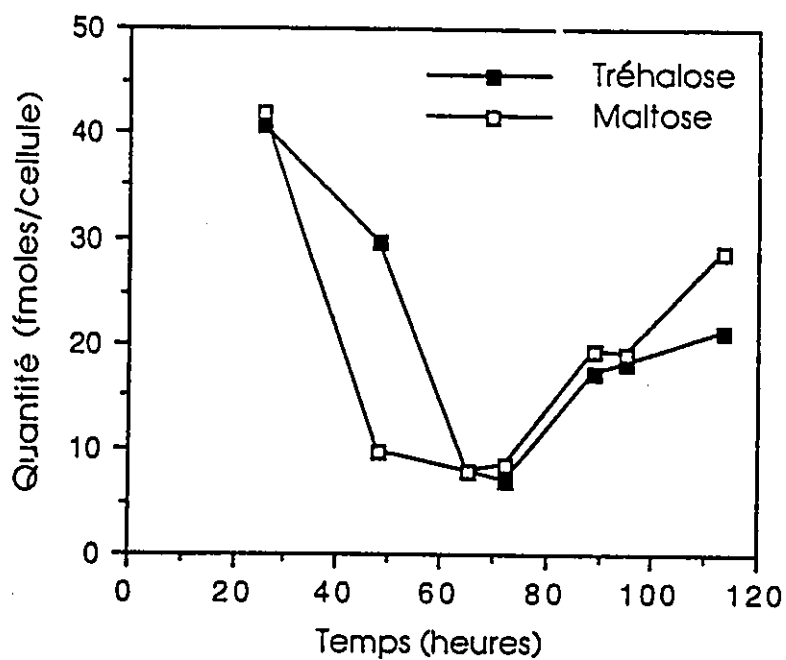
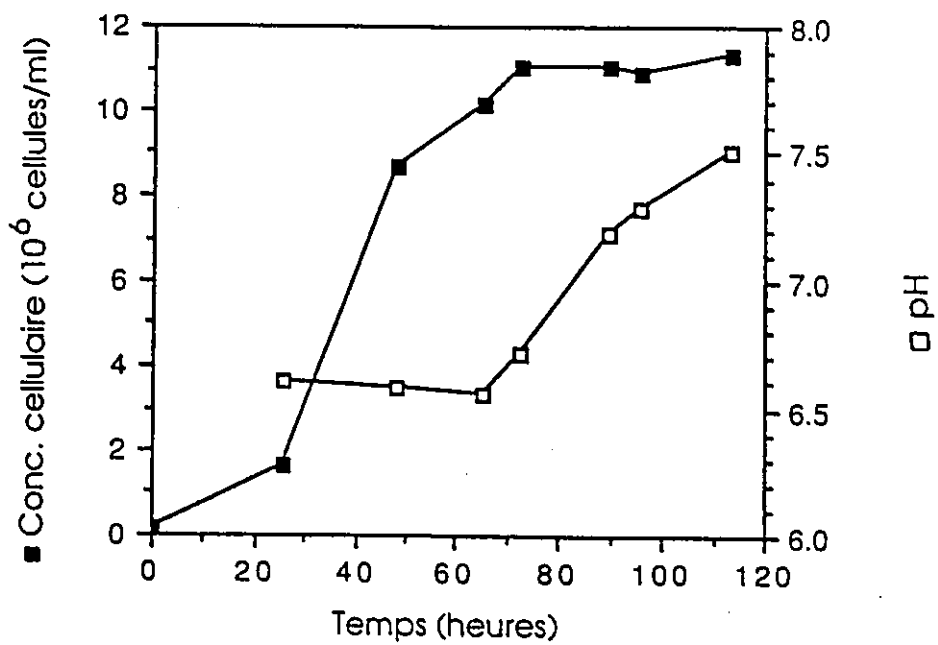


FIG. 6.3. a) Courbe de croissance sur maltose et b) Niveau des sucres intracellulaires.

Les détails sont mentionnés dans le texte.

même enzyme possède les capacités d'une tréhalose synthétase, ce qui en fait lui conférerait le nom de glycosyle transférase. L'effet inhibiteur du glucose, la faible concentration intracellulaire de maltose et la dégradation rapide du tréhalose sont des facteurs possiblement responsables de la faible concentration intracellulaire de tréhalose dans les cultures utilisant le glucose.

6.3.4 Métabolisme des acides aminés

Chez les cellules de mammifères, les acides aminés peuvent être classifiés en deux catégories. Certains acides aminés peuvent être convertis en phosphoénolpyruvate, via leur transformation en pyruvate ou en certains intermédiaires du cycle de Krebs. Ces acides aminés peuvent ainsi être utilisés à la synthèse du glucose et du glycogène et sont dits glycogéniques. D'autre part, la dégradation de d'autres acides aminés induit la formation d'acétyl-CoA, précurseur des corps cétoniques tels que l'acétone et l'acétoacétone. Ces acides aminés sont dits cétogéniques. Certains acides aminés sont à la fois cétogéniques et glycogéniques chez les mammifères. Chez les plantes et les microorganismes, aucune distinction ne peut être effectuée entre les deux classes d'acides aminés, puisque tous les acides aminés peuvent ultimement contribuer à la formation de glucose via une série de réactions impliquant le cycle de Krebs et la voie du glyoxylate (Lehninger, 1979). Bien que les microorganismes tendent à synthétiser plutôt qu'à cataboliser les acides

aminés, ceux-ci peuvent être utilisés comme source d'énergie lorsque l'approvisionnement en substrats devient limitant.

Le Tableau 6.1 montre les niveaux d'acides aminés dans le milieu de culture lors d'une expérience de croissance typique ($n = 5$). Dans le milieu de culture OGM, les acides aminés essentiels (Adam, 1964; Adam et Blewetts, 1967; Dolphin, 1976) ne sont pas tous consommés de façon significative. La concentration en glycine est constante tout au long de la croissance. La glycine est un acide aminé essentiel lorsque l'acétate est utilisé comme source de carbone, mais non essentiel lorsque le glucose est le substrat. La sérine et la thréonine ne montrent qu'une faible diminution ($\sim 20\%$) de leur concentration. L'arginine est produite en quantité significative lors de la phase de croissance logarithmique. La leucine et l'isoleucine, deux acides aminés essentiels, de même que la lysine et la phénylalanine sont utilisées intensivement. La définition d'acide aminé "essentiel" est de toute évidence fonction de la composition du milieu de culture.

L'acide glutamique est consommé pendant tout le processus de croissance, alors que la proline est produite de façon presque stoechiométrique. L'alanine est relâchée de façon abondante durant la phase logarithmique mais non à la phase stationnaire où elle est consommée. La consommation ou la production de plusieurs acides aminés peut être distinctement reliée à la phase de croissance d'*Acanthamoeba castellanii*.

TABLEAU 6.1. Concentration en acides aminés présents dans le milieu de culture.[‡]

Acide aminé	Temps (heures)					
	0.00	23.83	58.00	78.50	101.50	119.50
Ala	3.02	3.29	7.12	6.70	4.70	3.20
Arg	0.65	0.90	1.01	1.08	0.90	0.89
Asn	0.75	0.89	0.65	0.65	0.52	0.39
GABA	0.15	0.15	0.17	0.73	0.47	0.53
Gln	0.19	0.40	0.48	0.47	0.48	0.32
<u>Gly</u>	1.47	1.47	1.40	1.47	1.48	1.47
Glu	3.45	3.30	2.56	2.63	1.91	1.19
Hyp	0.04	0.14	0.44	0.57	0.55	0.55
<u>Ile</u>	0.96	1.44	0.82	0.74	0.56	0.40
Leu	2.56	2.85	2.23	2.00	1.37	0.81
Lys	0.85	0.90	0.72	0.53	0.28	0.18
Met	0.32	0.48	0.38	0.25	0.16	0.09
Orn	0.22	0.20	0.16	0.12	0.03	0.02
<u>Phe</u>	1.00	1.14	0.88	0.74	0.43	0.27
Pro	0.69	1.02	1.56	1.77	1.40	1.09
<u>Ser</u>	1.25	1.38	1.21	1.23	1.07	0.87
<u>Thr</u>	0.80	0.85	0.66	0.72	0.50	0.43
Trp	0.23	0.28	0.34	0.23	0.06	0.05
<u>Val</u>	1.87	1.95	1.58	1.51	1.21	0.85
[Cell.] [†]	0.56	6.41	10.84	11.64	12.73	12.52
pH	6.67	6.82	5.36	6.34	7.09	7.42

[‡]Les valeurs sont en mM.

[†]La concentration cellulaire est exprimée en 10^6 cellules/ml.

Caractères gras soulignés: Acide aminé absolument requis.

Soulignés: Essentiel dans certaines conditions (Section 1.2).

La Figure 6.4 illustre la consommation totale en acides aminés libres, telle que normalement observée dans nos expériences (n = 5). Lorsque la consommation de glucose est maximale, les amibes montrent une consommation globale négative jusqu'à confluence des cellules, principalement à cause du relargage massif d'alanine dans le milieu de culture. A la période de latence, le bilan devient positif, l'alanine étant encore une fois le principal acide aminé affecté. Chez certaines souches de levures, l'AMP_c stimule la consommation d'acides aminés (Foury et Goffeau, 1975) lorsque l'apport de glucose devient insuffisant. Il est possible que le même phénomène se produise chez *Acanthamoeba castellanii*.

La Figure 6.5 montre le comportement typique des acides aminés libres présents en concentration élevée dans les amibes. L'alanine montre un comportement assez particulier. La concentration intracellulaire et extracellulaire en alanine augmente tout au long de la croissance et atteint un maximum au moment où le pH du milieu extérieur est à un minimum (n = 5). Une fois que la culture a atteint confluence, la concentration diminue rapidement. Etant en équilibre avec la concentration de pyruvate, les changements de concentration en alanine semblent refléter l'activité du cycle de la glycolyse. En phase de croissance logarithmique, lorsque les cellules sont en glycogénèse active, la concentration de l'alanine augmente continuellement. A la phase stationnaire, lorsque le glycogène est dégradé, le niveau d'alanine décroît. Une partie de l'alanine synthétisée lors de la phase de croissance

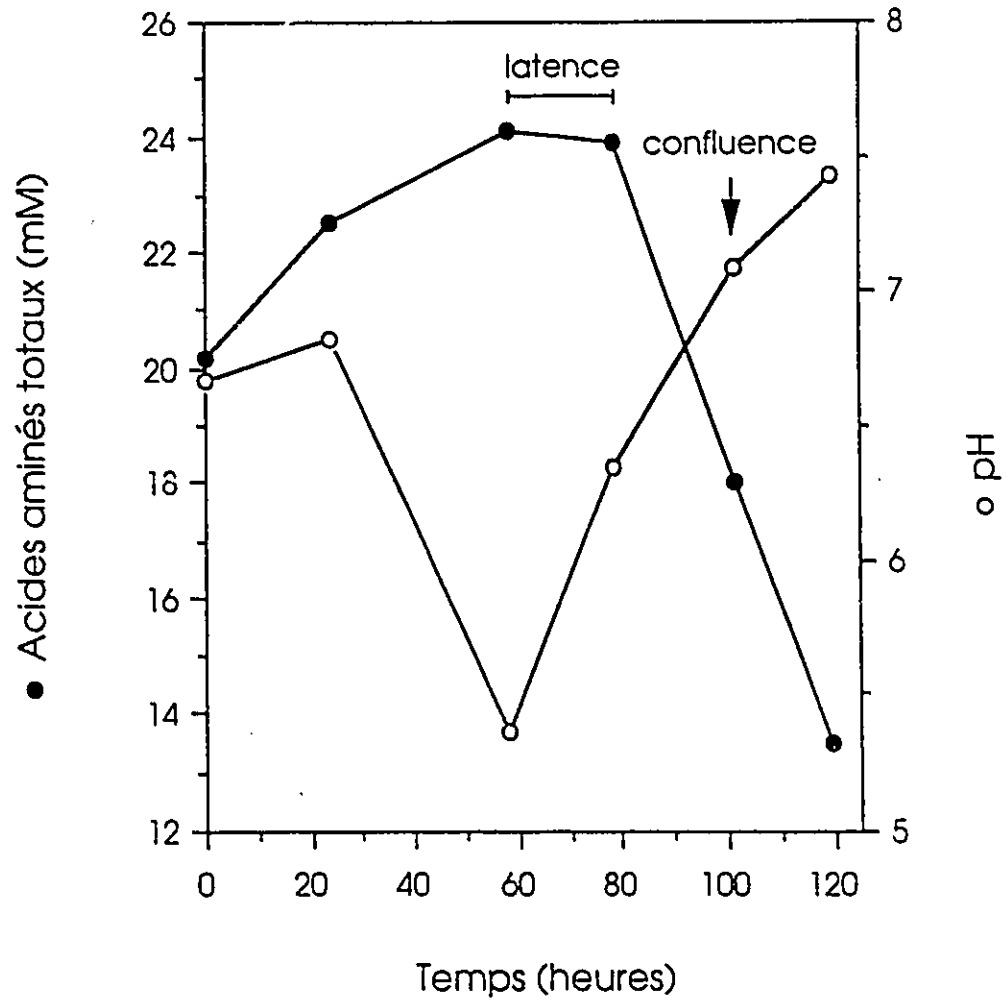


FIG. 6.4. Concentration totale en acides aminés et variation du pH extracellulaire lors de la croissance.

Le pH est au niveau le plus bas lorsque la concentration cellulaire atteint la période de latence.

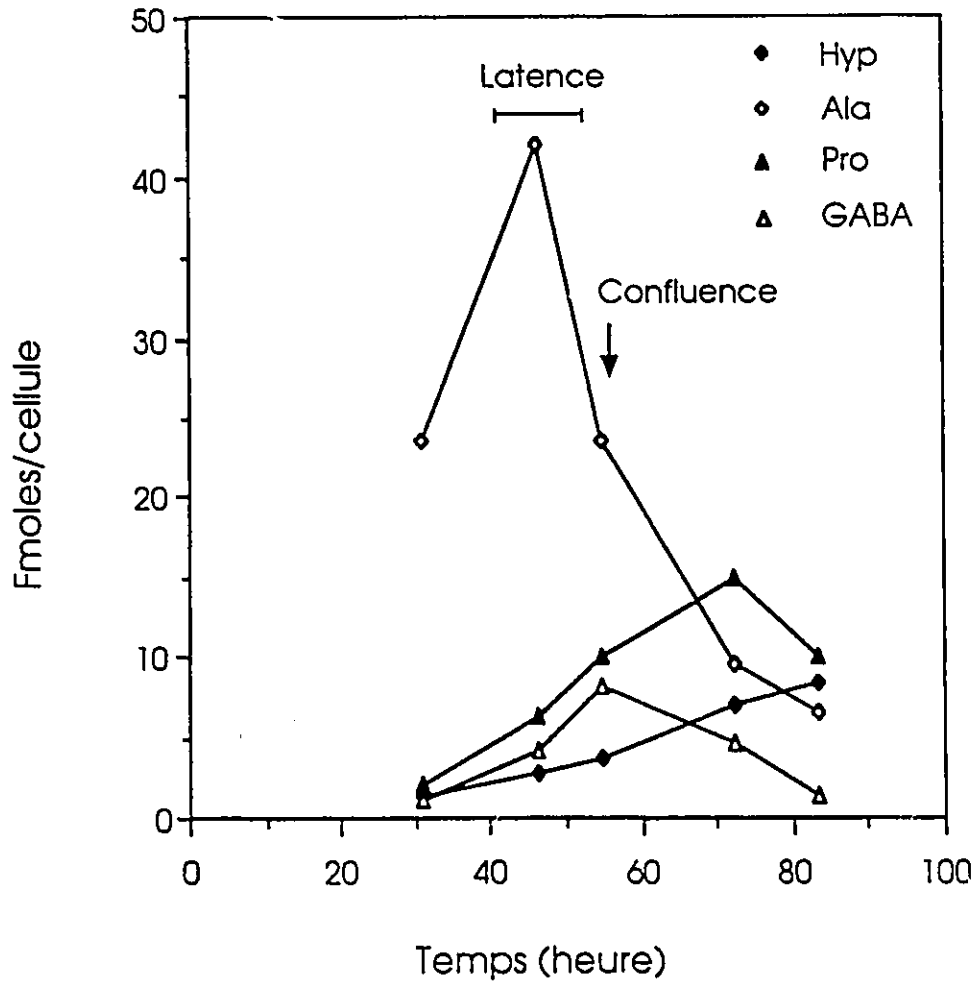


FIG. 6.5. Variation de la concentration des acides aminés intracellulaires d'importance lors de la croissance.

L'alanine est au niveau le plus élevé lorsque le pH extracellulaire est à son plus bas.

est relachée dans le milieu de culture. Après la période de latence, la concentration d'alanine extracellulaire diminue en général parallèlement avec celle intracellulaire.

6.3.5 pH intracellulaire et extracellulaire

Tout au long de la phase de croissance logarithmique, le pH du milieu décroît (Fig 6.2), alors qu'à la période de latence, il commence à augmenter de façon prononcée. Dans certaines cultures, le pH peut passer dans certains cas de 5.0 à 8.5, sans affecter l'intégrité des cellules. Le début de l'augmentation du pH correspond avec le relargage de grandes quantités d'ammoniaque dans le milieu de culture (nos expériences; Neff et al., 1958). Il s'agit d'un des produits majeurs observés sous forme de dérivés *p*-nitrobenzoyles, lors de l'analyse des acides aminés du milieu de culture des cellules en phase stationnaire. Nos résultats suggèrent qu'un changement métabolique majeur des cellules fait que la consommation de glucose diminue en faveur de substrats tels que les acides aminés (voir Sections 6.3.3 et 6.3.4). La première étape du catabolisme de la plupart des acides aminés est l'élimination du groupement α -aminé par transamination ou par oxydation. La dégradation de ces derniers est probablement responsable de la production d'ammoniaque dans le milieu. La Figure 6.5 illustre bien ces propos. Une production d'acides aminés coïncide avec le déclin du pH du milieu de culture alors qu'une consommation induit une alcalinisation du milieu due à la libération d'ammoniaque.

Chez les levures, la présence d'ammoniaque déplace le catabolisme du glucose d'un état productif hautement énergétique (via la glycolyse et le sentier de l'acide citrique) à un état moins effectif, soit le sentier des pentoses phosphates (Stoppani et Ramos, 1978).

Chez les cellules de mammifères, le pH intracellulaire est intimement lié à celui de l'extérieur, l'intérieur étant habituellement de 0.2 à 0.4 unité de pH inférieur (Fellenz et Garweck, 1988). Pour cette raison, nous avons voulu vérifier le comportement des amibes vis-à-vis les changements de pH extérieur. En utilisant notre système de perfusion, nous avons mesuré par RMN du ^{31}P , le pH intracellulaire des cellules en fonction du pH extracellulaire. Pour ce faire, nous utilisons comme marqueur, le déplacement chimique du phosphate inorganique (P_i) intracellulaire, qui est sensible aux variations de pH (Section 5.4). Puisque le déplacement chimique du P_i et des autres constituants est sensible à la concentration et à la composition ionique du milieu, la RMN permet de détecter précisément les variations de pH mais ne permet pas d'obtenir des valeurs absolues précises. La Figure 6.6 montre un extrait de cellules, en présence et en absence d'EDTA. Dans les organismes vivants, la majeure partie de l'ATP et des groupements phosphates est liée à des ions divalents, tels que le magnésium, principal responsable de l'élargissement des raies en RMN de ^{31}P . La Figure 6.7 montre l'effet du pH sur le déplacement chimique des métabolites phosphorylés de la région entre 1 et 4 ppm (Fig. 6.6).

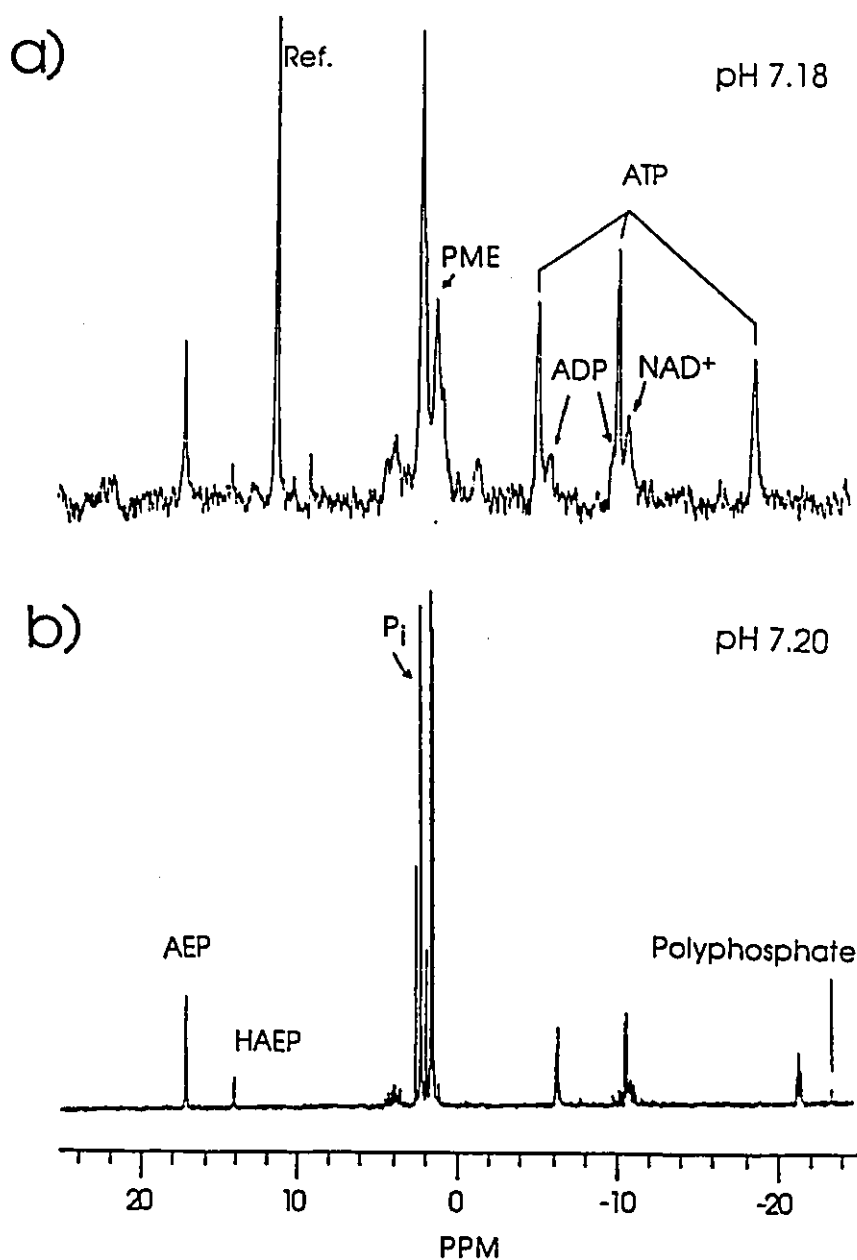


FIG. 6.6. Spectres RMN de ^{31}P d'un extrait de cellules en début de phase stationnaire a) en absence et b) en présence d'EDTA.

Les conditions d'extraction sont décrites à la Section 3.11.1. (FS:145.8 MHz; AP:60°; TR:1.0 s; DW; a) NA:1800; ER:10 Hz; b) NA:2290; ER:-0.5 Hz)

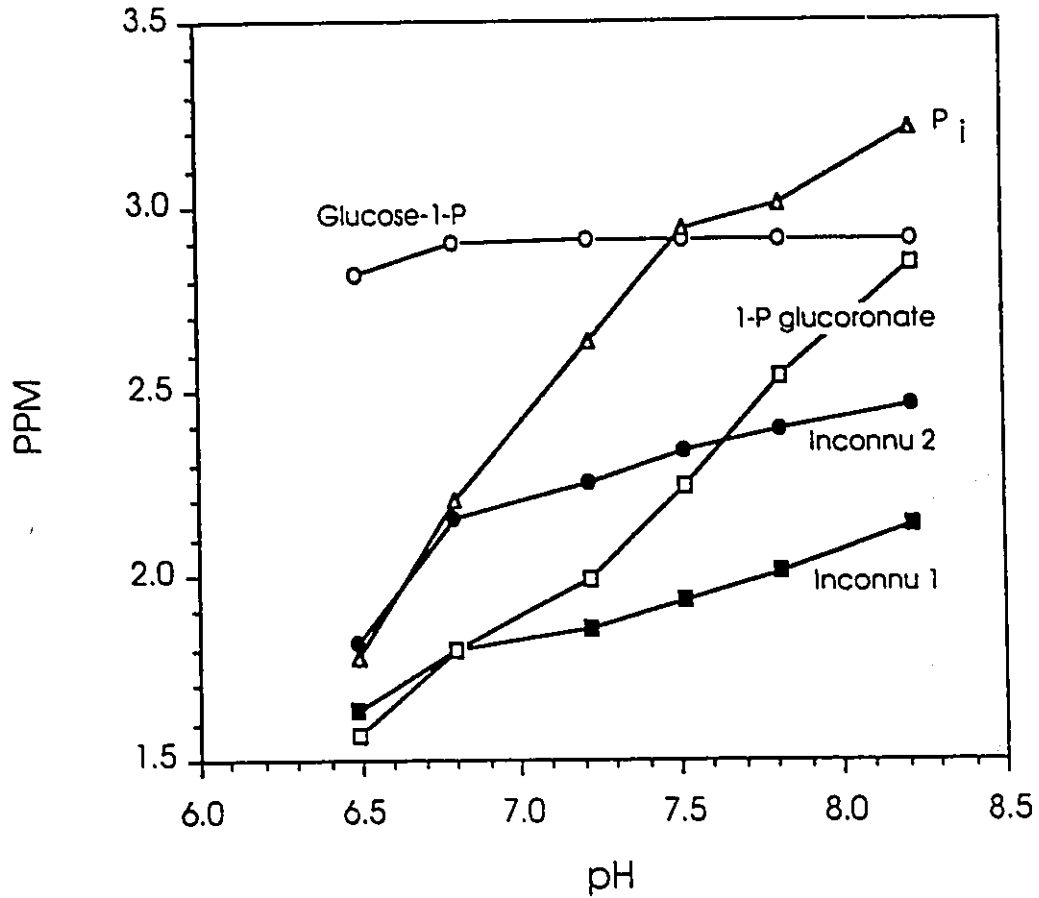


FIG. 6.7. Effet du pH sur le déplacement chimique de quelques constituants visibles en RMN de ^{31}P .

Le graphique illustre l'influence du pH sur le déplacement chimique du phosphate inorganique et de quelques autres des constituants visibles à la Figure 6.6a.

L'attribution des déplacements chimiques composés a été effectuée à partir des résultats publiés par Gadian et al. (1979) et Glanek et Kopp (1985). Cette dernière a été vérifiée par l'ajout de composés purs à l'extrait et par comparaison avec des spectres acquis à différents pH. Les cellules contiennent d'importantes quantités de glucose-1-P, un intermédiaire dans la synthèse du glycogène, de la cellulose et du tréhalose. La quantité de phosphate inorganique présente est beaucoup plus importante que celle retrouvée dans les cellules de mammifères. Elle est cependant comparable à celle retrouvée chez d'autres microorganismes tels que les levures.

La Figure 6.8 présente deux spectres RMN de ^{31}P de cellules encapsulées dans des fibres d'agarose et perfusées au pH indiqué avec du milieu OGM 1/2. Un temps d'équilibration de 15 minutes est laissé entre chaque changement de pH et le début de l'acquisition des spectres. D'après nos mesures, le pH intracellulaire des cellules demeure inchangé bien que celui du milieu extérieur subisse un changement de 4 unités de pH. Des résultats similaires ont été obtenus chez d'autres champignons. Lors d'expériences semblables, Satre et Martin (1985) ont montré que le pH intracellulaire chez *Dictyostelium discoideum* était maintenu à une valeur constante alors que le pH extracellulaire variait entre 5.0 et 7.5. Nos expériences ont révélé que les amibes restent intactes lorsqu'elles sont exposées à du HCl 0.1 N (en absence d'EDTA uniquement) et qu'elles sont lysées par du NaOH 0.1 N. Ces résultats ne sont

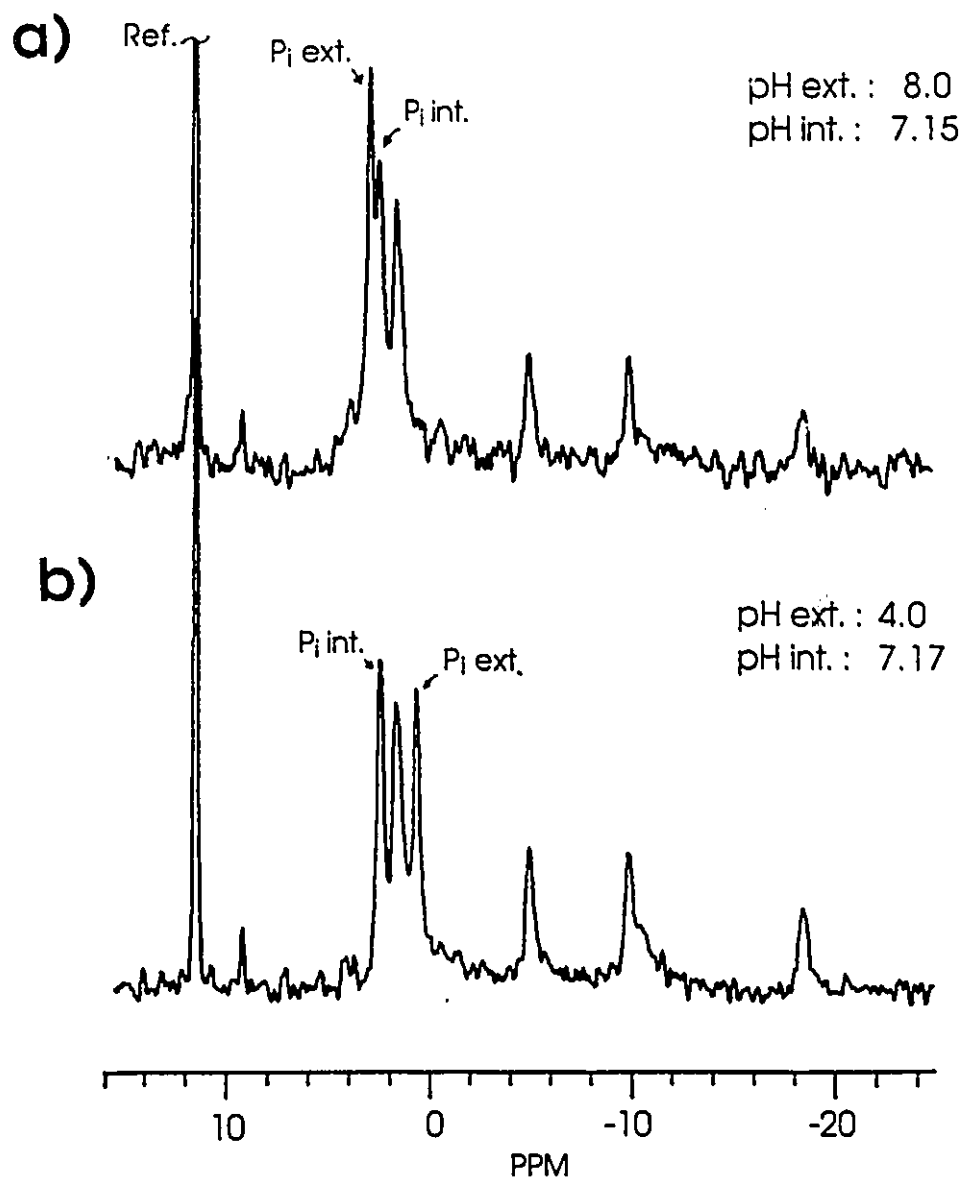


FIG. 6.8. Effet du pH extracellulaire sur le pH intracellulaire d'*Acanthamoeba castellanii*.

Cellules emprisonnées dans des fibres d'agarose et perfusées. (FS: 121.47 MHz; AP: 60°; TR: 1.0 sec.; DBL; NA: 1200; ER: 15 Hz)

pas surprenants. Les cellules de mammifères vivent dans un milieu de composition extrêmement bien contrôlé, alors que les microorganismes tels que *Acanthamoeba castellanii* survivent dans des conditions environnementales très diversifiées. Les mécanismes de régulation des paramètres essentiels de la vie, tel que celui du pH intracellulaire se sont donc adaptés en conséquence.

Le pH intracellulaire des cellules végétatives perfusées est environ 7.15 (Section 5.7). Cette valeur fluctue de 0.1 unité selon l'état métabolique des cellules. Nos valeurs s'adaptent bien avec celles publiées pour d'autres microorganismes eukariotes: *Dictyostelium*, 7.20 - 7.45 (Aearts et al., 1985); *Tetrahymena*, 7.25 - 7.55; *Saccharomyces cerevisiae*, 7.0 - 7.3 (Gillies, 1982); *Physarum*, 7.0 - 7.5 (Steinhardt et Morisawa, 1982). La marge de pH indique dans chaque cas les variations de pH intracellulaire observées lors des différents stades du cycle cellulaire.

6.3.5 Conclusion

Les expériences précédentes démontrent que le comportement cellulaire change lors du passage de la phase de croissance logarithmique à la phase stationnaire.

La concentration en substrats ne semble aucunement responsable de l'arrêt de la phase de croissance logarithmique. A la période de latence, le niveau de glucose n'a diminué que de 30 à 40%. De plus, la concentration des

acides aminés essentiels ne diminue pas suffisamment pour expliquer l'arrêt de la croissance. Bien que l'accumulation de certaines substances dans le milieu de culture puisse être impliquée dans ce phénomène (Pigon, 1972), il semble que la principale cause de la transition soit le manque d'oxygène tel que l'a suggéré Byers *et al.* (1969). De simples observations effectuées dans notre laboratoire appuient cette hypothèse. Dans des flacons de culture de 500 ml, lorsque le volume du milieu est augmenté de 100 à 250 ml, les cultures atteignent une densité égale à 60% de celle normalement obtenue. Ces résultats s'expliquent par une diminution de l'aération du milieu de culture. Dans une autre série d'expériences, la culture de cellules dans un milieu ayant préalablement servi à la croissance de cellules jusqu'à la phase stationnaire ne montre qu'une diminution de 15 à 40% de la densité cellulaire au plateau. Ces résultats indiquent que le milieu de culture est toujours propre à la croissance des cellules.

La transition entre les deux phases de croissance coïncide avec de nombreux changements physiologiques et métaboliques. Pour n'en citer que quelques-uns, notons l'arrêt de la phagocytose, la diminution de la pinocytose (Chambers et Thompson, 1976), l'augmentation transitoire de la quantité d'AMP_c (Gessat et Jantzen, 1974), et le changement du métabolisme respiratoire (Edward et Lloyd, 1977b). C'est à ce stade qu'un faible pourcentage d'amibes (~ 5 à 10%) s'enkystent spontanément dans le milieu. Il semble que ce changement métabolique soit nécessaire afin d'obtenir une

réponse adéquate à l'induction de l'enkystement.

6.4 L'enkystement

6.4.1 Effet des ions monovalents et de la pression osmotique

Les expériences suivantes ont été effectuées afin de déterminer l'effet du K^+ sur la dépolarisation de la membrane cytoplasmique et d'étudier l'influence des changements de pression osmotique du milieu sur l'enkystement. Les cellules d'une culture en début de phase stationnaire sont recueillies, lavées et suspendues dans le milieu d'enkystement étudié. La culture est transférée par portions de 5 ml dans une série de tubes à essai tel que décrit à la Section 3.5. Les milieux de culture étudiés sont les tampons Na^+ -PIPES et K^+ -PIPES, en présence de différents agents inducteurs. Leurs effets sont comparés après 24 et 48 heures d'incubation. Les résultats sont présentés dans le Tableau 6.2. Le transfert de cellules synchronisées dans le milieu inorganique induit toujours un certain enkystement. La présence de Mg^{2+} et/ou de Ca^{2+} accroît significativement cet effet. En concentration suffisamment élevée de Mg^{2+} et de Ca^{2+} , le taux d'enkystement est supérieur à 75%.

Contrairement aux résultats observés par Band (1975), nous avons constaté que l'ajout de DMSO au milieu inorganique induit rapidement et efficacement l'enkystement des cellules (<90% d'enkystement) en absence de Mg^{2+} et/ou de Ca^{2+} .

TABLEAU 6.2. Effet des ions monovalents sur l'enkystement.

Agent inducteur	Tampon Na ⁺	Tampon K ⁺
Contrôle	2	2
MgSO ₄	3	3
CaCl ₂	3	3
MgSO ₄ + CaCl ₂	4	4
MgSO ₄ (25 mM)	4	4
CaCl ₂ (4 mM)	5	5
DMSO (0.5%)	5	5
NaCl (+ 200 mM)	M	M
+ MgSO ₄ + CaCl ₂	1-2	1-3
KCl (+ 200 mM)	M	M
+ MgSO ₄ + CaCl ₂	1-3	1-3

Tampon: NaCl ou KCl (100 mM) + PIPES (50mM), pH 7.0.

MgSO₄ : 5 mM sauf indication contraire.

CaCl₂ : 0.4 mM sauf indication contraire.

Les comptes sont effectués après 48 heures.

C= cellules; M = cellules mortes; 1 = 0 - 20% kystes; 2 = 20 - 40% kystes; 3 = 40 - 60% kystes; 4 = 60 - 80% kystes; 5 = 80 - 100% kystes.

Comme le démontre le Tableau 6.2, aucune différence significative ne peut être notée en comparant l'induction de l'enkystement dans les tampons K^+ et Na^+ . Il est surprenant que le K^+ n'affecte pas de façon remarquable le comportement des amibes. Neff et al. (1964b) ont obtenu des résultats semblables avec des tampons d'enkystement de compositions différentes. Cependant, dans les conditions expérimentales, un taux d'enkystement élevé est obtenu seulement lorsque les cellules sont diluées à des concentrations inférieures à 2×10^6 cellules/ml. Les concentrations cellulaires utilisées pour nos expériences sont environ 3 fois supérieures à celle de Neff et al. Il faut noter cependant que plusieurs des caractéristiques de leur souche cellulaire semblent être différentes de la nôtre. Par exemple, la densité cellulaire atteinte au plateau est de 3 à 4 fois inférieure à celle de nos cultures.

Une forte teneur en K^+ induit la dépolarisation de la membrane des cellules mammaliennes et influence diverses fonctions métaboliques. Les amibes ne réagissent cependant pas de la même manière. Leur paroi cytoplasmique semble insensible à la substitution des ions Na^+ par des ions K^+ , et peuvent probablement pour la même raison survivre dans des environnements très diversifiés. Selon Ulsamer et al. (1971), la membrane plasmique d'*Acanthamoeba castellanii* ne contient pas de $Na^+ : K^+$ ATP_{ase}, ni d'adénylate cyclase, à l'instar des membranes des cellules de mammifères.

En concentrations élevées (200 mM supérieure au condition normale), le Na^+ et le K^+ induisent tous deux la lyse des cellules, sauf en présence de Mg^{2+} ou de Ca^{2+} (Tableau 6.2). Cet effet protecteur des ions divalents contre la pression osmotique a été notée chez plusieurs autres microorganismes. Chez *Halobacteria*, la croissance se fait en présence de concentrations élevées en NaCl (supérieures à 1 M). Le milieu de culture doit cependant contenir des quantités appréciables de Mg^{2+} (20 mM) pour éviter la rupture des cellules. Selon Kushner et Onishi (1966), ces ions divalents créent des ponts entre les groupements phosphates de têtes lipidiques et stabilisent ainsi la membrane. Chez *Amoeba proteus*, le Ca^{2+} est associé en quantité importante aux membranes cellulaires (Prusch et Hannafin, 1979).

6.4.2 Effet des ions divalents et de l'EDTA

L'importance du Mg^{2+} dans l'enkystement est reconnue depuis longtemps (Neff et al., 1964b). Son mode d'action reste cependant incertain. Griffiths and Hughes (1968, 1969) ont étudié en détail ses effets. Lors de l'enkystement, le magnésium diminue l'effluence de matériels absorbant dans l'ultraviolet (nucléotides, acides aminés, et protéines) et la perte de cellules par lyse. De plus, il stimule la production de cellulose. Les auteurs n'ont observé aucun besoin de Ca^{2+} pour l'enkystement. Des effets semblables causés par le Mg^{2+} ont été observés chez *Dictyostelium discoideum* (Krivchsky et Love, 1965; Krivchsky et Wright, 1963). Krivchsky et Love

(1965) ont suggéré que le magnésium interagit directement avec la surface de l'amibe, affectant ainsi la perméabilité de la membrane et l'effluence des macromolécules.

Le magnésium est aussi connu comme étant un activateur de plusieurs systèmes enzymatiques. Le tréhalose, sucre principal des kystes d'*Acanthamoeba*, est également retrouvé dans l'hémolymphe de certains insectes. Il est synthétisé dans le corps gras de ces derniers par un mécanisme commun aux levures et aux helminthes (vers intestinaux). Dans un extrait enzymatique de la larve à soie, Murphy et Wyatt (1965) ont montré que l'étape limitante de la synthèse du tréhalose est celle catalysée par le tréhalose-6-phosphate synthétase. Cette enzyme est activée par le magnésium et le glucose-6-phosphate. Elle est cependant inhibée par le tréhalose. Jungreis et al. (1974) ont montré qu'il existait un lien direct entre la concentration en Mg^{2+} dans le corps gras du ver à soie *Hyalophora cecropia* et la concentration en tréhalose de l'hémolymphe. Il semble donc aussi plausible que le Mg^{2+} pénètre dans les cellules et déclenche une série de réactions responsables de l'enkystement des cellules.

Nous avons voulu savoir si l'effet du Mg^{2+} est spécifique à cet ion ou peut être mimé par d'autres ions divalents. Nous savons déjà que Ca^{2+} peut induire l'enkystement chez *Acanthamoeba castellanii*. L'effet de quelques cations sur l'enkystement a donc été étudié. Le Sr^{2+} et le Ba^{2+} ont été choisis car ils font tous deux partie du groupe des alcalino-

terreux comme le Mg^{2+} et le Ca^{2+} . Le béryllium n'a pas été étudié car il ne possède pas d'orbitale p , et ne peut donc pas former de complexes. Le Mn^{2+} et le Zn^{2+} ont été essayés à cause de leur importance biologique. L'effet de ces ions a été évalué à 3 concentrations différentes: 0.5, 5 et 25 mM.

Le Ba^{2+} est toxique aux concentrations étudiées. Par contre, le Sr^{2+} semble avoir un effet positif sur l'enkystement. A concentration élevée (25 mM), il semble induire la formation de la paroi de phosphonate des kystes. Cependant, les cellules résultantes sont difformes et non sphériques comme les kystes obtenus avec les inducteurs habituels. Le Mg^{2+} et le Ca^{2+} induisent tous deux un taux élevé d'enkystement à des concentrations supérieures à 5 mM. Les kystes formés avec le Ca^{2+} s'agglomèrent en groupes importants lors de l'enkystement, contrairement à ceux formés avec le Mg^{2+} .

Le Mn^{2+} est un ion bien connu pour se lier aux groupements phosphates de plusieurs composés, tout comme le Ca^{2+} et le Mg^{2+} . A faible concentration (0.5 mM), il a peu d'effet. A une concentration de 5 mM, il induit l'arrondissement des cellules. Les cellules ressemblent alors à des kystes sans paroi. A une concentration plus élevée (25 mM), environ 15% des cellules n'ont pas de paroi kystique mais sont arrondies, 65% ont une paroi kystique simple, et 15% sont des kystes à doubles parois. Le Zn^{2+} à une concentration de 25 mM produit un effet rapide sur les cellules. Après seulement

quelques minutes, les cellules diminuent rapidement de taille et s'agglomèrent. L'effet est moins marqué à 5 mM. A ces concentrations, la plupart des cellules meurent après 36 heures. Par contre, à 0.5 mM, les cellules s'enkystent en nombre élevé (> 80%). Neff *et al.* (1964b) a observé que les ions Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , et Co^{2+} n'induisent pas ou nuisent à l'enkystement des cultures.

L'EDTA est toxique et provoque la lyse des amibes à des concentrations supérieures à 0.1 mM. L'action est plus prononcée en présence de DMSO. La présence d'ions divalents a toujours été reconnue comme essentielle à la stabilité des membranes et au bon fonctionnement d'une foule de réactions enzymatiques. Les résultats obtenus ne sont donc pas surprenants.

L'induction de l'enkystement à l'aide du Mg^{2+} et du Ca^{2+} est plus efficace dans le milieu OGM 1/2 plutôt que dans un milieu inorganique. Cette remarque soulève cependant une question: les cellules utilisent-elles des substrats du milieu de culture comme source d'énergie pour l'enkystement? Bowers et Olszewski (1972) ont rapporté que la pinocytose était la principale voie d'incorporation des substances dissoutes et qu'il n'y a aucune évidence de la présence d'autres formes de transport actif. La pinocytose est réduite de 50% à la phase stationnaire et n'est pas fonctionnelle chez les kystes. Nos expériences de RMN ont confirmé que les kystes peuvent absorber et métaboliser l'acétate enrichie en ^{13}C . La

diffusion passive à travers la membrane est le mécanisme le plus probable pour le transport de l'acétate. Il a déjà été démontré que l'acétate est absorbé beaucoup plus rapidement à bas pH, où une plus grande proportion des molécules existe sous forme neutre (Neff et al., 1958). Griffiths et Hughes (1969) ont observé que l'addition d' α -cétoglutarate et de glucose au milieu d'enkystement favorisait l'enkystement. Griffiths (1970) a aussi remarqué que la diminution du poids sec des kystes lors de l'enkystement ($\approx 40\%$) était considérablement réduite ($\approx 13\%$) lorsque le milieu contenait du glucose. Chez *Dictyostelium Discoideum*, la présence de glucose exogène lors de la différenciation, stimule la production de tréhalose (Wright et al., 1979). Dans nos expériences, le glucose inhibe partiellement l'enkystement. Bien que l'enkystement puisse être un processus totalement endogène (Neff et al., 1969), il semble tout de même que les cellules puissent utiliser les substrats disponibles dans le milieu de culture comme source d'énergie.

6.4.3 Effet des solvants polaires aprotiques

Le DMSO, le DMF, ainsi que plusieurs autres agents cryoprotecteurs de faibles poids moléculaires, ont été reconnus comme pouvant induire la différenciation cellulaire *in vitro* chez une variété d'organismes procaryotes et eucaryotes. Le principal site d'action de ces inducteurs reste incertain bien que leur contrôle s'exerce ultimement au niveau de la transcription génétique.

Band (1975) a noté que le DMSO peut induire la formation de la paroi kystique chez *Acanthamoeba castellanii*, mais uniquement en présence de Mg^{2+} et de Ca^{2+} .

Nos résultats ont montré qu'avec la souche d'amibe cultivée dans notre laboratoire, le DMSO et le DMF induisent un enkystement complet des cellules dans un milieu Na^+ ou K^+ tamponné (Tableau 6.1). Le Mg^{2+} et le Ca^{2+} sont totalement absents du milieu utilisé. L'acétonitrile et la formaldéhyde, deux autres solvants aprotiques polaires et non cryoprotecteurs, n'induisent pas d'enkystement.

Contrairement aux ions Mg^{2+} et Ca^{2+} , le DMSO et le DMF induisent plus d'enkystement en milieu inorganique (>90%) qu'en milieu OGM 1/2 (60 - 80%). Le DMSO est reconnu comme un agent facilitant le transport des substances à travers les membranes. Il s'avère donc probable que l'ajout de DMSO au milieu organique favorise le transport de substances qui interfèrent avec l'enkystement.

En utilisant la calorimétrie à balayage différentiel, Lyman *et al.* (1976) ont montré que le DMSO, le DMF, la pyridine-N-oxide, le diméthylurée et le tétraméthylurée, tous des agents inducteurs *in vitro* chez les cultures de cellules leucémiques Friend, modifient la température de transition de phase des vésicules de phospholipides synthétiques et induisent une transition à une température supérieure. Les auteurs ont interprété ces résultats comme étant reliés à une

diminution de la "fluidité" de la membrane. Les études de CBD ont aussi démontré que les agents qui augmentent la fluidité de la membrane, tels que les anesthésiques locaux, inhibent l'effet du DMSO. D'autre part, les agents qui diminuent la fluidité de la membrane, tels que le Ca^{2+} et le Mg^{2+} , augmentent son effet. Des tests *in vitro* sur la différenciation des cellules FLC ont montré des effets semblables. Ces résultats suggèrent qu'une diminution de la fluidité membranaire modifie le transport ou la perméabilité de la membrane ou, cause le relâchement d'un messenger intracellulaire qui serait responsable de l'induction de la différenciation au niveau génétique.

Afin d'étudier cette hypothèse, nous avons essayé d'inhiber l'enkystement chez *Acanthamoeba castellanii* en utilisant trois substances reconnues comme diminuant les températures de transition des membranes modèles. Il s'agit de la chloroquine, de l'acétate de cortisol et de la tétracaïne. A des concentrations de 1 mM, la chloroquine et l'acétate de cortisol n'affectent pas l'enkystement dans les tubes contrôles. En présence de Mg^{2+} (25 mM) ou de Ca^{2+} (4 mM), le taux d'enkystement est le même (80 - 95%) qu'il y ait ou non un inhibiteur. Par contre, lorsque le DMSO est utilisé comme inducteur de l'enkystement, les cellules meurent en présence des inhibiteurs alors que les contrôles montrent un taux d'enkystement supérieur à 90%. La tétracaïne est toxique à une concentration de 1 mM. A 0.05 mM, la tétracaïne n'inhibe pas l'effet inducteur des ions divalents, mais freine

celui du DMSO, cependant sans induire la lyse des cellules.

Les résultats obtenus ne sont pas concluants puisque les inhibiteurs utilisés bloquent uniquement l'action du DMSO et non celle des ions divalents. Puisque la composition chimique des membranes d'*Acanthamoeba* est particulière, il se peut que les inhibiteurs utilisés ne puissent pénétrer la membrane. En présence de DMSO, un transporteur membranaire reconnu, ces composés pénétreraient alors plus facilement la cellule. Il est cependant difficile de savoir si leur site d'action se situe au niveau de la membrane ou ailleurs dans la cellule.

6.5 Mécanisme d'action proposé

Chez *Acanthamoeba*, nous avons montré que les cellules placées en milieu inorganique et en absence d'inducteur ne s'enkystent spontanément qu'en faible proportion. L'action des inhibiteurs ne diminue donc pas l'apport de substrats aux cellules. Une baisse de l'oxygénation, bien que probablement responsable de la phase stationnaire, ne semble pas directement impliquée dans l'enkystement puisqu'il s'agit d'un processus strictement aérobique et qu'une concentration trop élevée en cellules inhibe l'enkystement. Plusieurs faits suggèrent que l'enkystement est initié au niveau de la membrane: 1° la non-spécificité des ions divalents (Section 6.4.2) et le fait qu'ils se lient au groupement phosphate des lipides; 2° l'activité du DMSO et du DMF, deux agents connus comme perturbant les propriétés membranaires; 3° la liaison

membranaire de plusieurs inducteurs à la membrane (à l'exception des inhibiteurs de la synthèse de l'ADN, Section 1.3.1). La membrane est le site proposé par plusieurs groupes de recherche, dans la différenciation de divers organismes (*Dictyostelium discoideum*: Krivchevsky et Love, 1965; cellules leucémiques Friend: Lyman et al., 1976), dont *Acanthamoeba castellanii* (Krishna Murti and Shulka, 1984; Villemez, 1985). La suite des événements reste à élucider mais plusieurs hypothèses se présentent déjà.

Dans la littérature, trois facteurs sont proposés comme régulateurs possibles de la différenciation cellulaire. Il s'agit de l'AMP_c, du pH intracellulaire (pH_i), et du Ca²⁺. Ces trois facteurs sont dans plusieurs cas, directement ou indirectement interreliés (Busa et Nuccitelli, 1984).

Krishna Murti et Shulka (1984) ont proposé que l'AMP_c joue le rôle de second messenger lors de la différenciation d'*Acanthamoeba castellanii*. Plusieurs des faits mentionnés dans la Section 6.3.2 laissent plutôt supposer que l'AMP_c est impliquée dans le contrôle du métabolisme du glycogène. Elle permettrait aux cellules de changer leur métabolisme et de s'adapter aux conditions imposées par la confluence cellulaire. Ce changement de métabolisme reste cependant un prérequis possible à l'enkystement. Gessat et Jantzen (1974) ont montré qu'une élévation de 2 à 3 fois dans la concentration d'AMP_c survient lors de l'induction de l'enkystement par le transfert des cellules en phase de

croissance logarithmique dans un milieu non nutritif, par l'addition de bromure d'éthidium (un inhibiteur de la synthèse d'ADN mitochondriale) ou en laissant les cellules croître jusqu'à confluence. Dans leurs expériences, 50 à 70% d'enkystement spontané est observé à la phase stationnaire. Dans nos expériences, environ 5% d'enkystement survient spontanément à la phase stationnaire. Nous pensons que le rôle de l'AMP_c se limite au contrôle du métabolisme des sucres et n'intervient pas directement dans le processus d'enkystement. Dans le cas des cellules épithéliales du rein MDCK, l'action d'inducteurs de la différenciation tels que le DMSO et l'hexaméthylène bisacétamide est connue pour induire une augmentation du niveau d'AMP_c. L'action du dibutyryl AMP_c et des inhibiteurs de la phosphodiesterase, qui élèvent directement les niveaux intracellulaires d'AMP_c, est associée à la différenciation chez ces cellules. Par contre, d'autres inducteurs connus de la différenciation ne causent pas d'élévation d'AMP_c. Ulsamer *et al.* (1971) n'a pu montrer la présence d'adénylate cyclase membranaire chez *Acanthamoeba castellanii*. Kennedy et Lever (1984) ont proposé que l'action des différents inducteurs augmente le niveau de Na⁺ intracellulaire. L'effet d'une telle élévation n'a pas été déterminé. Dans le cas des cellules MEL ("Murine Erytroleukemia Cell"), Smith *et al.* (1982) ont proposé que les inducteurs provoquent une élévation du niveau de Na⁺ qui induirait, par un système d'échange, une augmentation du niveau de Ca²⁺ intracellulaire. Le Ca²⁺ modulerait par la

suite la transcription génétique et induirait la différenciation.

Cette hypothèse semble à première vue expliquer les résultats observés chez *Acanthamoeba*. Les effets des solvants aprotiques, le DMSO et le DMF, et les ions divalents pourraient affecter le mécanisme des pompes transmembranaires, causant ainsi une élévation du Na^+ intracellulaire. Une élévation du pH extracellulaire, induisant aussi l'enkystement dans certaines conditions, pourrait produire un drainage des protons vers l'extérieur via la pompe Na^+/H^+ provoquant une augmentation du Na^+ intracellulaire, suivie de celle du Ca^{2+} . Le fait que l'enkystement puisse s'effectuer en absence totale de Na^+ dans le milieu extracellulaire semble refuter ce mécanisme. Prusch et Hannafin (1979) ont montré qu'une élévation de pH extracellulaire ou une élévation de la concentration extracellulaire de Ca^{2+} est associée avec une élévation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} chez *Amoeba proteus*. Pour que ce mécanisme d'action soit valable, il faudrait alors postuler que les solvants aprotiques et le Mg^{2+} provoquent une élévation du Ca^{2+} intracellulaire, possiblement par la libération ou la substitution du Ca^{2+} associé aux membranes. Band (1975) a déjà suggéré que le DMSO perturbe la perméabilité des membranes au Ca^{2+} , et suggère que cet ion a un effet régulateur sur les processus enzymatiques impliqués dans l'enkystement. Ses études ont par contre montré que le $^{45}\text{Ca}^{2+}$ n'est pas incorporé de façon significative aux éléments structuraux de la cellule lors de

l'enkystement et que le contenu en Ca^{2+} est inférieur dans les kystes par rapport à celui des trophozoïtes. Il est cependant possible que l'augmentation ne soit que transitoire.

Depuis longtemps, la croyance générale était que le pH_i demeurerait constant. Depuis quelques années, le raffinement des techniques de mesure a permis de mesurer des changements de quelques dixièmes d'unité de pH lors des événements impliqués dans la différenciation, la maturation ou la division de différents organismes. Ces observations constituent la base d'une hypothèse selon laquelle les variations de pH_i observées régularisent la séquence des événements par la modulation d'activité enzymatique, la modification des niveaux de Ca^{2+} ou encore de l' AMP_c . Cette hypothèse a été discutée en détail par Busa (Busa et Nuccitelli, 1984; Busa, 1986). Dans le cas de *Dictyostelium discoideum*, un microorganisme possédant plusieurs caractéristiques métaboliques semblables à celle d'*Acanthamoeba castellanii*, Gross et al. (1983) propose que la différenciation est contrôlée par le pH. Cet organisme se différencie soit en spore, soit en forme tige lorsqu'il est transféré dans un simple milieu inorganique contenant de l' AMP_c . Les conditions susceptibles d'induire une augmentation du pH intracellulaire sembleraient favoriser la formation de spores, alors qu'inversement, celles susceptibles de diminuer le pH favoriseraient la formation de tiges. Les effets les plus prononcés ont été obtenus avec des inhibiteurs connus de la

pompe à proton chez cet organisme. Cependant, les mesures de pH effectuées par RMN de ^{31}P de Kay et al. (1986) n'ont pu mettre en évidence une baisse de pH causée par l'utilisation de composés reconnus comme induisant la formation de tiges chez *Dictyostelium*. Quoi qu'il en soit, cette hypothèse demeure intéressante dans le cas de la différenciation chez *Acanthamoeba castellanii* et peut facilement être étudiée avec notre système de perfusion. Cette question sera abordée dans le Chapitre 7.

CHAPITRE 7

LES CHANGEMENTS METABOLIQUES DURANT L'ENKYSTEMENT

7.1 Introduction

Nous avons étudié l'enkystement d'*Acanthamoeba castellanii* en utilisant deux approches. La première approche est classique et implique le dosage par méthodes chimiques ou biochimiques des composés d'intérêt. La seconde, moins commune mais de plus en plus répandue est la spectroscopie RMN *in vivo*. Dans ce chapitre, nous allons présenter les résultats obtenus par ces techniques.

7.2 L'enkystement - approche biochimique

7.2.1 Introduction

Le dosage des métabolites en fonction du temps implique l'échantillonnage continu de la culture et un protocole d'analyse élaboré permettant de suivre tous les métabolites d'intérêt dans le même échantillon. L'organigramme utilisé pour l'analyse des échantillons est le même que celui présenté à la Figure 6.1. Nous nous sommes intéressés au dosage des hydrates de carbone à cause de leur participation importante aux processus énergétiques. Le tréhalose est le sucre prédominant chez les kystes. On lui confère un rôle

protecteur de la membrane lors de la déshydratation. Le deuxième groupe de composés d'intérêt sont les acides aminés. Ils sont impliqués directement à plusieurs points stratégiques du métabolisme cellulaire. Ils peuvent contribuer à la réponse osmotique lors de stress chez *Acanthamoeba* (Geoffrion, 1982; Yancey et al., 1982). Ils participent aussi à la protection de l'intégrité des cellules lors de la congélation ou la déshydratation (Rudolph et al., 1986).

7.2.2 La synchronisation

Comme nous l'avons expliqué précédemment, un enkystement synchronisé peut être obtenu par une manipulation appropriée des cultures cellulaires. Le synchronisme et le taux d'enkystement varient selon l'âge de la culture. Ils sont tous deux plus élevés lorsque les cellules sont au début de la phase stationnaire. Les cellules multinucléées des cultures plus âgées ne répondent pas aussi bien aux stimuli de l'enkystement. Pour les études d'enkystement, la synchronisation des cultures s'effectue en transférant les cellules pour une période de 6 à 12 heures dans un milieu de culture frais dépourvu de glucose. La densité cellulaire ne doit pas être supérieure à 8×10^6 cellules/ml pour de bons résultats. Durant cette étape, les cellules multinucléées disparaissent. Il est probable que ces cellules se débarrassent de l'excès de matière nucléaire plutôt que de se diviser ou de se désagréger, puisque nous n'avons observé aucune augmentation ou diminution de la concentration

cellulaire durant cette période. Après 6 - 12 heures, l'aspect des cellules devient uniforme. Les cellules semblent toutes au même stage du cycle cellulaire, expliquant ainsi le synchronisme de l'enkystement (Byers, 1979).

Durant la synchronisation, le poids sec des cellules reste stable aux environs de 700 pg/cellule. A ce stade, les réserves de glycogène se situent à près de 200 fmoles/cellule ($n = 4$), soit à environ 60% de la valeur maximale atteinte dans les cellules en phase logarithmique. Cependant, cette valeur diminue rapidement. Au cours des heures qui suivent le transfert des cellules dans le milieu de synchronisation, les quantités intracellulaires de maltose et de tréhalose doublent. Les quantités de maltose alors retrouvées sont d'environ 20 à 30 fmoles/cellule. Le tréhalose est présent en quantité deux fois moindre.

Lors de la synchronisation, la concentration intracellulaire de la plupart des acides aminés diminue, certains jusqu'à 50%. L'augmentation continue du pH extracellulaire, conséquence du relargage d'ammoniaque dans le milieu, suggère l'utilisation des acides aminés comme source d'énergie pour combler l'absence de sources externes de glucose.

7.2.3 L'induction et l'enkystement

Plusieurs produits ont le potentiel d'induire l'enkystement des cellules. Parmi les plus efficaces, nous avons choisi d'étudier l'action de deux inducteurs de

l'enkystement, soit le Mg^{2+} et le DMSO. La nature chimique des deux inducteurs étant opposée, il nous sera plus facile d'identifier les facteurs-clés de l'enkystement, ainsi que ceux propres à l'inducteur utilisé.

L'induction de l'enkystement avec le Mg^{2+} est effectuée en ajoutant une quantité suffisante de $MgSO_4$ au milieu OGM 1/2 de la culture synchronisée pour obtenir une concentration finale d'environ 25 mM. Une augmentation parallèle du pH de 6.8 à 7.2 - 7.6 par l'ajout de NaOH, stimule l'enkystement. Dans le cas de DMSO, les meilleurs résultats sont obtenus lorsque les cellules sont transférées dans un milieu inorganique de pH contrôlé, contenant 0.5% de DMSO. Dans les deux cas, une densité cellulaire trop élevée inhibe partiellement ou totalement l'enkystement. Cet effet est possiblement dû à une trop grande baisse de la tension d'oxygène dans le milieu de culture. Plusieurs groupes (Band et Mohrlök, 1969; Griffiths et Hughes, 1969) suggèrent que la respiration des amibes augmente lors de l'initiation de l'enkystement, et que l'enkystement doit se faire dans des conditions aérobiques. Pour ces raisons, les concentrations cellulaires utilisées sont inférieures à 8×10^6 cellules ml^{-1} .

Les changements morphologiques qui surviennent après l'induction de l'enkystement ont été décrits en détail par plusieurs auteurs (Bowers et Korn, 1969; Griffiths, 1970; Neff et Neff, 1969). Les cellules réagissent promptement dès l'induction. Le volume et le poids cellulaire diminuent alors

rapidement. Selon Griffiths (1970), la perte de poids sec varie entre 13 et 40% selon les conditions expérimentales d'enkystement. Lors d'une expérience d'enkystement avec le Mg^{2+} (milieu OGM 1/2) où ces mesures furent effectuées, le poids sec des cellules initialement à 700 pg/cellule a diminué exponentiellement dès l'induction de l'enkystement. Le poids cellulaire s'est stabilisé à environ 550 pg/cellule après 25 heures. Ceci correspond à une perte en poids de 25 à 30% par rapport aux cellules trophozoïtes en début de phase stationnaire.

L'enkystement induit par le DMSO ($n = 1$) et par le Mg^{2+} ($n = 4$) ne montre pas de différences majeures dans la séquence des événements. Cependant, les concentrations de plusieurs hydrates de carbone semblent être affectées. Le glycogène, comme la plupart des autres constituants cellulaires, se met à diminuer rapidement (nos études; Neff et Neff, 1969). Dans toutes nos expériences, la chute du glycogène se produit en deux étapes (Fig. 7.1 et 7.2). La première débute dès l'initiation de l'enkystement et se fait parallèlement avec la perte de poids des cellules. Selon les conditions d'enkystement, 40 à 75% du glycogène présent à l'induction est utilisé durant les 20 premières heures. Comme le montrent les Figures 7.1 et 7.2, la chute du glycogène est beaucoup plus prononcée lors de l'enkystement en présence de DMSO. La synthèse du tréhalose et de la cellulose immédiatement débute après la première chute du glycogène. Subséquemment, le maltose, qui avait augmenté sensiblement après induction, se

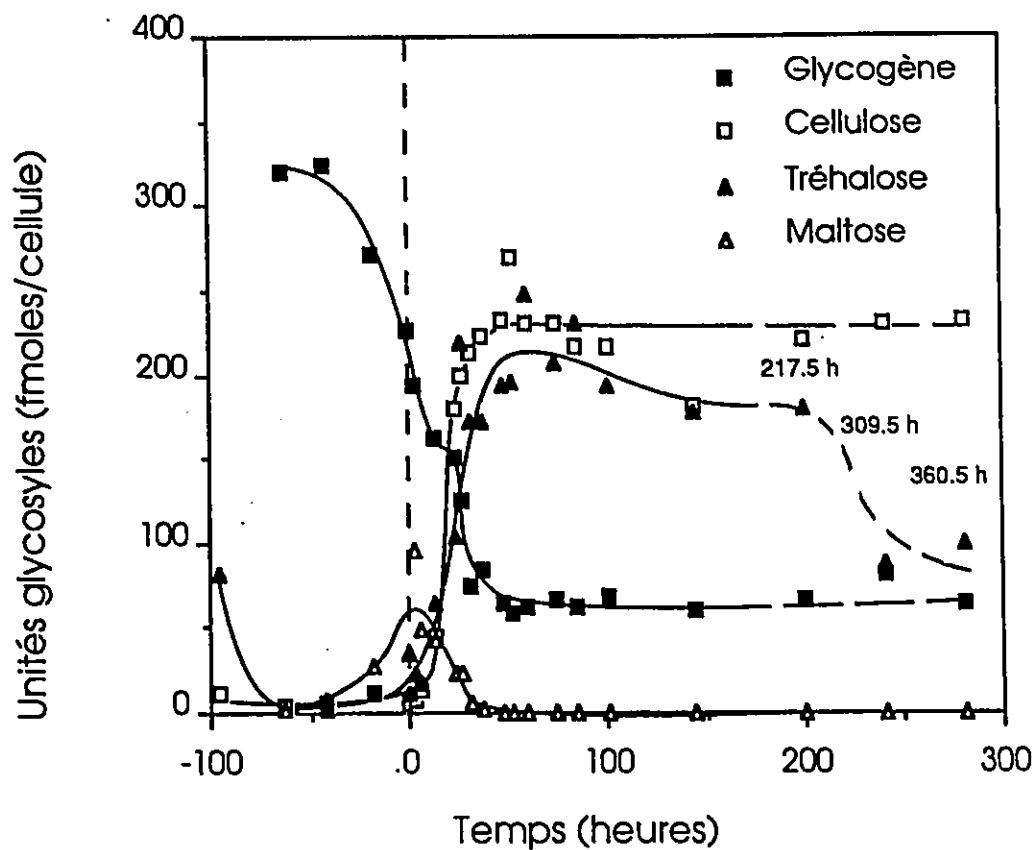


FIG. 7.1. Métabolisme des hydrates de carbone lors de la croissance et de l'enkystement induit par le Mg^{2+} (milieu OGM 1/2).

Le temps $t = 0$ correspond au moment d'induction.

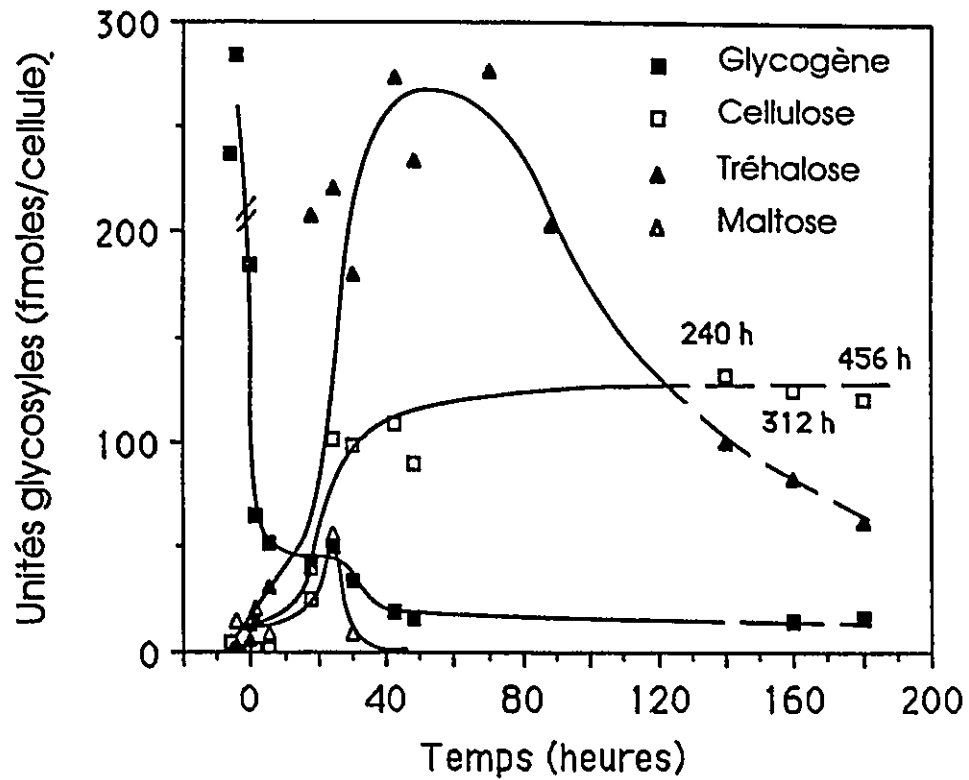


FIG. 7.2. Métabolisme des hydrates de carbone lors de la synchronisation de l'enkystement induit par le DMSO.

Le temps $t = 0$ correspond au moment du transfert des cellules du milieu OGM 1/2 au milieu Na-PIPES contenant 0.5% de DMSO.

met alors à diminuer rapidement. En même temps, la dégradation du glycogène recommence. Après environ 50 heures, les quantités présentes de glycogène et de cellulose se stabilisent. Comme le montrent les figures, la formation de cellulose est beaucoup plus importante lors de l'enkystement dans le milieu OGM 1/2 (Mg^{2+}) que dans le milieu inorganique (DMSO). La microscopie montre que l'enkystement en milieu OGM 1/2 permet la formation de parois kystiques beaucoup plus épaisses. Il est donc possible que même lors de l'enkystement, les cellules utilisent les substrats externes malgré l'arrêt de la pinocytose. Même si les quantités de cellulose produites sont affectées par les conditions d'enkystement, les quantités de tréhalose synthétisées demeurent semblables.

La concentration du tréhalose atteint un maximum après environ 50 heures. Elle se situe aux environs de 100 à 140 fmoles/cellule, et constitue de 8 à 15% du poids sec cellulaire. La concentration en tréhalose diminue constamment lors de la maturation des kystes. Après 400 heures, la concentration intracellulaire de tréhalose a diminué de plus de 50%. Chez les levures, la conservation des kystes en milieu aqueux provoque une perte similaire de tréhalose (Panek *et al.*, 1978). Les auteurs suggèrent que l'activité métabolique n'est pas totalement arrêtée dans ces conditions de préservation, ce qui limite la durée de survie des spores.

On peut postuler que les unités glycosyles générées par

la dégradation du glycogène dans la première étape du processus sont principalement utilisées comme source d'énergie pour le processus d'enkystement. Les unités glycosyles provenant du maltose et celles générées dans la seconde phase de dégradation du glycogène sont probablement incorporées en majeure partie dans le tréhalose et la cellulose. La quantité totale de cellulose et de tréhalose produite est largement supérieure à celle du glycogène total mesuré au début de l'enkystement. Par exemple, dans le cas de l'enkystement induit par le Mg^{2+} , le tréhalose présent après 50 heures correspond à 100 - 140 fmoles/cellule (200 - 280 fmoles d'unités glycosyles) et la cellulose, à 230 fmoles d'unités glycosyles/cellule. Le total se situe à environ 450 fmoles d'unité glycosyle alors que les réserves de glycogène présentes à l'enkystement sont de l'ordre de 200 fmoles d'unité/cellule. Ces proportions correspondent bien à celles observées chez *Dictyostelium discoideum*. Le tréhalose, le glycogène et la cellulose constituent chez cet organisme 50 - 63% des hydrates de carbone totaux (Rosness et Wright, 1974). Il semble donc que, lors de l'enkystement d'*Acanthamoeba castellanii*, une importante partie des unités glycosyles du tréhalose et de la cellulose provient de synthèse *de novo* ou de sources d'hydrate de carbone moins accessibles (glycoprotéines, glycolipides et autres). La voie du glyoxylate est active chez *Acanthamoeba* (Tomlinson, 1967), et elle est probablement utilisée pour la conversion des lipides et de d'autres substrats en unités glycosyles. Ce point de

vue, partagé par Prescott *et al.* (1973) est étudié plus en détail à la Section 7.6.

Bien que la concentration en acides aminés des cellules évolue en fonction du temps, la composition des kystes et des trophozoïtes est tout à fait différente (Fig. 7.3). Les quantités de plusieurs acides aminés intracellulaires dont celle du glutamate, de la glutamine, l'alanine et de la proline augmentent lors de l'enkystement (Fig. 7.4). Le taux d'augmentation varie beaucoup d'une expérience à l'autre ($n = 5$). Seule la proline est trouvée de manière reproductible en quantité abondante (30 - 50 fmoles/cellule) dans les kystes. Une concentration élevée en 4-hydroxyproline a parfois aussi été observée ($n = 2$). Les concentrations en glutamine, glutamate et proline semblent reliées. Par contre, celle de l'hydroxyproline semble indépendante de celle de la proline. L'hydroxylation de la proline se fait habituellement *in situ* dans les protéines. L'hydroxyproline, à l'instar de plusieurs autres acides aminés qui s'accumulent dans les kystes provient probablement de la dégradation massive des protéines survenant lors de l'enkystement (Neff et Neff, 1969). La concentration de plusieurs acides aminés diminue après les 150 premières heures, lors de la maturation des kystes. La concentration intracellulaire de la glutamine et la proline et de l'hydroxyproline est presque nulle après 500 heures. Dans les expériences où l'hydroxyproline est présente en concentration élevée, sa vitesse de disparition est beaucoup moins rapide que celle des autres acides aminés. Environ 50 à 60% de sa

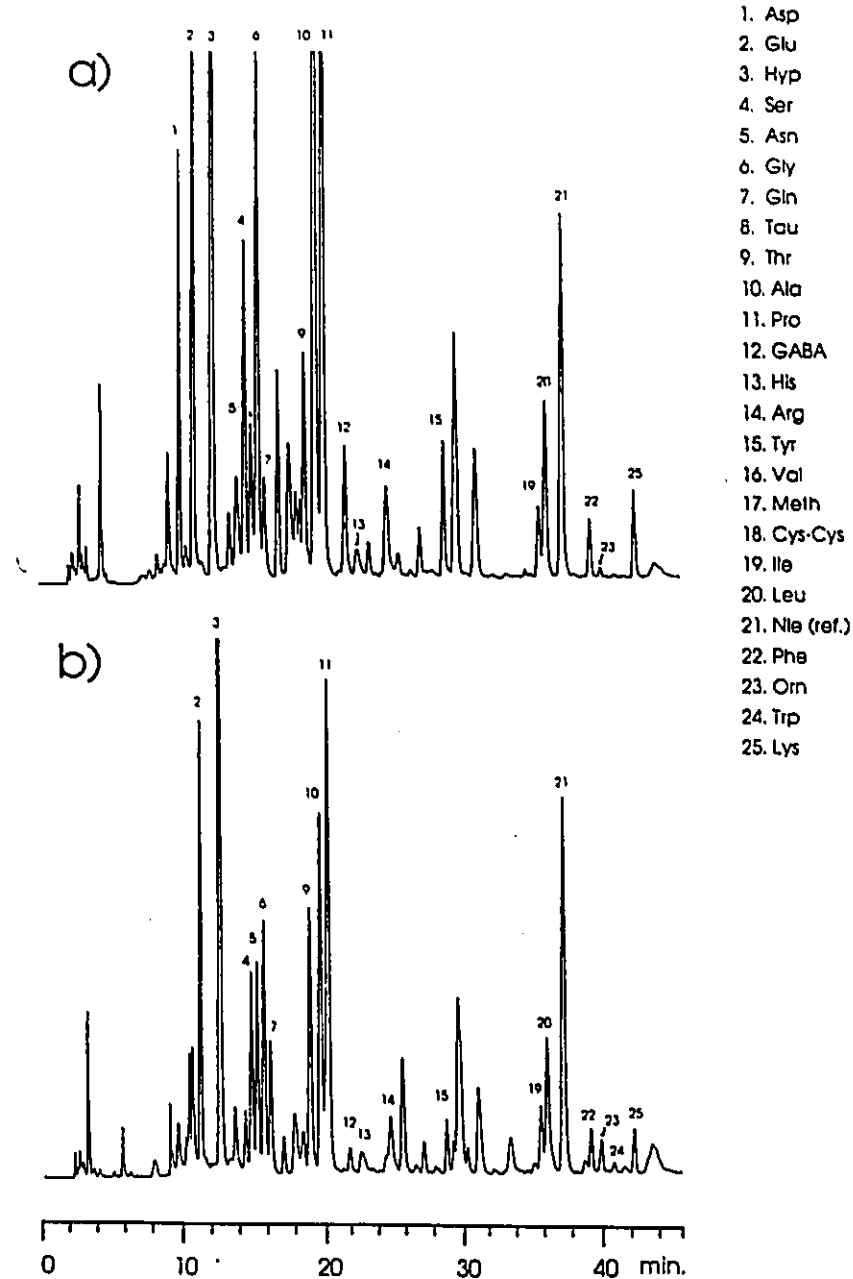


FIG. 7.3. Chromatogramme illustrant la composition en acides aminés des trophozoïtes et des kystes (Section 4.4.4).

a) Trophozoïtes en début de phase stationnaire
 b) Kystes 24 heures après l'induction (Mg^{2+}). La concentration de la proline est 50% de la valeur atteinte après 36 heures.

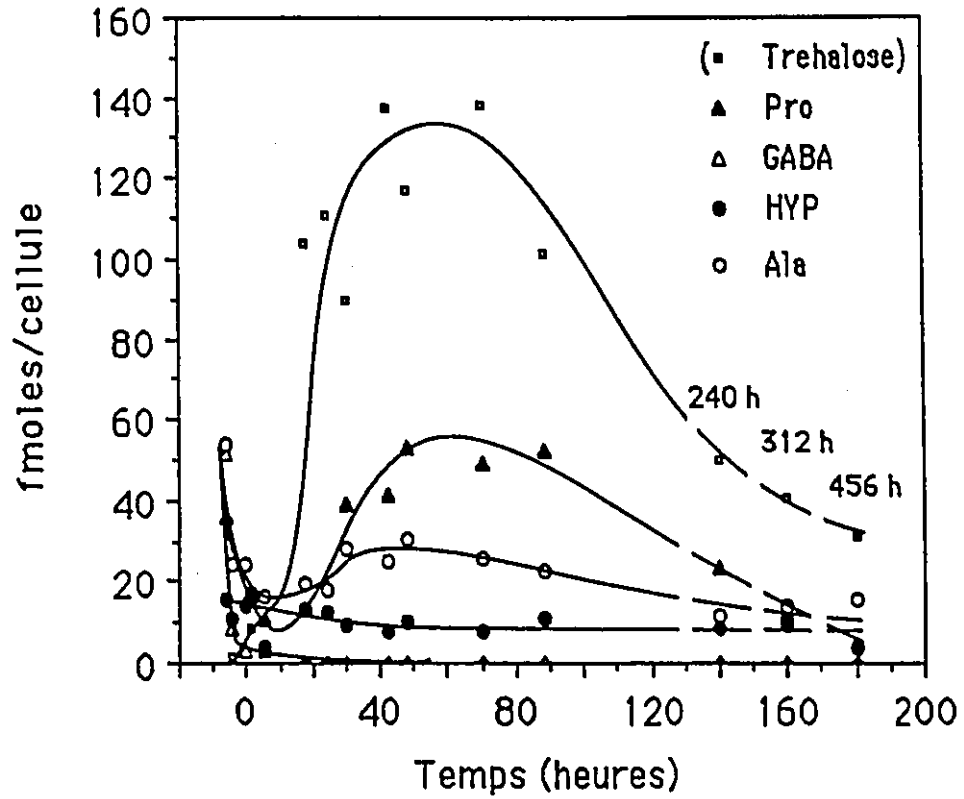


FIG. 7.4. Variation quantitative des acides aminés dans les kystes au cours de l'enkystement.

Le temps $t = 0$ indique le moment du transfert des cellules du milieu OGM 1/2 au milieu Na-PIPES contenant 0.5% de DMSO.

concentration maximale atteinte reste présente après 500 heures.

La concentration de plusieurs autres acides aminés intracellulaires diminue rapidement lors de l'enkystement. Le γ -aminobutyrate présent en concentration relativement élevée dans les trophozoïtes disparaît complètement dans les 10 premières heures de l'enkystement. On ne sait pas si les acides aminés intracellulaires sont consommés ou simplement relargués dans le milieu de culture. Durant les 48 premières heures de l'enkystement, la concentration de la plupart des acides aminés dans le milieu de culture augmente. Une partie de cette augmentation peut être attribuée à la perte importante de cellules lors de l'enkystement. Cette perte est très élevée dans les 10 - 12 premières heures de l'enkystement et le nombre de cellules se stabilise 24 heures après l'induction. Lorsque les expériences sont effectuées dans des conditions optimales, la perte cellulaire est inférieure à 30%. Elle augmente rapidement lorsque la densité cellulaire est supérieure à 8×10^6 cellules/ml, et lorsque la synchronisation des cellules en milieu appauvri n'est pas effectuée. La perte cellulaire n'est cependant pas le principal responsable de l'augmentation de la concentration extracellulaire de plusieurs acides aminés puisque cette augmentation survient majoritairement durant la période de 20 - 30 heures. Cette période correspond à la synthèse active de la cellulose, un constituant prédominant de la paroi kystique. Une partie des débris autolysosomiaux formés au début de

l'enkystement est sécrétée et incorporée à la paroi kystique. L'augmentation des acides aminés dans le milieu est probablement le résultat de cette période de sécrétion active. L'augmentation de la concentration extracellulaire en acides aminés ne se reflète pas nécessairement par une diminution de la concentration intracellulaire. Une partie des acides aminés relargués provient probablement de la dégradation de protéines. L'augmentation du pH du milieu d'enkystement, associée à la libération d'ammoniaque, est importante durant les 36 premières heures suivant l'induction. Ceci suggère un catabolisme actif des acides aminés et des protéines. Après 48 heures, la concentration des acides aminés se stabilise. Cependant, la concentration de glutamine dans le milieu diminue significativement. Il faut donc croire que le métabolisme cellulaire est toujours actif et que le transport de certains substrats est possible même sans pinocytose active. Cette conclusion est plausible puisque les cellules doivent pouvoir sonder le milieu de culture afin de déterminer si l'environnement est propice au désenkystement. D'autre part, des expériences de RMN de ^{13}C effectuées à l'aide d'un traceur, ont montré que les kystes peuvent transformer le pyruvate en alanine et en acétate dans les premières heures de perfusion avec du milieu OGM 1/2.

Après les premières 48 heures, le niveau des acides aminés intracellulaires et du tréhalose des amibes décroît lentement mais de manière constante avec le temps. Il

semblerait donc que le métabolisme des amibes soit encore actif bien qu'il ne fonctionne qu'à vitesse réduite. Ceci expliquerait pourquoi les amibes ont une durée de vie limitée en milieu aqueux. Le temps de demi-vie des kystes fluctue beaucoup d'une expérience à l'autre. La Figure 7.5 montre le taux de survie des kystes dans une culture typique. La mort des cellules peut être décalée de plusieurs jours selon les cultures. Il est probable qu'en milieu aqueux, la régulation de certaines fonctions telles que la pression osmotique et le transport de certains substrats demeure essentielle pour la survie de l'organisme. Le tréhalose et les acides aminés semblent alors être utilisés comme sources d'énergie. Les amibes déshydratées survivent plusieurs années lorsqu'elles sont conservées sous des conditions anhydres. La souche que nous avons étudiée semble mieux adaptée à la survie dans des conditions anhydres que dans un environnement aqueux.

Le tréhalose protège les membranes lors de la congélation et de la déshydratation des cellules (Section 1.3.1). La proline, une molécule amphipathique de faible poids moléculaire, présente des propriétés particulières en solution. Elle est très soluble dans l'eau (6 M à 25°C). En concentration modérée, elle participe à des associations colloïdales, résultant en un empilement alternatif des anneaux pyrrolidine de la proline (Schobert et Tschesche, 1978). Il semblerait que la proline a la propriété de s'associer aux parties hydrophobes des biomolécules et permet de stabiliser celles-ci particulièrement lorsque la quantité d'eau est

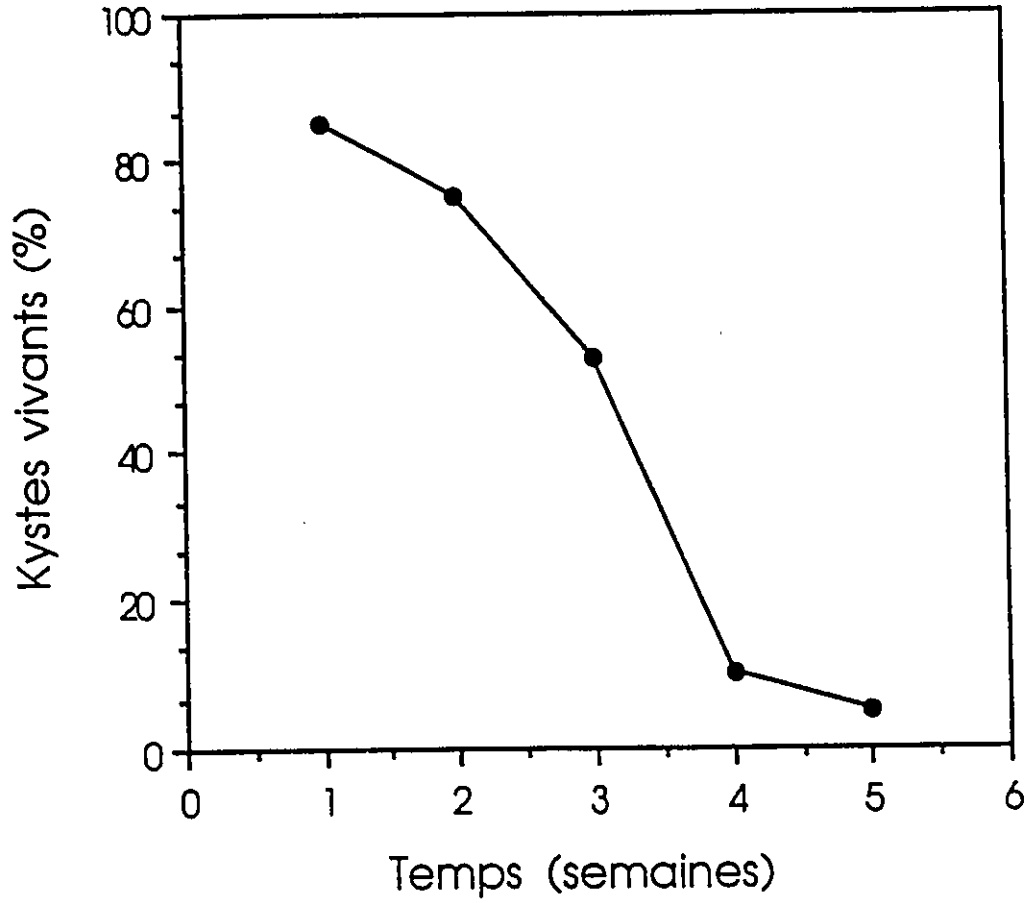


FIG. 7.5. Survie des kystes dans le milieu OGM en fonction du temps.

limitée. La proline est retrouvée en quantité importante chez les plantes halophytes et les invertébrés marins. Rudolph et Crowe (1985) ont montré que la présence simultanée de la proline et du tréhalose préserve plus efficacement la structure et la fonction des membranes lors de la congélation des vésicules que la présence de tréhalose seul. Les amibes accumulent jusqu'à 25 mM (50 fmoles/cellule) de proline et 50 - 75 mM (100 - 150 fmoles/cellule) de tréhalose. Exprimé en poids sec, le tréhalose constitue de 8 à 15% de la masse cellulaire. Le rapport tréhalose / masse lipidique est de 25 à 50%.

7.3 L'enkystement tel qu'observé par spectroscopie RMN

7.3.1 Introduction

Comme dans les expériences précédentes, le DMSO et le Mg^{2+} ont été utilisés comme inducteurs de l'enkystement. Aucune différence importante, visible par RMN de ^{31}P et de ^{13}C , n'a été observée. Le DMSO permet d'obtenir une meilleure réponse à l'induction. Il est aussi plus efficace lorsqu'utilisé en milieu inorganique. Ce milieu présente l'avantage de ne pas voiler les raies de plusieurs métabolites d'intérêt en RMN de ^{31}P et de ^{13}C .

7.3.2 La RMN de ^{31}P

La Figure 7.6 illustre des spectres RMN de ^{31}P obtenus à différentes étapes au cours d'une expérience de perfusion. Les cellules sont premièrement perfusées plusieurs heures avec du milieu OGM1/2 (Fig. 7.6a). Cette période permet d'observer la stabilité de la préparation et d'augmenter le synchronisme des cellules pour l'enkystement. En culture, l'induction peut être initié simplement par le transfert des cellules dans un milieu inorganique contenant du DMSO (0.5%). Pour les expériences de perfusion, l'ajout du DMSO se fait quelques heures après le transfert des cellules, ce qui permet de dissocier les deux effets. La Figure 7.6b montre les cellules perfusées en milieu inorganique. Le perfusat ne contenant pas de phosphate, la principale différence visible est la disparition de la raie de phosphate inorganique externe (P_i ext.). Les autres raies du spectre ne semblent pas perturbées par la substitution du milieu. La Figure 7.7 montre le spectre de ^{31}P obtenu avant et immédiatement après l'induction par l'ajout de DMSO. Dans les premières heures suivant l'induction, une raie attribuée à la présence de 2-aminoéthylphosphonate (AEP) apparaît (Deslauriers *et al.*, 1982a). L'AEP est un composé fréquemment détecté dans les cultures en phase stationnaire. Bien que nous n'ayons pas étudié l'effet de la synchronisation sur les concentrations intracellulaires de ce produit, les cellules perfusées dans le milieu OGM 1/2 ne contiennent que peu ou pas d'AEP.

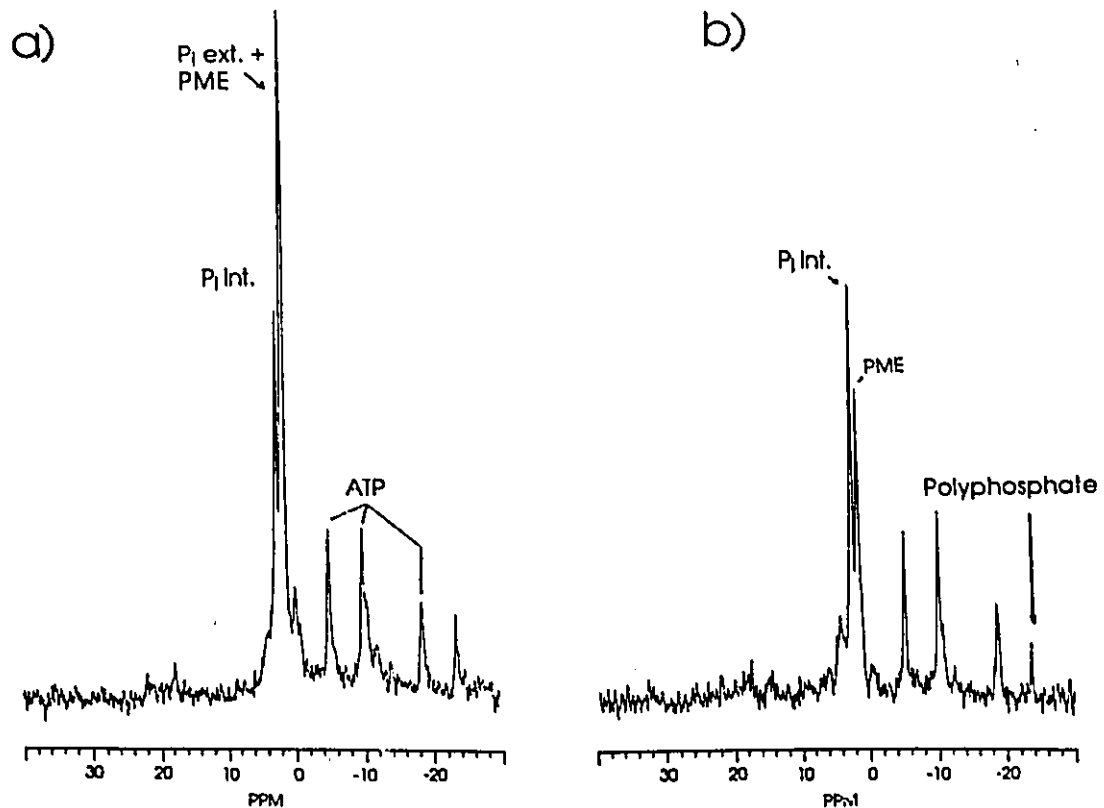


FIG. 7.6. Spectres RMN de ^{31}P de cellules au cours de la synchronisation. a) Cellules perfusées dans le milieu OGM 1/2 et b) Cellules immédiatement après le transfert dans le milieu inorganique.

Les cellules sont emprisonnées dans des tubes de dialyse pour la perfusion (Section 5.5). Les abréviations sont expliquées en Annexe. (FS: 145.78; AP:60°; TR:1.0 s.; DW; NA:1200; ER:20 Hz).

La Figure 7.7 montre la séquence des événements observés en RMN de ^{31}P . Outre l'apparition d'AEP, un très faible signal correspondant au déplacement chimique de l'UDP-glucose (≈ 13 ppm) devient visible. C'est durant les 8 premières heures que survient la première chute de glycogène (Fig. 7.1 et 7.2). Le niveau d'ATP est relativement constant durant les 12 premières heures. Il diminue cependant rapidement lorsque s'amorce la synthèse des phosphonates de la paroi kystique. Les phosphonates sont responsables du massif observé par RMN dans la région de 30 à 15 ppm (Deslauriers et al., 1982a, 1982b). Le signal de l'AEP disparaît à mesure que progresse la synthèse de la paroi de phosphonates. La synthèse des phosphonates dure environ 8 heures. Dans les premières heures suivant l'induction, la microscopie montre une diminution de la taille des cellules, la perte de vacuoles, l'arrondissement des cellules suivi de la synthèse de la paroi kystique (Bowers et Korn, 1969; Neff et Neff, 1969). En parallèle avec la synthèse, deux signaux dont les déplacements chimiques correspondent à ceux du glycérylphosphorylcholine (GPC) et du glycérylphosphoryléthanolamine (GPE) (Deslauriers et al., 1982a) surgissent. Durant tout le processus de l'enkystement, de grandes quantités de polyphosphate sont relâchées dans le milieu. Lors de l'enkystement des cellules dans des flacons de culture, il est habituel de retrouver des quantités appréciables de cristaux de polyphosphate après 48 heures.

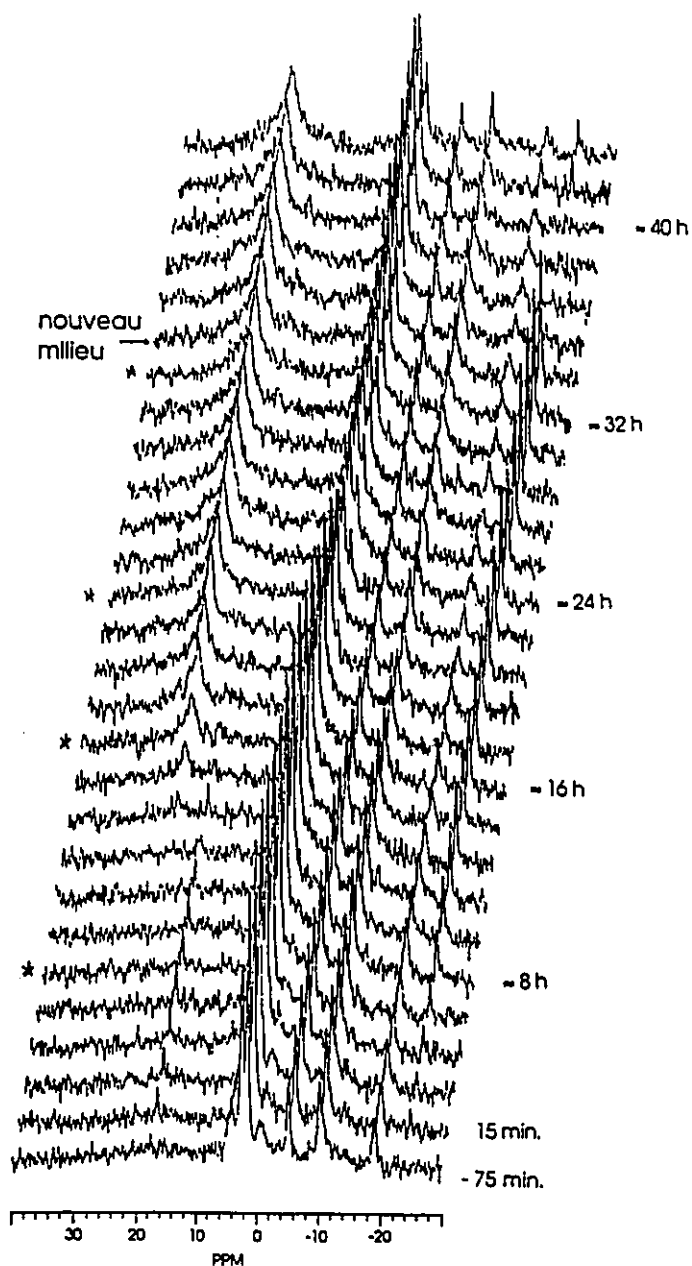


FIG. 7.7. Spectre RMN de ^{31}P de cellules au cours de l'enkystement.

Les conditions sont identiques à celles de la Figure 7.6.

La Figure 7.8 montre quelques spectres de ^{31}P à divers stades de l'enkystement. Si on observe l'intensité des signaux et qu'on tienne compte de la quantité de polyphosphate libérée dans le milieu de culture lors du processus d'enkystement, on doit conclure qu'une importante partie du phosphate présent sous une forme ou l'autre chez *Acanthamoeba* est invisible à la spectroscopie RMN.

7.3.3 La RMN de ^{13}C

La Figure 7.9a illustre un spectre RMN de ^{13}C de cellules récoltées à la phase stationnaire et lyophilisées. Comme on peut le voir en b), les cellules contiennent d'importantes quantités de lipides. La Figure 7.9c montre le spectre RMN du glycogène extrait de cellules. Le glycogène est la plus importante réserve d'hydrates de carbone présente chez les trophozoïtes. A la phase stationnaire les cellules contiennent aussi de faibles quantités de maltose et de tréhalose. Le tréhalose est facilement identifiable par la raie caractéristique du carbone C-1 à 94.4 ppm. Les raies des carbones C-1 de l'unité glycosyle réductrice de l' α - et du β -maltose sont bien visibles à 97.1 et 93.1 ppm. La raie du carbone C-1 de l'unité glycosyle non-réductrice du maltose est masquée par celle du glycogène à environ 100 ppm.

La Figure 7.10 montre des spectres de ^{13}C en abondance naturelle, de cellules à différentes étapes du processus d'enkystement. Le premier spectre est obtenu peu après le transfert des cellules dans le milieu Na-PIPES, avant l'ajout

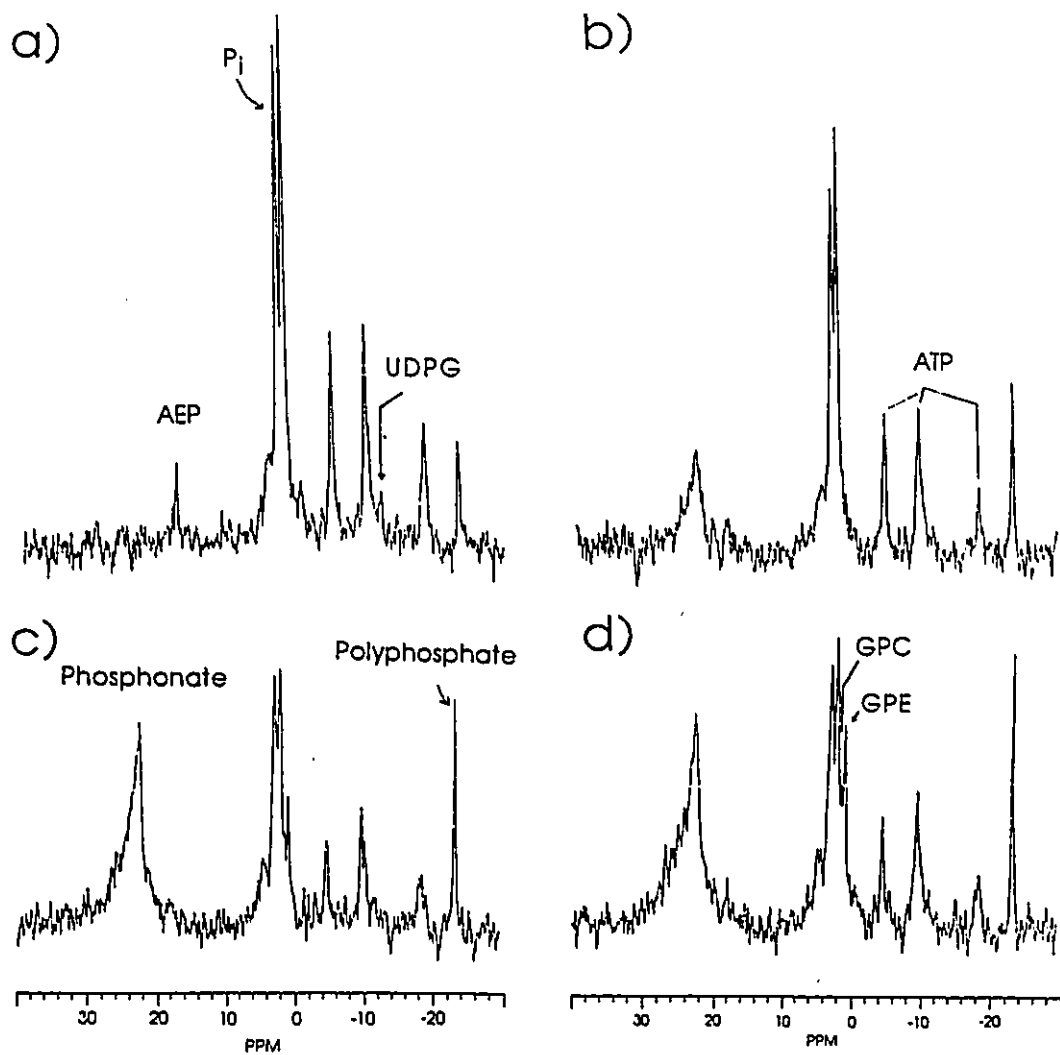


FIG. 7.8. Spectre RMN de ^{31}P de cellules à différentes étapes de l'enkystement.

Les spectres correspondent dans l'ordre à ceux indiqués par un astérisque à la Figure 7.7.

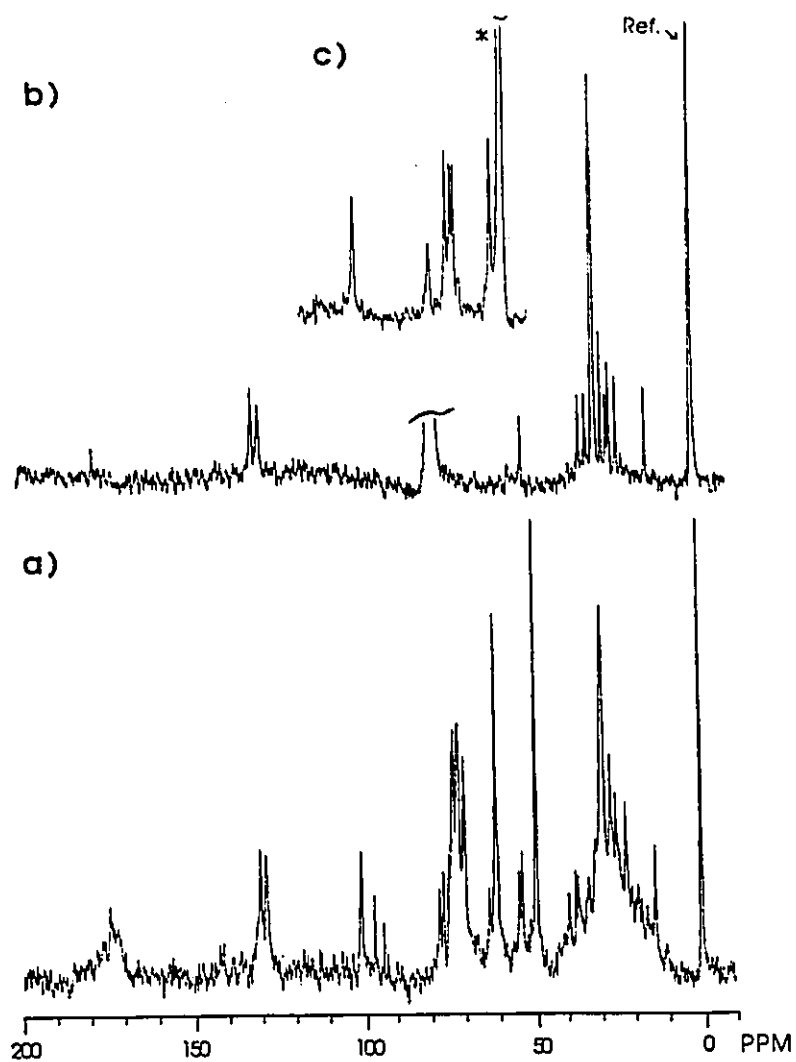


FIG. 7.9. Spectres RMN de ^{13}C de cellules et d'extraits.

- a) Cellules récoltées à la phase stationnaire, lyophilisées et remises en suspension dans du D_2O ;
b) Extrait Bligh-Dyer des lipides; c) Glycogène isolé des cellules (* : EtOH).

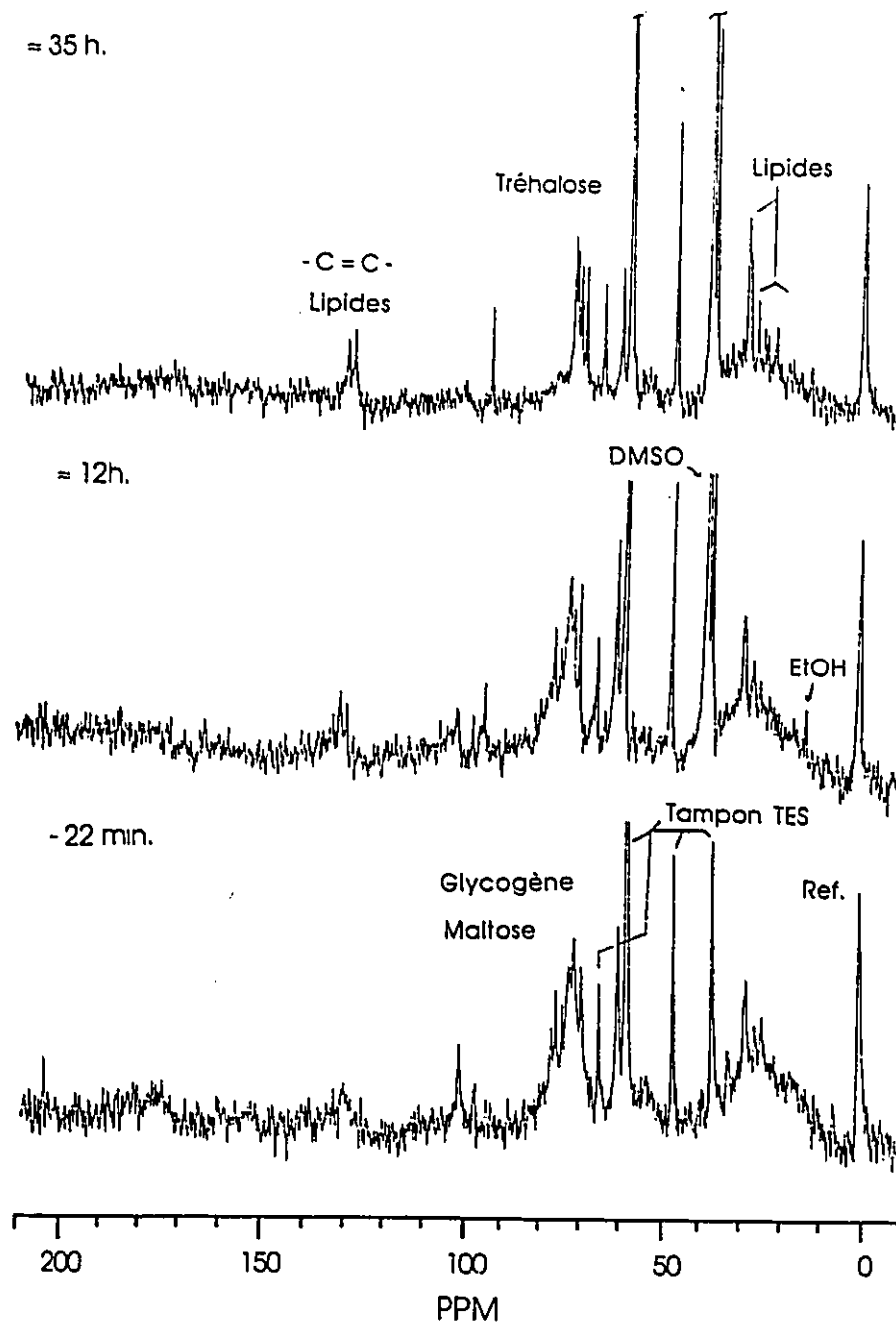


FIG. 7.10. Spectres RMN de ^{13}C à différentes étapes de l'enkystement.

Cellules perfusées dans des fibres à dialyse avec du tampon Na-TES. L'enkystement est induit au temps $t = 0$ par l'ajout de DMSO au perfusat. (FS: 90.56, AP: 60° ; TR: 1.0 sec.; NA: 3600; ER: 15 Hz)

de l'inducteur. Comme on peut le voir, les cellules trophozoïtes sont très riches en glycogène. Lors de l'induction, aucun changement majeur n'est immédiatement visible. Une série de signaux attribuables au maltose se distingue graduellement alors que les raies du glycogène diminuent d'intensité. Le signal du maltose n'atteint cependant pas une proportion importante. Une faible quantité de tréhalose apparaît aussitôt après l'induction. Par la suite, le niveau de tréhalose demeure constant pour environ 20 heures. La transformation du glycogène en tréhalose est active surtout durant la période de 16 à 24 heures après l'induction. A la fin de cette période de transformation, aucun autre sucre n'est visible dans les cellules. La quantité de tréhalose obtenue dans les expériences de perfusion est cependant moindre que celle obtenue lors de l'enkystement dans les flacons de culture. Les conditions de perfusion ne sont peut-être pas optimales pour l'enkystement.

Au cours de plusieurs expériences de perfusion, la libération d'éthanol dans le milieu a été observée. Cette observation suggère un apport d'oxygène limité devant un besoin accru en énergie pour le processus d'enkystement. La production d'éthanol par cet organisme n'a pas été décrite précédemment. Lors de l'enkystement, l'éthanol se forme de façon continue mais elle est beaucoup plus active lors des périodes entre 8 - 12 heures et de 20 - 24 heures. Ces périodes correspondent respectivement à l'élaboration de la paroi de phosphonate et à la synthèse de cellulose. La

formation d'éthanol n'a jamais été détectée lors de l'enkystement dans des flacons de culture.

Au cours de l'enkystement, les signaux caractéristiques de chaînes acyles de lipides augmentent. Comme pour l'éthanol, l'augmentation se fait de façon continue mais un accroissement plus élevé est observé durant la période de 8 - 12 heures. A cause de leur mobilité restreinte, les lipides présents dans les membranes présentent habituellement en RMN de ^{13}C des raies très larges. Les raies fines que nous observons proviennent plutôt de gouttelettes lipidiques que les cellules recèlent en phase stationnaire (Bowers et Korn, 1969).

7.4 Séquence des événements

Comme le montre la Figure 7.11, l'enkystement est un processus fonctionnant par étapes. Les périodes de 8 - 12 heures et de 20 - 24 heures sont celles où surviennent les plus grands changements. Dans les cultures synchronisées, l'enkystement semble s'effectuer selon un horaire bien établi. Les séquences d'événements publiées par Bowers et Korn (1969), par Neff et Neff (1969), ainsi que celles d'autres groupes correspondent temporellement à nos propres expériences.

Un des premiers effets de l'induction, observé par RMN de ^{31}P , est l'apparition d'AEP. Ce composé est habituellement présent ainsi qu'une plus faible quantité d'un composé indentifié comme étant le 1-hydroxy-2-aminoéthylphosphonate

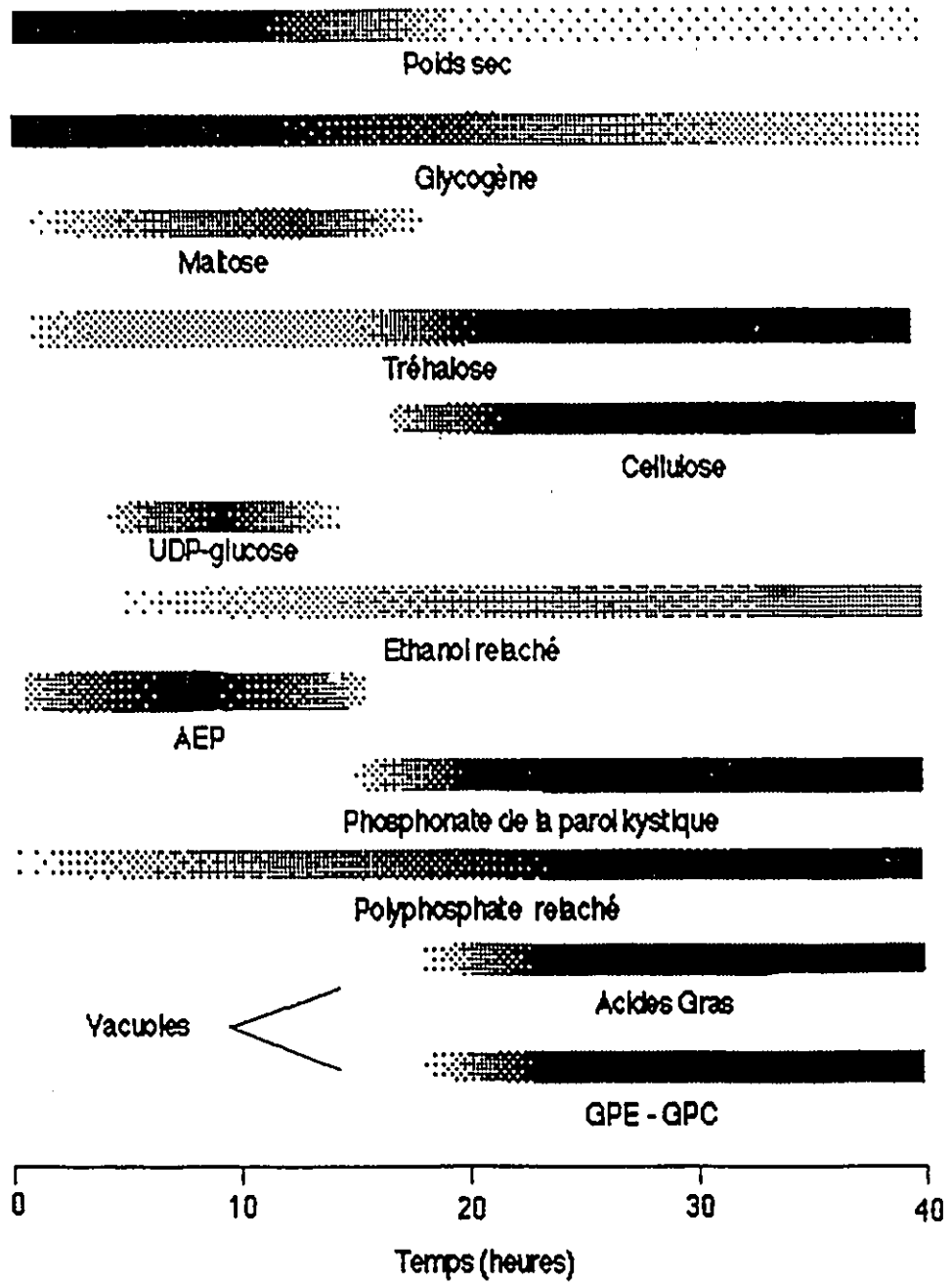


FIG. 7.11. Evénements du processus d'enkystement chez *Acanthamoeba castellanii* en fonction du temps.

(Fig. 6.6). Deslauriers *et al.* (1982a, 1982b) ont montré que ces produits sont présents dans les constituants de la paroi kystique. Dans nos expériences, la disparition du signal de RMN de l'AEP au moment même de l'apparition de la paroi de phosphonates suggère l'incorporation de l'AEP dans la paroi.

Tout au long de l'enkystement, les cellules libèrent d'importantes quantités de polyphosphate dans le milieu. Le perfusat ne contenant aucune source de phosphate, la formation de polyphosphate doit se faire à partir des réserves internes disponibles. La présence de polyphosphate est caractéristique de plusieurs organismes (Deslauriers *et al.*, 1980b, 1982a, ainsi que les références mentionnées) tel que les champignons (levures et moisissures), certaines bactéries, et plusieurs organismes supérieurs (insectes et vertébrés). Elle a été observée aussi chez les organismes protozoaires *Euglena* et chez *Amoeba chaos chaos*. L'accumulation cellulaire de polyphosphate est en général observée lorsque la demande d'acides nucléiques par le métabolisme décroît (Harold, 1960, 1966). Chez *Acanthamoeba castellanii*, il est probable que des réserves de polyphosphates soient présentes dans le cytoplasme sous une forme spectroscopiquement invisible, tel que les groupements phosphates de l'ADN et de l'ARN. Nous n'avons cependant aucune preuve à l'appui. Les chaînes de polyphosphate libérées sont de poids moléculaires relativement élevés (Deslauriers *et al.*, 1980b, 1982a), ce qui explique l'absence, en RMN de ^{31}P de signaux caractéristiques des groupements phosphates terminaux. Le polyphosphate est en

général considéré comme étant une réserve de phosphate inorganique permettant de prévenir les changements brusques dans les niveaux de phosphate inorganique et de pH qui peuvent survenir au cours d'activités cataboliques de la cellule. L'accumulation de phosphate sous la forme polymérique minimise de plus le déséquilibre osmotique cellulaire. Les polyphosphate semble aussi jouer un rôle important dans la synthèse d'ARN messenger, des ribosomes et de plusieurs intermédiaires importants de la germination des spores (Harold, 1966). Il est possible que le polyphosphate soit utilisé comme source de phosphore pour la synthèse de la paroi kystique. Bien qu'une grande quantité de polyphosphate soit libérée dans le milieu de culture, il n'est pas exclu qu'une certaine quantité reste présente dans les kystes matures et soit utilisée pour la germination.

Le métabolisme des hydrates de carbone ressemble en plusieurs points à celui des champignons (levures et moisissures). La Figure 7.12 présente un modèle des sentiers métaboliques utilisés par *Acanthamoeba castellanii*. Le glycogène est accumulé activement dans les cultures en phase de croissance logarithmique. A la phase stationnaire, les réserves de glycogène sont lentement dégradées. Le maltose est alors visible dans les extraits cellulaires. Lors de l'enkystement, l'augmentation de maltose observée quelques heures après l'induction est le résultat de la dégradation massive du glycogène. Le maltose servira par la suite de

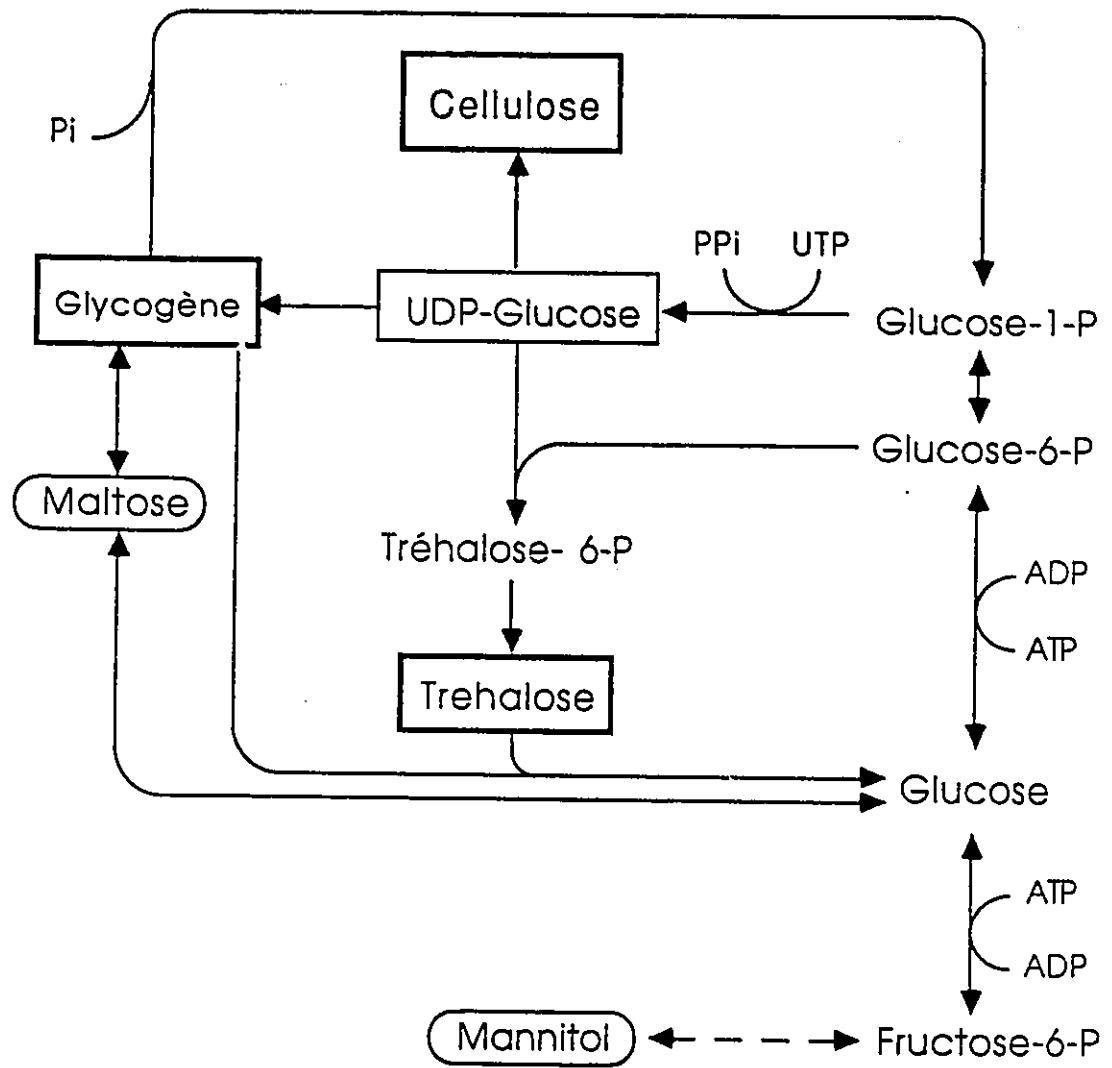


FIG. 7.12. Sentiers métaboliques des hydrates de carbone chez *Acanthamoeba castellanii*.

source d'énergie pour l'enkystement. Il sera transformé en glucose, puis oxydé. Le maltose est aussi le précurseur de la synthèse du tréhalose et probablement aussi de la cellulose. Comme nous l'avons mentionné précédemment, il semble que le maltose puisse se transformer directement en tréhalose (Section 6.3.3). Cependant, la voie normale de transformation s'effectue via le glucose, le glucose-6-phosphate et le glucose-1-phosphate. Le glucose-1-phosphate est d'ailleurs un composé d'importance dans les amibes (Fig. 6.6, 6.7). L'UDP-glucose, peu visible par RMN de ^{31}P , s'accumule en parallèle avec le maltose. L'UDP-glucose est l'élément central du processus de transformation puisqu'il est le substrat immédiat du glycogène, du tréhalose et de la cellulose. Dès le début de la synthèse du tréhalose, les signaux du maltose et de l'UDP-glucose redeviennent trop faibles pour être observés par RMN.

Selon les expériences effectuées dans le système de perfusion, on retrouve jusqu'à 0.05% d'éthanol dans le perfusé à la fin du processus d'enkystement. L'éthanol n'est pas présent dans le milieu de culture des cellules enkystées dans des flacons de culture. Il est possible que l'apport d'oxygène par le système de perfusion soit limité dans certaines régions du tube RMN. Dans le cas des filaments d'agarose, les cellules au centre des fibres peuvent avoir un apport d'oxygène plus limité que celles en périphérie. Dans le cas des perfusions à l'aide des fibres de dialyse, il est fort probable que ce soit le cas des cellules près des

ficelles d'attache de fibres (Fig. 5.3). Alors que l'enkystement produit une demande accrue d'énergie, les cellules limitées en oxygène utilisent la glycolyse anaérobie pour combler le manque d'énergie. L'éthanol est entièrement synthétisé à partir des constituants intracellulaires puisque aucune source externe de substrat n'est nécessaire à sa production. Nous avons estimé que la quantité d'éthanol retrouvée correspond à la transformation de 200 à 400 fmoles de glucose. Ces valeurs correspondent à la presque totalité des réserves de glycogène que l'on retrouve dans les cellules à l'état végétatif. L'éthanol produit correspond à environ 5 - 10% du poids sec des cellules. *Acanthamoeba castellanii* possède le système enzymatique nécessaire à la production d'acide lactique à partir de plusieurs intermédiaires glycolytiques (Prescott et al., 1973). Il est probable que tout comme la formation d'acide lactique, celle de l'éthanol ne se fasse pas uniquement à partir des réserves de glycogène.

L'activité du lactate déshydrogénase (LDH) et de l'alcool déshydrogénase (ADH) a été mesurée à différents stades de la croissance d'*Acanthamoeba castellanii*. En début de phase logarithmique, l'activité de ces enzymes est inférieure à 10 unités (une unité étant définie dans nos expériences comme le nombre de nmoles de substrats converties/mg de protéine/min à 25°C). L'activité de ces enzymes augmente avec la densité cellulaire. A la phase stationnaire, l'activité de la LDH varie entre 20 et 50 unités alors que celle de l'ADH se situe

entre 40 et 120 unités. Aucune expérience ne nous a permis de démontrer l'utilisation de substrats externes pour la formation d'éthanol. Des expériences de perfusion où l'oxygène est remplacé par de l'azote nous ont montré que la formation d'éthanol se révèle très faible en anoxie totale. Afin de constater l'effet de l'oxygénation sur la production d'éthanol et de lactate, nous avons incubé différents volumes de cultures cellulaires dans des éprouvettes. L'apport d'oxygène est déterminé par la surface de l'interface air/milieu et par le volume de culture. Les résultats sont présentés à la Figure 7.13. Cette expérience, bien que non répétée, nous montre que la production d'éthanol est optimale dans une zone relativement étroite de tension d'oxygène. Selon le Dr. H. Lee (communication personnelle), la présence d'une faible quantité d'oxygène est souvent nécessaire au fonctionnement de la fermentation alcoolique chez les levures. Chez *Acanthamoeba castellanii*, la formation d'éthanol prédomine sur celle de l'acide lactique.

Au cours des 8 premières heures de l'enkystement, les vacuoles disparaissent. Cette perte est suivie par une augmentation de la quantité d'autolysosomes (vacuoles contenant des débris cytoplasmiques) et de la quantité de gouttelettes lipidiques nettement visibles par microscopie (Bowers et Korn, 1969). L'augmentation des signaux, observée en RMN de ^{13}C et attribuable aux chaînes acyles de lipides, correspond assez bien avec la formation des gouttelettes de lipides dans le cytoplasme. Les lipides des membranes sont

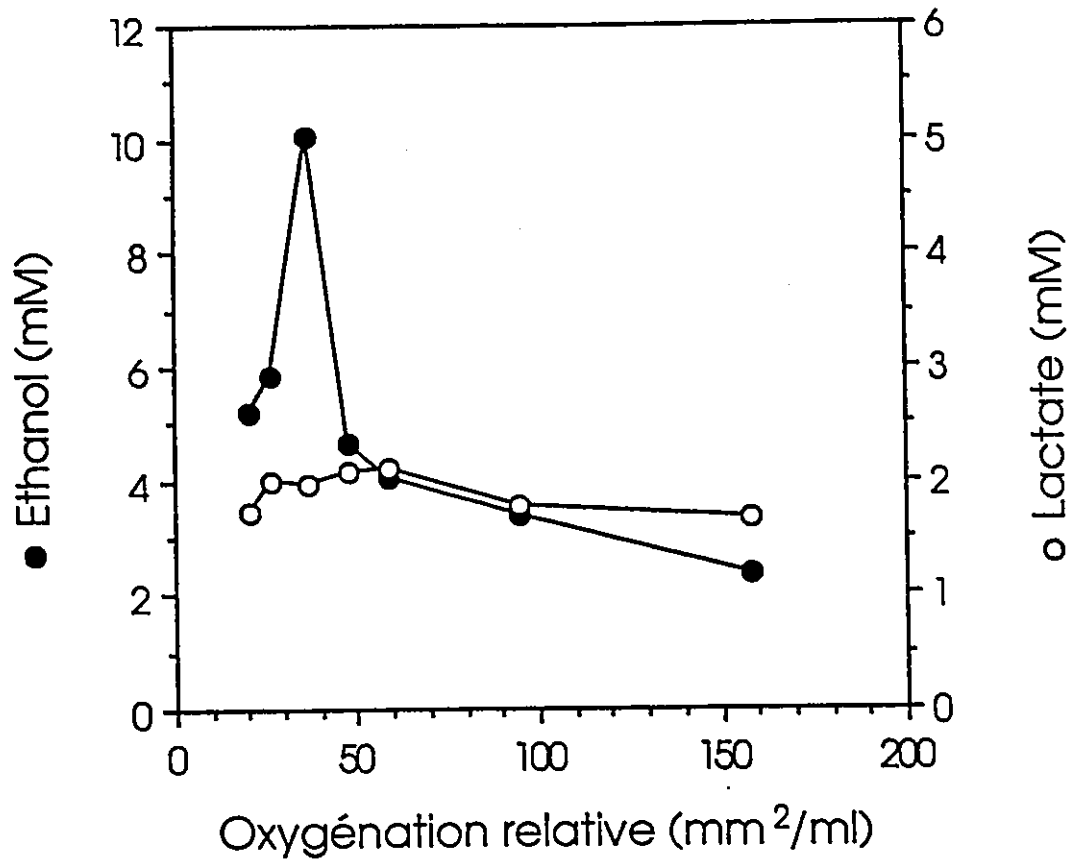


FIG. 7.13. Production de lactate et d'éthanol après 22 heures d'anoxie partielle.

Les conditions expérimentales sont décrites dans le texte. Au temps $t = 0$, les concentrations de lactate et d'éthanol présentes sont respectivement 1.17 et 1.91 mM.

relativement peu mobiles, ce qui élargit les raies et diminue leur visibilité par RMN. Les chaînes de lipides des gouttelettes se situent dans un environnement beaucoup plus fluide, permettant d'obtenir des raies étroites et bien visibles. Ainsi, bien que durant les 24 premières heures de l'enkystement, environ 30% des lipides totaux disparaissent, la RMN de ^{13}C montre une augmentation de la quantité de signaux associés aux chaînes lipidiques simplement due à une augmentation de leur visibilité. La formation de GPC et de GPE est probablement le résultat de la dégradation de l'excédent membranaire contenu dans les cellules.

7.5 Le pH durant l'enkystement

Le pH est un des facteurs considérés comme pouvant être responsable de la différenciation cellulaire chez plusieurs organismes (Section 6.5). Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons mesuré les changements de pH intracellulaire lors de l'enkystement. Le pH_i est calculé à partir du déplacement chimique de la raie de P_i (Section 5.4). La méthode permet de mesurer de très faibles changements de pH mais ne permet pas d'obtenir de valeurs absolues précises. La Figure 7.14 montre les fluctuations de pH observées au cours d'une expérience d'enkystement. Le transfert des cellules dans le milieu inorganique n'induit pas de changement visible de pH. Par contre, l'induction de l'enkystement par l'ajout de Mg^{2+} ou de DMSO provoque en général une légère augmentation du pH_i . Par la suite, durant tout le processus d'enkystement, des

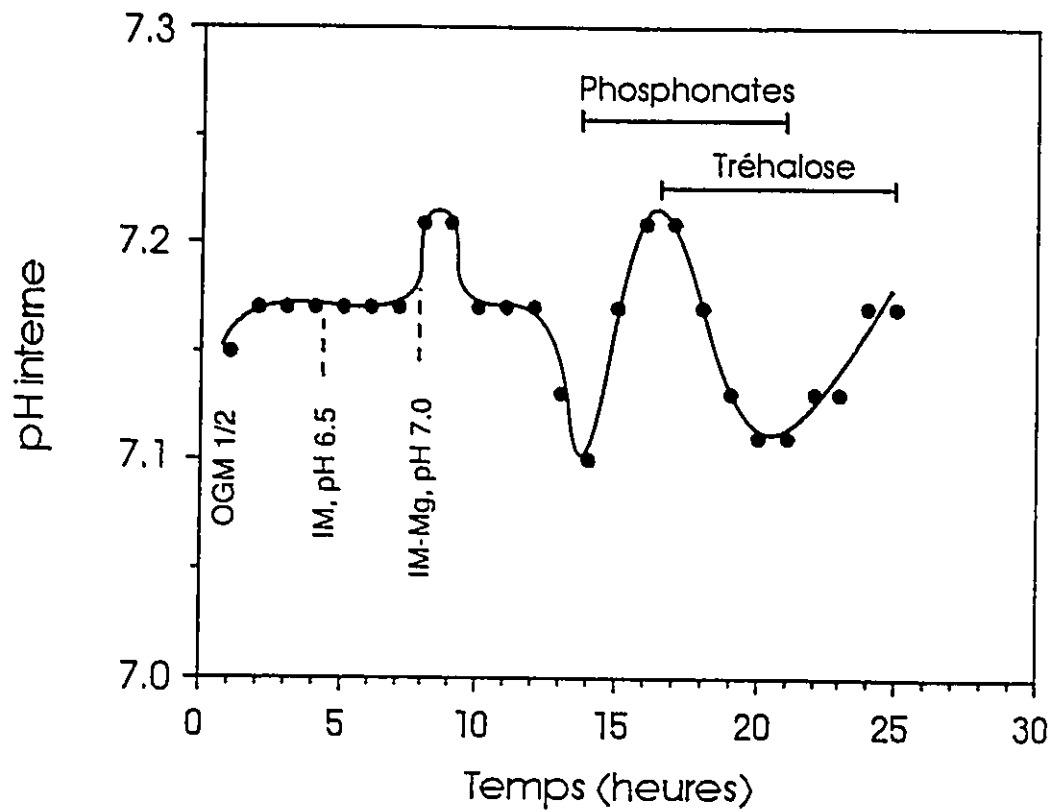


FIG. 7.14. Fluctuations de pH observées au cours de l'enkystement.

fluctuations de pH de ± 0.1 sont observées. Bien que dans l'ensemble des expériences, un certain modèle semble gouverner ces fluctuations, les résultats ne sont pas toujours reproductibles (en temps ou en intensité). La précision des résultats obtenus est souvent compromise par l'interférence d'une raie non-identifiée. Quoiqu'il en soit, il est difficile d'expliquer comment de telles fluctuations pourraient gouverner le processus d'enkystement. Les variations observées semblent plutôt être une conséquence de l'activité métabolique intracellulaire.

7.6 Utilisation de marqueurs dans l'étude de l'enkystement

7.6.1 Introduction

Puisque les cellules trophozoïtes sont riches en glycogène, on peut supposer que le tréhalose produit à l'enkystement est dérivé directement des unités glycosyles du glycogène. Pourtant, nos calculs ont montré que les réserves de glycogène ne sont pas suffisantes pour fournir à la fois l'énergie au processus d'enkystement et les substrats nécessaires à la synthèse de la cellulose et du tréhalose. Les expériences suivantes ont été effectuées afin confirmer ces affirmations.

7.6.2 Croissance des cellules sur ^{13}C -1-glucose

Dans l'expérience suivante, nous avons voulu incorporer spécifiquement de l'isotope ^{13}C au glycogène, afin d'en déterminer la proportion transformée en tréhalose. Selon nos

études, la synthèse du glycogène est beaucoup plus active lors de la phase de croissance logarithmique qu'au cours de la phase stationnaire où il est lentement dégradé. Nous avons donc fait croître des cellules sur du ^{13}C -1-glucose (90.7 atome %; 100 mg/100 ml de milieu OGM). Afin de combler la carence en carbone, de favoriser la conversion du glucose en glycogène et de bloquer dans la mesure du possible les autres sentiers de dégradation du glucose, on a ajouté au milieu de culture du glycérol (500 mg/100 ml) et de l'acétate (acétate \cdot 3 H_2O : 500 mg/100 ml). Les cellules ont une croissance limitée sur ces substrats. La densité des cellules au plateau atteint 2×10^6 cellules/ml, ce qui est suffisant pour nos expériences. La moitié de la culture fut recueillie pour l'analyse du glycogène. L'enkystement a été induit sur le reste de la culture. Le glycogène des trophozoïtes et le tréhalose des kystes âgés de 48 heures furent extraits et purifiés lorsque nécessaire. Le glycogène fut dégradé en glucose par réaction enzymatique à l'aide d'une α -glucosidase. Des spectres RMN de ^{13}C de sucres extraits et de solutions standards ont été obtenus avec les mêmes conditions spectroscopiques (Fig. 7.15 et 7.16). En comparant la hauteur des pics du glucose marqué à un composé de référence (en abondance naturelle), nous avons pu établir la distribution relative des atomes de ^{13}C dans les sucres étudiés. En posant l'hypothèse que seules les positions C-1, C-3, C-4, C-6 sont susceptibles d'être enrichies et en portant les valeurs des carbones C-2 et C-5 comme étant en abondance naturelle

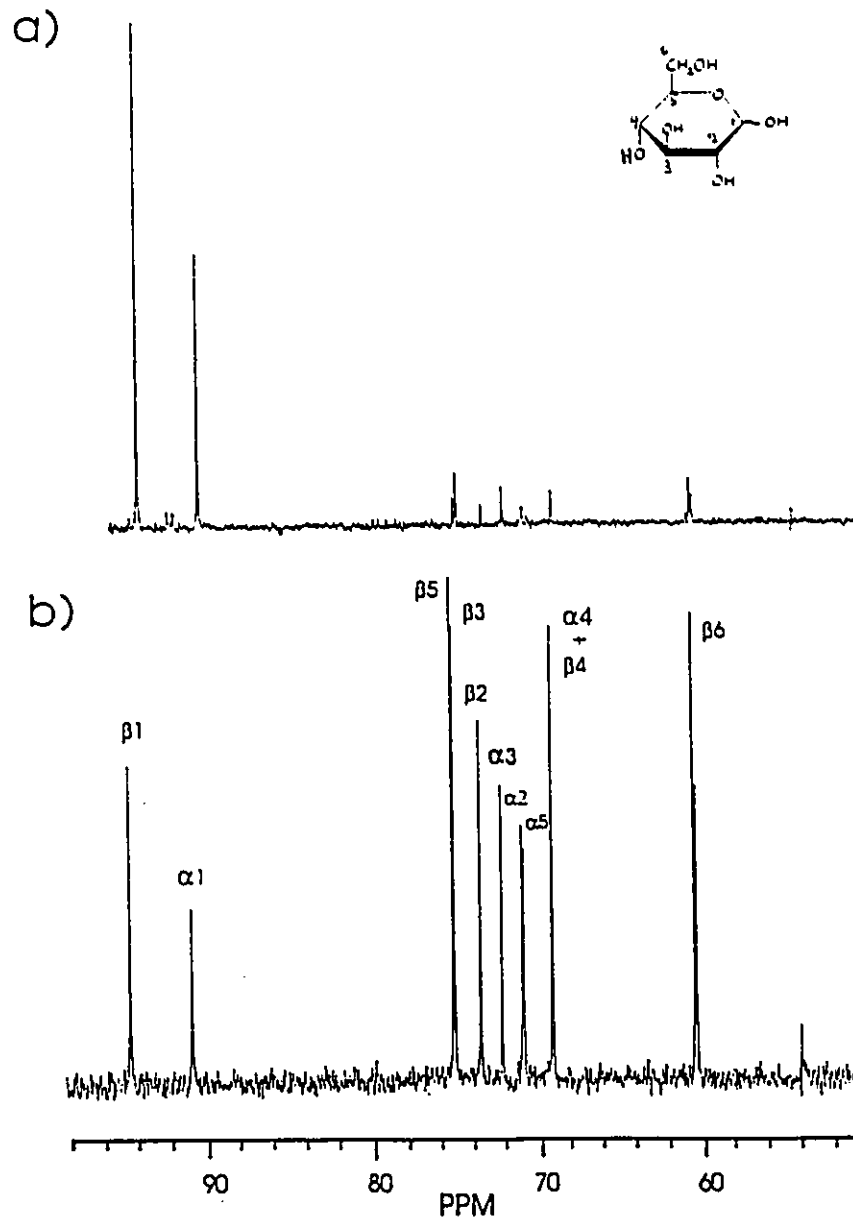


FIG. 7.15. Spectres RMN de ^{13}C du glucose a) provenant du glycogène des cellules cultivées sur ^{13}C -1-glucose et b) en abondance naturelle.

(FS: 50.32 MHz; AP: 45°; TR: 2 sec.; DW; ER: 1.0 Hz; NA: a) 2691, b) 18331)

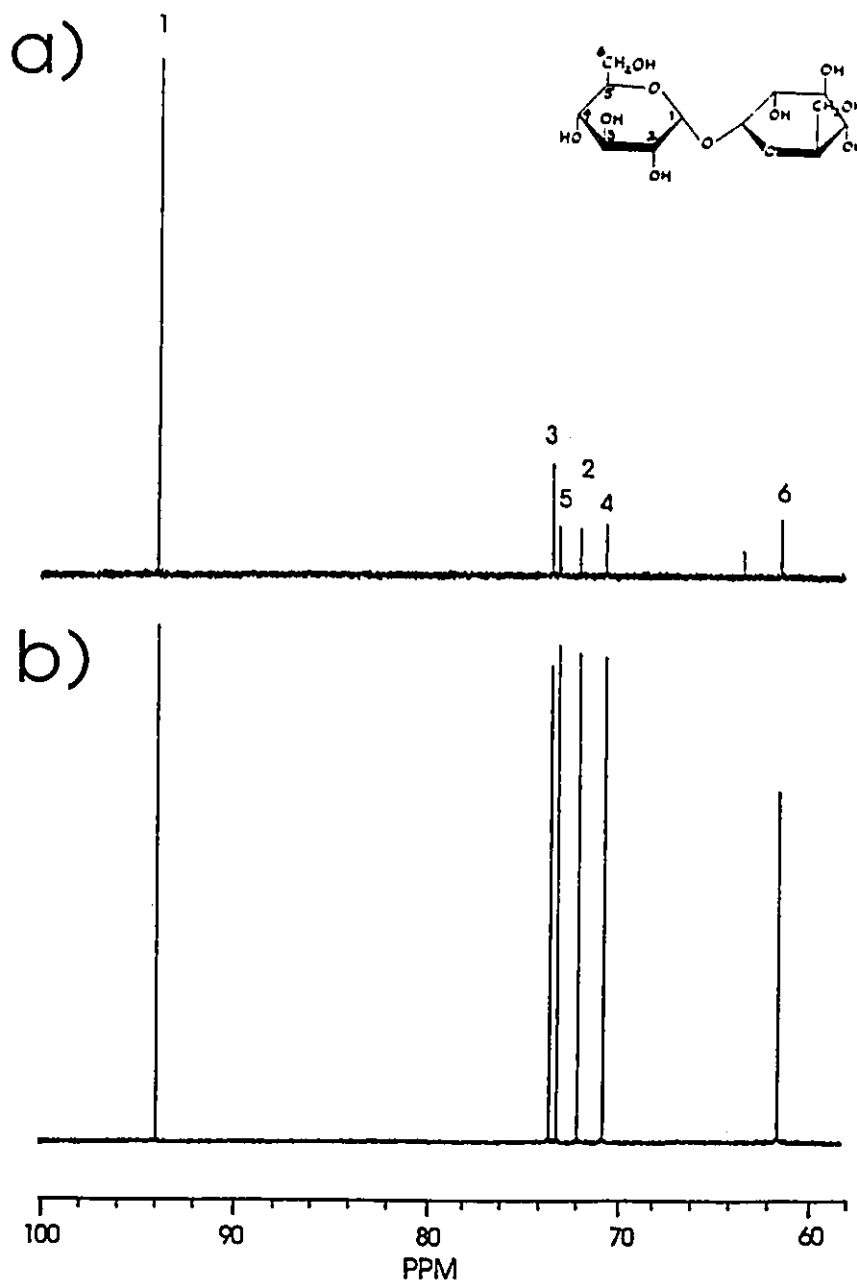


FIG. 7.16. Spectres RMN de ^{13}C du tréhalose a) extrait de cellules après croissance sur ^{13}C -1-glucose et b) en abondance naturelle.

La raie à 62.5 ppm représente les carbones C-1 et C-3 du glycérol contaminant. (FS:125.76; AP:45°; DW; TR:2.0 s.; ER:0.7 Hz; NA a) 6850, b) 155)

(1.11%), nous obtenons les résultats illustrés dans le Tableau 7.1. Les résultats montrent que l'enrichissement en isotope ^{13}C des unités glycosyles est d'environ 30% pour la position C-1. Un faible enrichissement a été aussi observé en positions C-3 et C-6.

Le tréhalose possède le même patron de marquage que le glycogène. La position C-1 et de façon beaucoup moins importante, les positions C-3 et C-6, contiennent une quantité d'isotope ^{13}C bien au dessus de l'abondance naturelle. En supposant que le glycogène soit l'unique source de marqueur, environ 40% du glycogène fut transformé en tréhalose dans cette expérience. Ces valeurs correspondent assez bien avec les expériences d'enkystement qui montrent que la quantité de glycogène présent est insuffisante pour fournir les unités glycosyles pour la formation de cellulose et de tréhalose lors de l'enkystement. Avant l'enkystement les réserves de glycogène se situent à environ 200 fmoles/cellule d'unités glycosyles. Une partie importante, plus de 50%, est utilisée dans les premières heures de l'enkystement comme source d'énergie. Il reste donc tout au plus 100 unités disponibles. Au cours d'une expérience typique, environ 450 unités glycosyles sont nécessaires pour la synthèse du tréhalose et de la cellulose. Approximativement, 20 - 25% des unités proviennent donc probablement du glycogène.

Le marquage du glucose en position C-6 s'explique assez bien à l'aide du sentier de la glycolyse. La dégradation du

TABLEAU 7.1. Incorporation du ^{13}C -1-glucose dans le tréhalose et le glycogène.*

position	abondance (%) en isotope ^{13}C	
	glycogène	tréhalose
1	29.42	12.10
2	1.11	1.24
3	2.21	2.88
4	1.33	1.11
5	1.42	1.11
6	1.79	1.82

^{13}C -1-glucose en 3-phosphoglyceraldéhyde et en dihydroxyacétone phosphate suivi de la rétrosynthèse du glucose produit du glucose marqué indifféremment soit en position C-1 ou C-6. Deux possibilités peuvent expliquer la présence de marqueur en position C-3. La plus simple est celle d'un équilibre entre le 3-dihydroxyacétonephosphate et le glycérol (Mackenzie et al., 1982). Le degré d'enrichissement en position C-3 dépend alors de l'équilibre de la réaction entre les deux produits. La seconde possibilité fait intervenir le cycle du glucuronate (Fig. 7.17) et la voie des pentoses phosphates. Le cycle du glucuronate est actif dans le foie de mammifère (Touster et Shaw, 1962). La littérature ne nous a cependant pas permis de déterminer si le cycle du glucuronate est actif chez les microorganismes. Dans ce cycle, le ^{13}C -1-glucose est

transformé en ^{13}C -1-D-xylose-5-phosphate avant d'entrer dans la voie des pentoses. La transformation de ce dernier en ribulose-5-phosphate et la combinaison avec une autre unité de xylulose-5-phosphate permet d'obtenir du sedoheptulose-7-phosphate marqué en positions C-1 et C-3. Ce dernier sera ultérieurement transformé en glucose marqué en positions C-1 et C-3.

Les résultats montrent que le sentier utilisé est actif non seulement lors de la croissance mais aussi lors de l'enkystement des amibes, puisque contrairement à la position C-1, aucun appauvrissement isotopique n'a été observé en position C-3 des unités glycosyles lors de la formation du tréhalose.

7.6.3 Croissance des cellules sur acétate enrichi

Le sentier du glyoxylate est une forme modifiée du cycle de l'acide citrique; il est présent dans la plupart des microorganismes et des plantes mais absent chez les organismes supérieurs. Sa fonction première est de permettre l'utilisation de l'acétate et des lipides comme sources principales de carbone, particulièrement pour la biosynthèse des sucres à partir d'acides gras. Comme nous l'avons déjà mentionné, ce sentier s'avère actif chez *Acanthamoeba castellanii*, et plusieurs groupes de recherche substituent l'acétate au glucose comme source de carbone dans le milieu de croissance. Dans ces expériences, nous avons tenté de mesurer de façon directe la contribution des constituants autres que

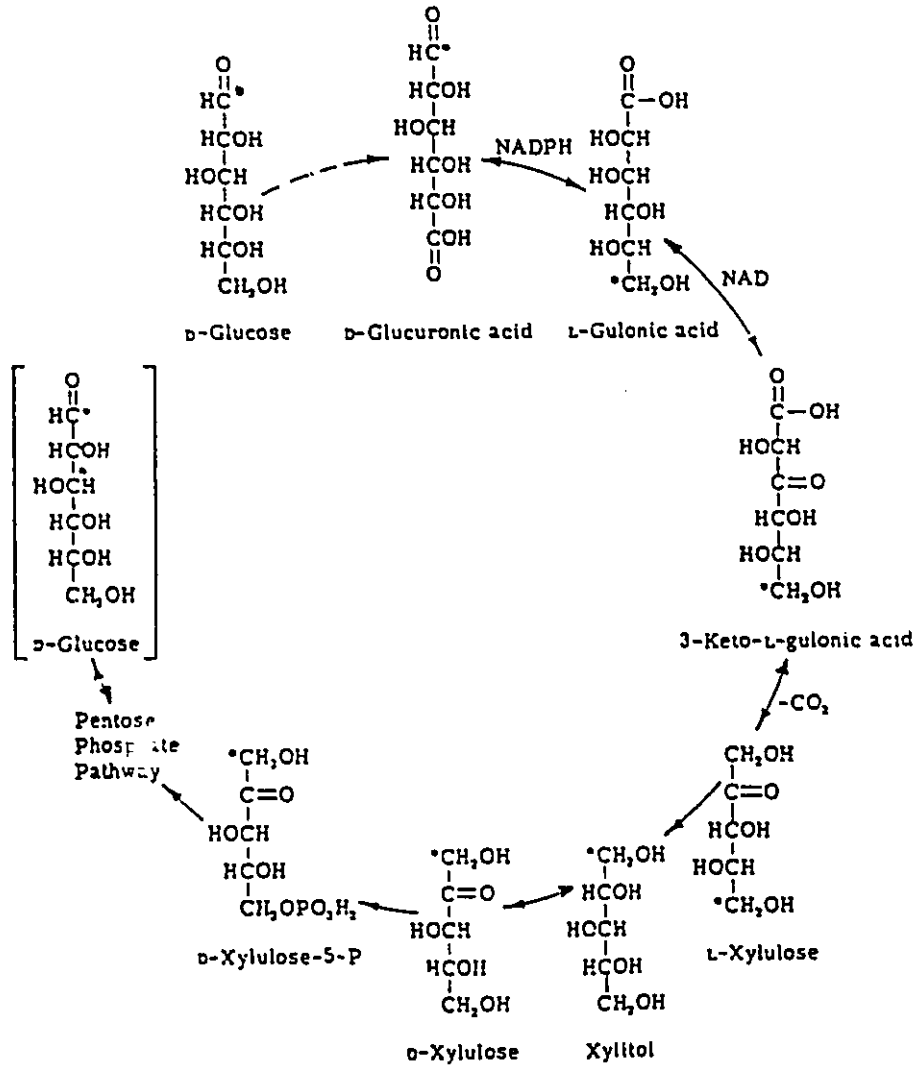


FIG. 7.17. Cycle du glucuronate.

le glycogène à la synthèse du tréhalose.

Dans plusieurs expériences de perfusion, des cellules ont été perfusées avec de l'acétate enrichie isotopiquement en position C-2 (Fig. 7.18). Comme le montre la figure, l'acétate est rapidement assimilé par les cellules. Une partie importante entre dans le cycle de Krebs comme en témoigne l'augmentation des raies associées au glutamate. D'autre part, les signaux associés aux chaînes lipidiques augmentent fortement d'intensité. L'acétate est donc rapidement transformé en lipides entreposés sous forme de gouttelettes visibles par RMN (voir Section 7.3.3). Les expériences de Neff et al. (1958) confirment que la transformation de l'acétate en lipide est en effet rapide.

Nous avons fait croître des cellules sur du glucose, en présence d'acétate marqué au ^{13}C en positions C-1 ou C-2. Dans ces conditions, nous espérons que l'acétate enrichi soit rapidement transformé en lipides et que la présence de glucose bloquerait la synthèse du glycogène à partir de l'acétate. Les Figures 7.19 et 7.20 montrent respectivement les spectres des trophozoïtes et des kystes obtenus après la croissance. Dans les deux cas, le marqueur est surtout incorporé dans les lipides. La Figure 7.21 met en évidence ce fait. Les cellules contiennent une forte proportion de lipides insaturés et polyinsaturés comme en témoignent les raies dans la région de 120 ppm. Lors d'expériences où les cellules ne sont incubées que quelques heures en présence d'acétate enrichi,

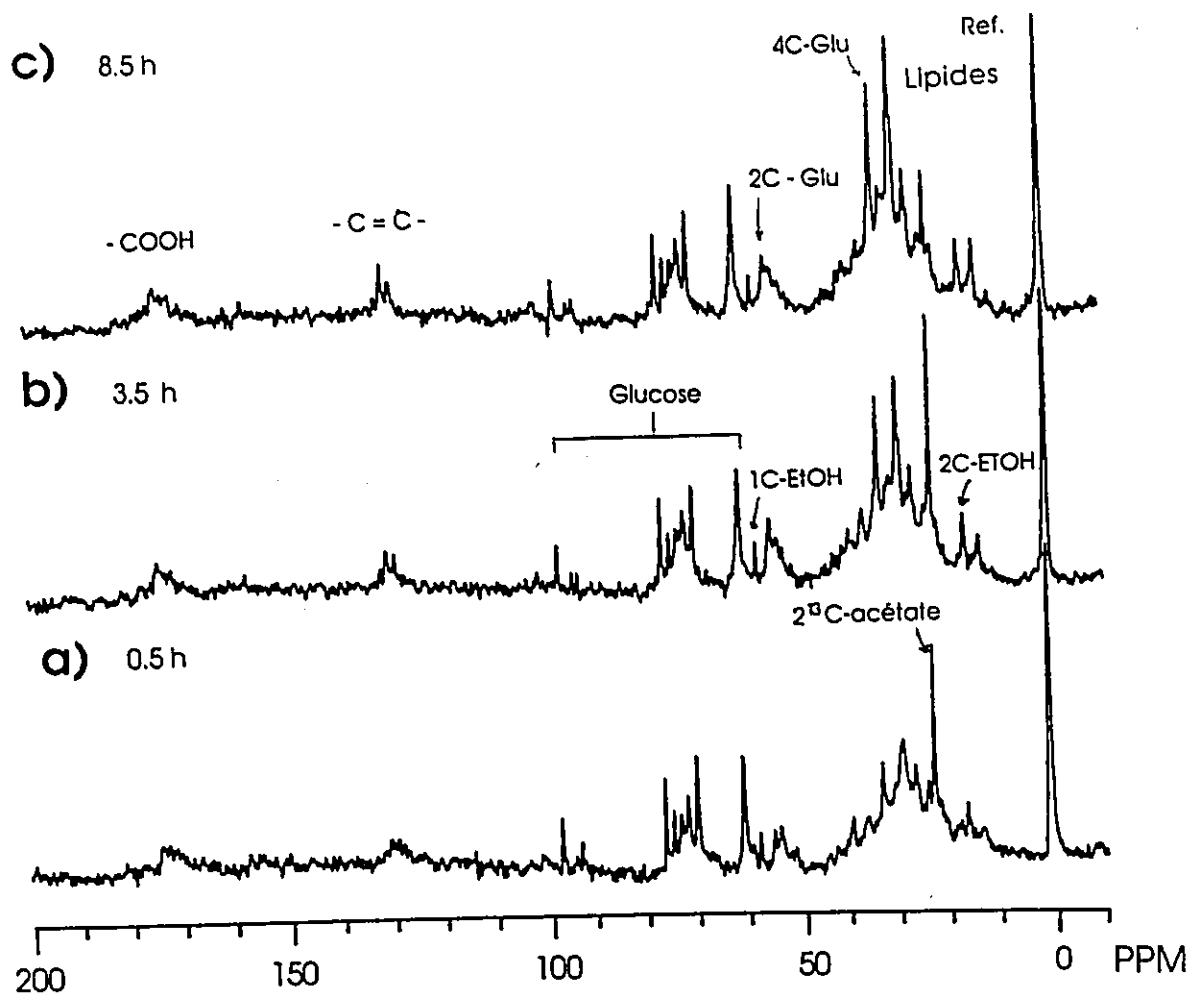


FIG. 7.18. Spectres RMN de ^{13}C de cellules perfusées dans des filaments d'agarose en présence d'acétate enrichi en position C-2.

(FS: 75.46 MHz; AP: 60°; TR: 1.0 sec.; DBL; ER: 15 Hz; NA: 3600)

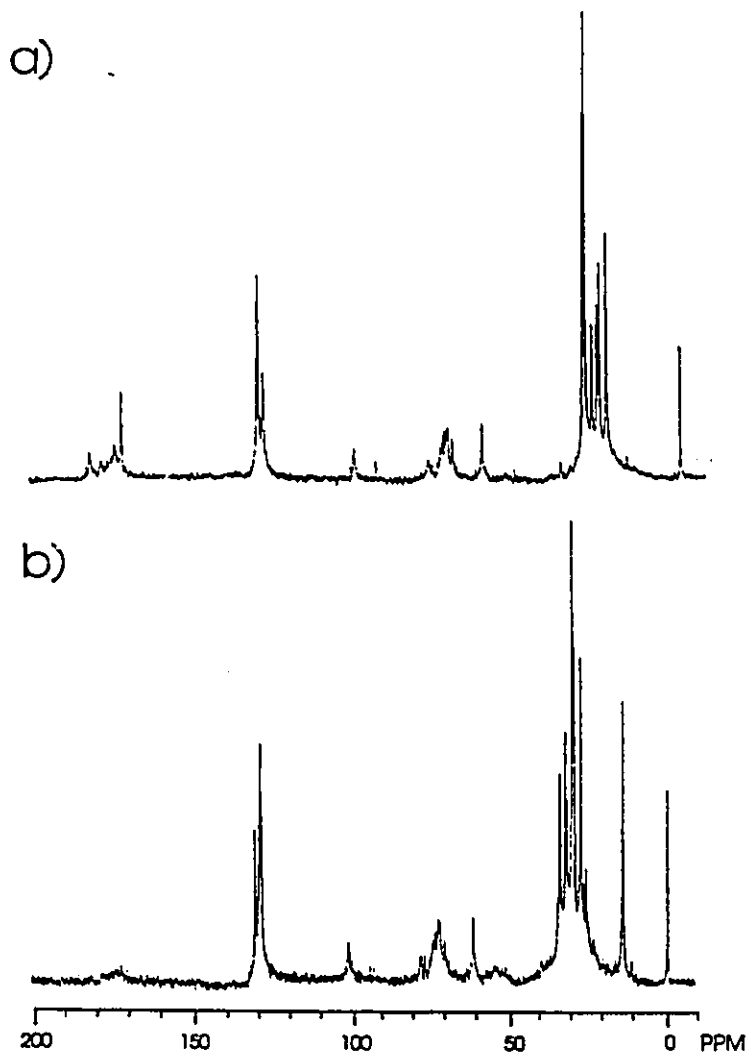


FIG. 7.19. Spectres de RMN de ^{13}C de trophozoïtes après croissance sur a) ^{13}C -1-acétate et b) ^{13}C -2-acétate.

Après croissance, les cellules ont été centrifugées, lavées, et déshydratées. Pour la spectroscopie, les cellules ont été resuspendues dans du D_2O . (FS: 75.46 MHz; AP: 60° ; DBL; TR: 1.0 sec.; NA: 3600; ER: 1 Hz)

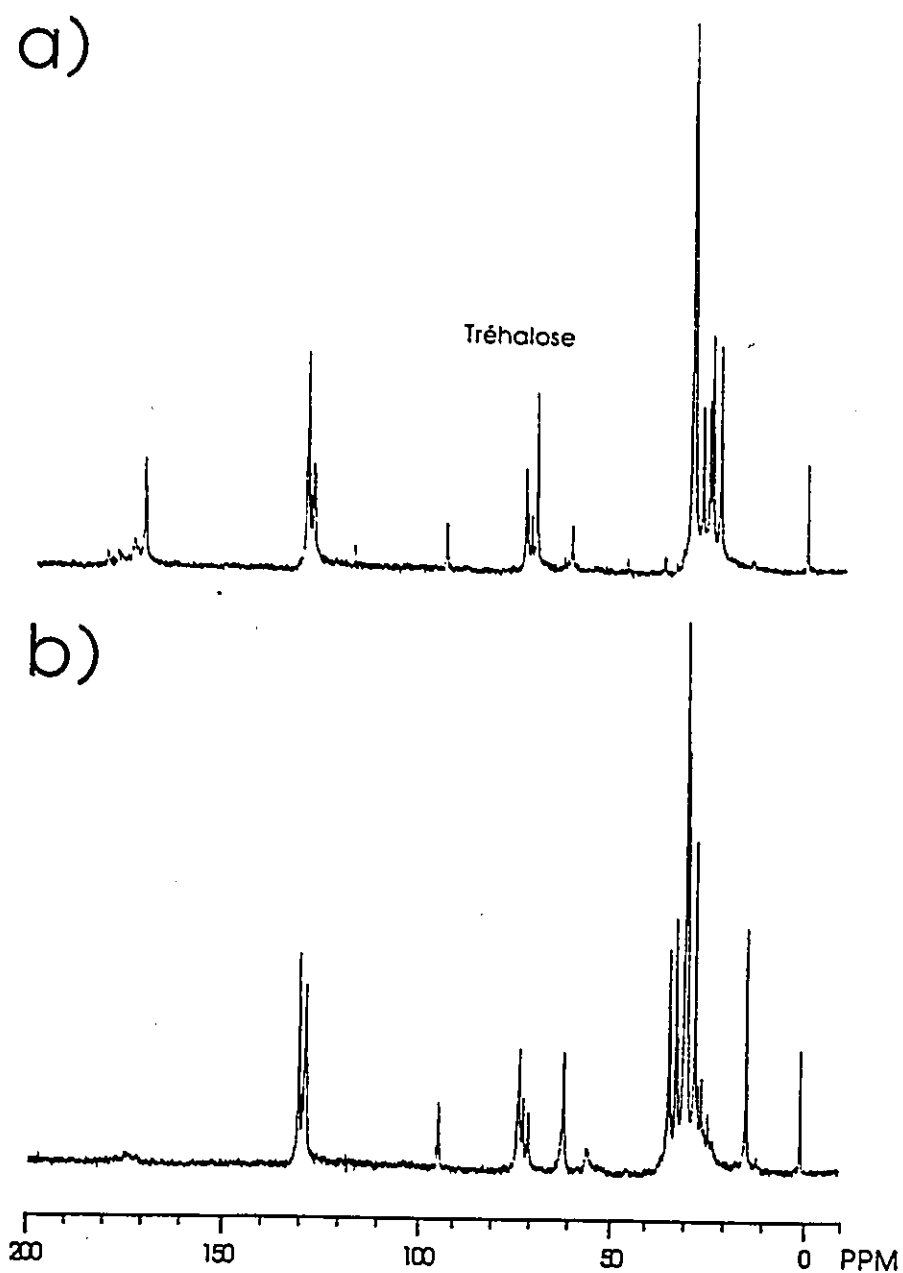


FIG. 7.20. Spectres de RMN de ^{13}C de kystes après croissance sur a) ^{13}C -1-acétate et b) ^{13}C -2-acétate.

Les conditions sont les mêmes qu'à la Figure 7.18.

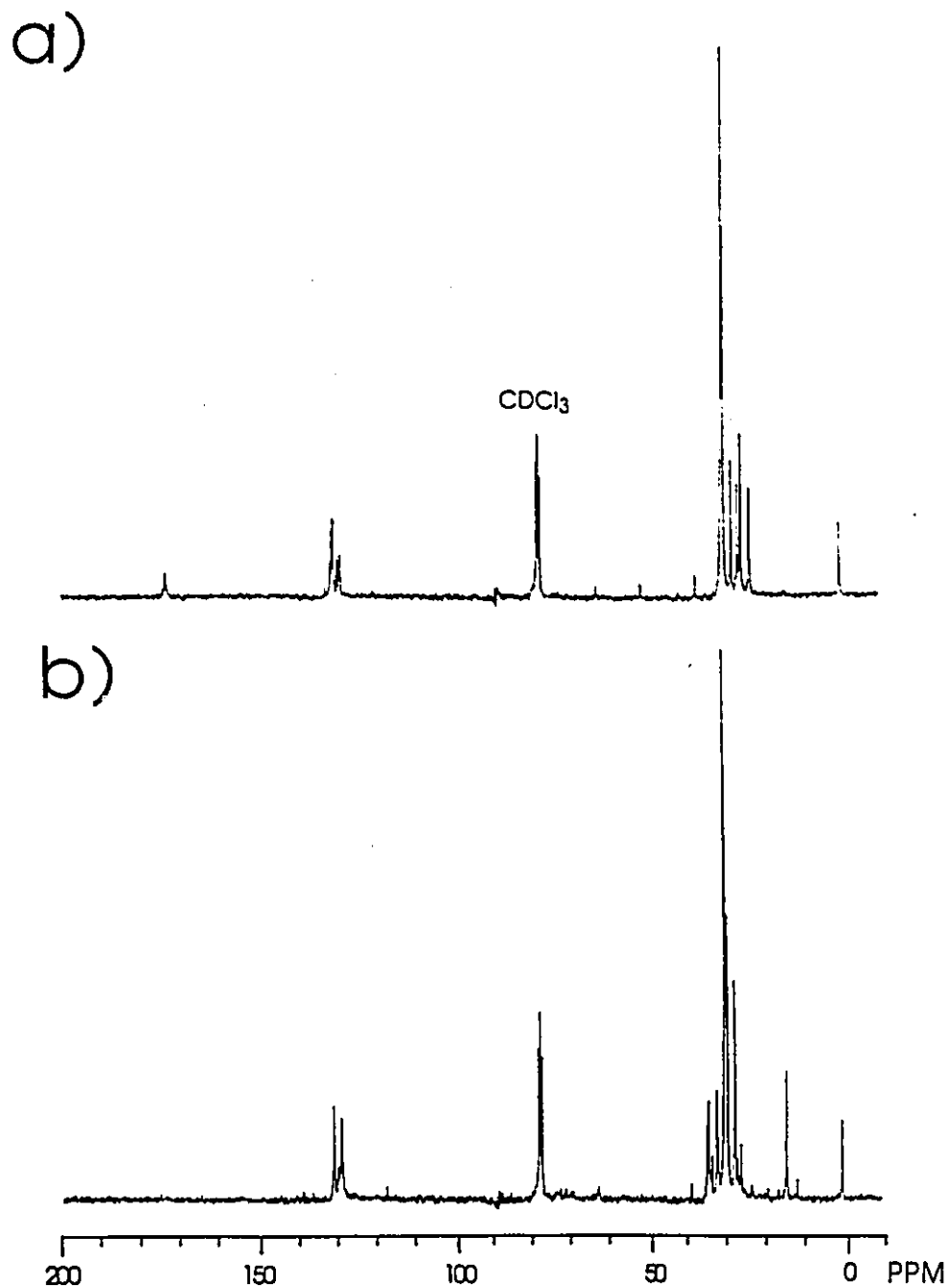


FIG. 7.21. Spectres RMN de ^{13}C d'extraits lipidiques après croissance des cellules sur a) $1\text{-}^{13}\text{C}$ -acétate et b) ^{13}C -2-acétate.

(FS: 75.46 MHz; AP: 60° ; DBL; TR: 1.0 sec.; NA: 3600; ER: 1 Hz)

situé en position C-2 sur l'acétate peut faire aisément le degré d'insaturation des acides gras est beaucoup moins élevé. La différence entre les raies des spectres a) et b) provient du fait que le carbone en position C-1 de l'acétate est principalement incorporé dans les positions impaires des chaînes d'acides gras alors que celui en position C-2 se retrouve aux positions paires. Le taux d'incorporation de l'acétate dans les lipides est très élevé puisque les positions non-enrichies sont à peine visibles. Très approximativement, il se situe à environ 30%.

La Figure 7.22 montre les spectres de tréhalose enrichi en ^{13}C isolé des kystes. L'analyse des dérivés perméthylés du tréhalose par spectrométrie de masse nous a permis d'évaluer le pourcentage total de ^{13}C par molécule de tréhalose. Par RMN, nous avons déterminé le pourcentage relatif d'enrichissement à chaque position. Dû à la technique d'analyse par spectrométrie de masse utilisée (ionisation chimique) et au faible taux d'enrichissement des produits étudiés, les résultats d'analyse présentent souvent des écarts s'élevant jusqu'à 25%. Le Tableau 7.2 montre l'enrichissement des molécules de tréhalose au cours de différentes expériences avec de l'acétate marqué en position C-1 ou C-2. Lors de l'enkystement, le tréhalose démontre une incorporation significative de carbone 13. Dans les expériences avec le ^{13}C -2-acétate, l'incorporation est suffisamment élevée pour observer les couplages carbone-carbone des atomes adjacents.

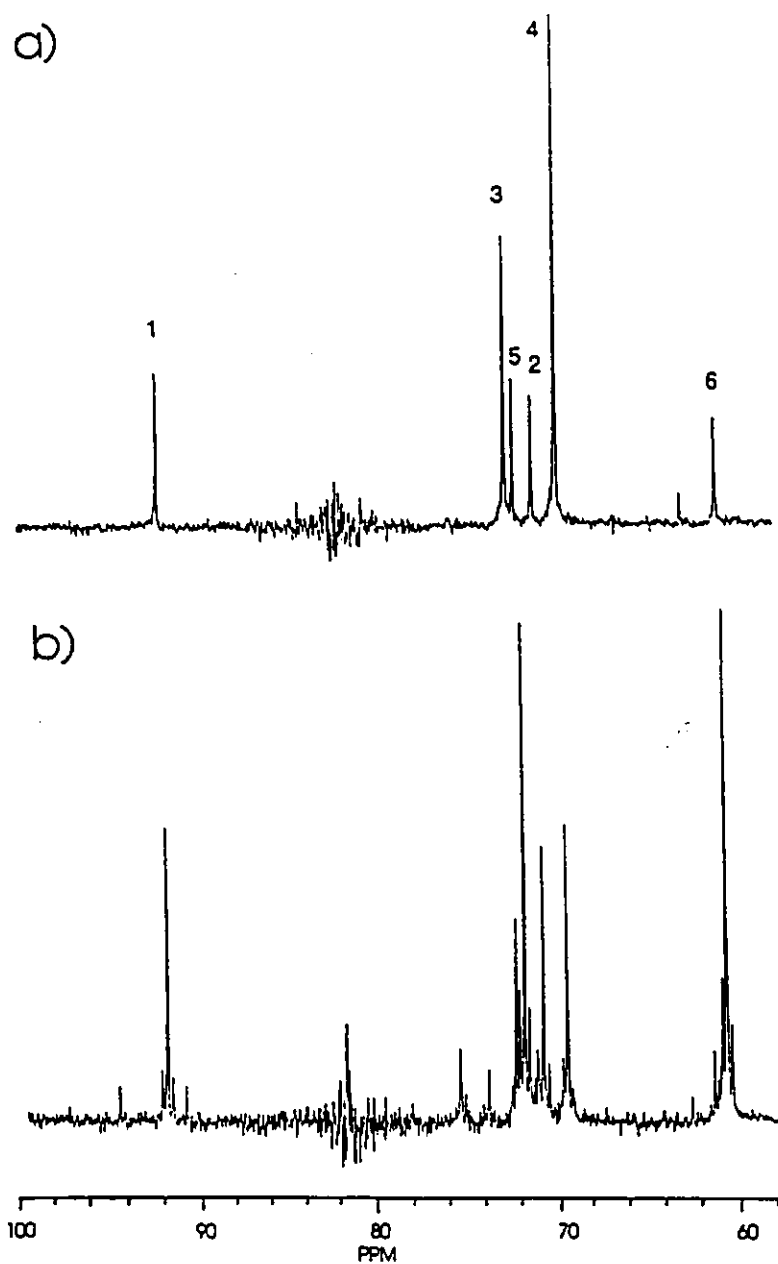


FIG. 7.22. Spectres RMN de ^{13}C d'extraits du tréhalose après croissance des cellules sur a) ^{13}C -1-acétate et b) ^{13}C -2-acétate.

Le glucose est l'impureté présente en b. (FS: 75.46 MHz; AP: 60° ; DBL; TR: 1.0 sec.; NA: 1800; ER: 1 Hz)

TABLEAU 7.2. Incorporation de l'acétate enrichi dans le tréhalose.

exp.	position	¹³ C-1-acétate		¹³ C-2-acétate	
		¹³ C	¹³ C- ¹³ C	¹³ C	¹³ C- ¹³ C
500 mg acétate, 1.0 g glucose, 1.2 × 10 ⁶ cell/ml	C-1	2.0	-	1.3	0.4
	C-2	1.7	-	1.3	0.5
	C-3	3.6	0.4	0.9	0.2
	C-4	6.3	0.5	1.4	0.4
	C-5	1.8	-	2.5	1.1
	C-6	1.6	-	2.7	1.1
200 mg, acétate, 1.5 g glucose, 4.8 × 10 ⁶ cell/ml	C-1	1.2	-	1.2	0.3
	C-2	1.3	-	1.1	0.4
	C-3	1.4	-	0.7	0.3
	C-4	2.6	-	1.0	0.4
	C-5	1.3	-	2.1	1.0
	C-6	1.6(s)	-	2.3	1.1

Les valeurs représentent l'abondance isotopique en ¹³C exprimée en %.

¹³C-1-acétate de sodium (90.0%); ¹³C-2-acétate de sodium (92.8%); s = surestimé dû à la présence d'impuretés.

Au cours de toutes les expériences de marquage avec de l'acétate, nous avons observé que les carbones C-3 à C-6 des unités glycosyles contenaient environ 50% de plus de carbone marqué que le carbone C-1 à C-3. Pour ce type d'expérience, nous n'avons noté aucun précédent dans la littérature. Habituellement, la gluconéogénèse par la voie d'Embden-Meyerhof devrait produire autant de marquage dans la moitié supérieure du glucose qu'en position inférieure. Il faut donc croire qu'une partie importante des carbones de la moitié supérieure des unités glycosyles ne suivent pas le même sentier de synthèse que les carbones de la partie inférieure. Une explication plausible peut être apportée en faisant appel à la voie de pentose phosphate (Fig. 7.23). Une partie du glycéraldéhyde-3-phosphate synthétisé pourrait réagir avec du sedoheptulose phosphate non marqué pour synthétiser du fructose 6-phosphate marqué sur les positions inférieures (carbone C-4, C-5, C-6 du glucose). Il est difficile de savoir si cette explication est exacte et justifie à elle seule les résultats obtenus.

Le ^{13}C -1-acétate possède un patron de marquage spécifique contrairement au ^{13}C -2-acétate (Fig. 7.24). Le marqueur du ^{13}C -1-acétate se répartit dans les groupements carboxyliques des molécules du cycle de Krebs et de la voie du glyoxylate. Les molécules circulant dans le cycle de Krebs perdent après le premier tour tout le marqueur du ^{13}C -1-acétate sous la forme de $^{13}\text{CO}_2$, empêchant ainsi tout éparpillement du marqueur. L'oxaloacétate résultant est alors marqué

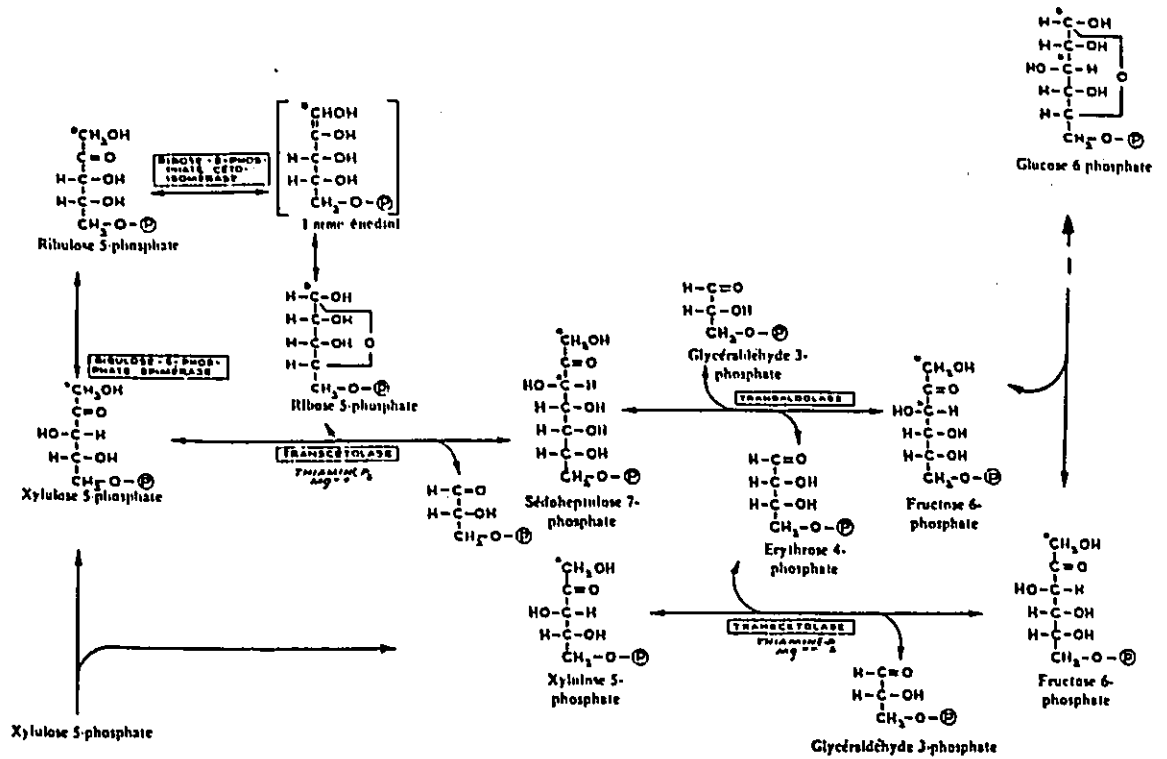


FIG. 7.23. Voie des pentoses phosphates.

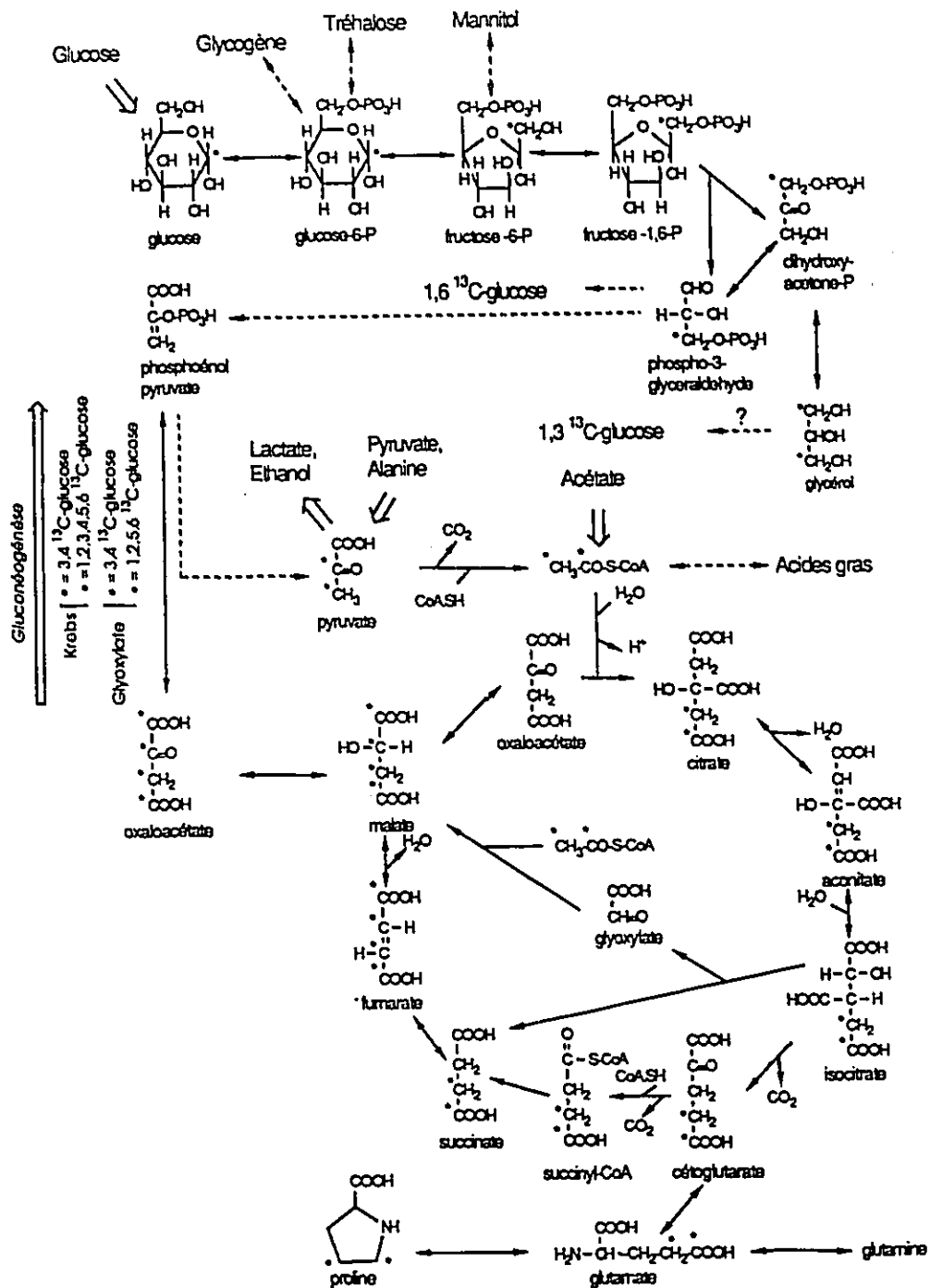


FIG. 7.24. Sentiers métaboliques empruntés par l'acétate et le glucose.

uniquement en position C-3 et C-4. Par contre, tout marqueur effectuant plusieurs tours dans le cycle de Krebs, se répartit peu à peu dans toutes les positions possibles. Si l'oxaloacétate résultant provenait uniquement du cycle de Krebs, le tréhalose produit serait en principe enrichi en ^{13}C dans toutes les positions, les positions C-3 et C-4 étant C-2 fois moins enrichies que les autres. D'autre part, si l'oxaloacétate résultait uniquement de la voie du glyoxylate, seuls les carbones C-1, C-2, C-5 et C-6 du glucose seraient enrichis. L'enrichissement de l'oxaloacétate en positions C-1 et C-4 ou C-2 et C-3 est en principe identique, dû à l'équilibre rapide de l'oxaloacétate avec le fumarate, une molécule symétrique.

A partir du taux de marquage des différents atomes de carbone du tréhalose, il est théoriquement possible de mesurer l'activité de la voie du glyoxylate et du sentier normal du cycle de l'acide citrique (Hollander, 1981). Cependant, à cause du faible taux d'incorporation de l'acétate et de l'incertitude sur les résultats, il nous est impossible de déterminer la contribution exacte de la voie du glyoxylate. Il est certain que ce sentier participe de façon active à la synthèse des unités glycosyles du tréhalose.

Dans les conditions expérimentales utilisées, la majorité de l'acétate est utilisée avant l'enkystement. Il existe plusieurs sources de substrats pour le cycle du glyoxylate. Lors de l'enkystement, les lipides diminuent de 30%, l'ARN de

50%, l'ADN de 30% et les protéines de 25%. Les lipides semblent donc être le principal site d'incorporation de l'acétate visible par RMN. Le taux d'enrichissement observé dans le tréhalose reste cependant faible en comparaison avec celui estimé dans les lipides. D'autres sources de substrats autres que le glycogène et les lipides semblent donc participer à la synthèse du tréhalose. La RMN ne permet pas d'observer les macromolécules rigides telles que la plupart des protéines, de l'ARN et de l'ADN. Ces composés sont aussi susceptibles de contribuer à la synthèse du tréhalose.

CHAPITRE 8

CONCLUSION

La spectroscopie RMN est une technique de pointe de plus en plus utilisée dans les études *in vivo*. Nous avons construit un système de perfusion afin d'étudier en continu les changements métaboliques associés à l'enkystement chez *Acanthamoeba castellanii*. A l'aide de ce système, nous avons observé par RMN de ^{31}P et de ^{13}C le métabolisme des amibes sur des périodes souvent supérieures à 48 heures. Comme les techniques de perfusion développées ne requièrent pas de sonde RMN spéciale, elle peuvent donc être adaptées sur la plupart des spectromètres RMN. Elles peuvent être directement utilisées pour l'étude de la plupart des microorganismes, puisqu'elles ne dépendent pas des caractéristiques cellulaires. Nous avons aussi mis au point des techniques d'analyse "plus classique" permettant de doser de glycogène, la cellulose, les hydrates de carbone simples, et les acides aminés sur des quantités très faibles de matériel (20 - 50 mg de cellules poids sec). Les techniques existantes d'analyse des hydrates de carbones, ont ainsi été perfectionnées pour permettre la quantification du tréhalose ainsi que plusieurs autres sucres dans nos échantillons. Au début de nos travaux, aucune méthode d'analyse ne permettait une détermination

satisfaisante des acides aminés physiologiques. A partir des données déjà existantes sur l'analyse des acides aminés des hydrolysats de protéines, nous avons développé une nouvelle technique permettant l'analyse d'au delà de 26 acides aminés physiologiques en moins de 45 minutes. Cette technique, basée sur la dérivation des acides aminés à l'aide du phénylisothiocyanate, se compare encore aujourd'hui très favorablement aux techniques d'analyse de pointes.

Dans la littérature, on retrouve très peu d'information sur la séquence des transformations biochimiques associées à l'enkystement chez *Acanthamoeba castellanii*. De plus, bien que des parallèles semblent possibles avec plusieurs autres microorganismes, le métabolisme du tréhalose n'a jamais été étudié chez *Acanthamoeba*. Dans les heures qui suivent l'induction de l'enkystement, la RMN du ^{31}P montre l'apparition transitoire d'AEP suivie de la formation de la paroi kystique (12 - 20 heures). Durant tout le processus, d'énormes quantités de polyphosphate sont relâchées dans le perfusé. La quantité totale de phosphate visible augmente au cours de l'enkystement. Cela nous laisse supposer que les amibes possèdent des réserves de phosphates invisibles par spectroscopie de RMN. La RMN de ^{13}C a permis d'observer la disparition du glycogène et du maltose, ainsi que l'apparition du tréhalose, le principal hydrate de carbone des kystes. Des raies associées aux chaînes acyles des lipides augmentent en intensité durant l'enkystement, ce qui suggère la transformation des vacuoles en gouttelettes de triglycérides.

Parallèlement, la RMN de ^{31}P montre l'apparition de raies correspondant aux déplacements chimiques du glycérylphosphorylcholine et de la glycérylphosphoryl-éthanolamine.

Les études biochimiques suggèrent qu'une bonne partie du glycogène est utilisée comme source d'énergie pour l'enkystement. Dans certaines circonstances, la fermentation alcoolique peut être utilisée lors de l'enkystement. Les cellules semblent suppléer à la demande en énergie par ce processus lorsque l'apport en oxygène est limité. Lors de l'enkystement, 5 à 10% du poids cellulaire peut être transformé en éthanol. La capacité de fermentation chez cet organisme a été observée pour la première fois. Les essais enzymatiques démontrent que l'alcool déshydrogénase est peu active dans les cellules en phase de croissance logarithmique. Cependant, l'activité de cette enzyme augmente rapidement avec la densité cellulaire et l'âge de la culture.

A l'aide de marqueurs de ^{13}C , nous avons estimé qu'environ 30% du glycogène est transformé en tréhalose. Les réserves de glycogène présentes au début de l'enkystement sont nettement insuffisantes pour fournir les unités glycosyles nécessaires à la synthèse du tréhalose et de la cellulose. Les lipides semblent une source probable de carbone pour la synthèse *de novo* d'unités glycosyles, via la voie du glyoxylate. Nous avons mis en évidence l'existence de plusieurs sentiers de gluconéogénèse inhabituels chez

Acanthamoeba castellanii. Une meilleure compréhension de leur fonctionnement est un prérequis à la compréhension du fonctionnement des transformations associées aux réserves des hydrates de carbone lors de l'enkystement. Les kystes accumulent 100 - 140 fmoles/cellule de tréhalose. La CLHP a aussi démontrée la présence d'une concentration élevée de proline (30 - 50 fmoles). Ces composés sont des agents de protection reconnus contre la congélation et la déshydratation que l'on retrouve chez plusieurs microorganismes distincts (section 7.2.3). La présence simultanée de ces deux composés chez le même microorganisme n'a jamais, à notre connaissance, été mise en évidence. Leur présence semble fournir aux kystes la protection nécessaire pour survivre en état de déshydratation, en stabilisant la conformation des constituants cellulaires.

ANNEXE

LISTE DES ABREVIATIONS

- ADN_{mt} : acide désoxyribonucléique mitochondrial.
- AMP_c : 3', 5' - adénosine monophosphate cyclique.
- AEP : 2-aminoéthylphosphonate.
- AP : angle d'impulsion.
- CBD : calorimétrie à balayage différentiel.
- CG : chromatographie en phase gazeuse.
- CL : chromatographie liquide.
- CLHP : chromatographie liquide à haute performance.
- DBL : découplage de proton à large bande de fréquence.
- DE : diamètre externe.
- DI : diamètre interne.
- DW : découplage de proton "Waltz-16" (Shaka et al., 1983).
- DMSO : diméthylsulfoxyde.
- EDTA : acide éthylènediamine-N,N,N',N'-tétraacétique.
- EGTA : acide bis(2-aminoéthyl)éthylèneglycoléther-N,N,N',N'-
tétraacétique.
- ER : facteur d'élargissement de raie.
- EtOH : éthanol.
- FS : fréquence du spectromètre.
- FLC : "Friend Leukemic cell".
- GABA : acide γ -aminobutyrique.
-

G-1-P : glucose-1-phosphate.
GPC : glycérylphosphorylcholine.
GPE : glycérylphosphoryléthanolamine.
HAEP : 1-hydroxy-2-aminoéthylphosphonate.
HYP : 4-hydroxyproline.
L : longueur.
NA : nombre d'accumulation.
NAD[†] : nicotinamide adénine dinucléotide (forme oxidée).
MeOH : méthanol.
PITC : phénylisothiocyanate
PTC : phénylthiocarbamoyle
Pyr : pyridine.
PME : phosphomonoester.
RMN : résonance magnétique nucléaire.
SM : spectrométrie de masse.
TEA : triéthylamine.
TR : temps de recyclage.
THF : tétrahydrofurane.
UAPE : unité d'absorbance à pleine échelle.
UDP- : uridine diphospho-.
UDPG : uridine diphosphoglucose.

BIBLIOGRAPHIE

- Adam, K. M. G. (1964). *J. Protozool.* 11, 98.
- Adam, K. M. G., et Blewett, D. A. (1967). *J. Protozool.* 14, 277.
- Apenfels, W. (1981). *Anal. Biochem.* 114, 153.
- Atkins, R. A. et Byers, T. J. (1980). *Develop. Biol.* 79, 126.
- Band, R. N. (1963). *J. Protozool.* 10, 101.
- Band, R. N. (1975). *J. Protozool.* 22, 27A.
- Becker, E. D. (1980). "High Resolution NMR: Theory and Chemical Applications", 2^{ième} ed., 354 p. Academic Press, New York.
- Bidlingmeyer, B. A., Cohen, S. A. et Tarvin, T. L. (1984). *J. Chromatogr.* 336, 93.
- Boulanger, Y., Vinay, P., Phan Viet, M. T., Guardo, R., et Desroches, R. (1985). *Magn. Reson. Med.* 4, 495.
- Bowers, B. (1977). *Exp. Cell Res.* 110, 409.
- Bowers, B. et Korn, E. D. (1967). *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 35, 15A.
- Bowers, B. et Korn, E. D. (1969). *J. Cell Biol.* 41, 786.
- Bowers, B. et Olszewski, T. E. (1972). *J. Cell Biol.* 53, 681.
- Bowers, B. et Olszewski, T. E. (1983). *J. Cell Biol.* 97, 317.
- Brown, R. C., Bass, H., et Coombs, J. P. (1975). *Nature (London)* 254, 434.

- Burgoyne, R. F. (1984). Dans "HPLC in Nucleic Acid Research". Chromatographic Sciences Series, vol. 28 (Phyllis R. Brown, ed.). Marcel Dekker Inc., New York, p. 267 - 284.
- Byers, T. J., Rudick, V. L., et Rudick, M. J. (1969). *J. Protozool.* **16**, 693.
- Byers, T. J. (1979). Dans "International Review of Cytology" vol. 61, p. 283. Academic Press, New York.
- Chagla, A. H., et Griffiths, A. J. (1974). *J. Gen. Microbiol.* **85**, 139.
- Chagla, A. H., et Griffiths, A. J. (1978). *J. Gen. Microbiol.* **108**, 39.
- Chambers, J. A., et Thompson, J. E. (1974). *J. Gen. Microbiol.* **80**, 375.
- Chambers, J. A., et Thompson, J. E. (1976). *J. Gen. Microbiol.* **92**, 246.
- Cohen, S. A., Bidlingmeyer, B. A., et Tarvin, T. L. (1986). *Nature* **320**, 769.
- "CRC Handbook of Biochemistry and Molecular Biology; Nucleic Acids" (1975). Vol. 1. p. 76, 97, 148 - 149. CRC Press, Cleveland.
- "CRC Handbook of Chemistry and Physics" (1976). 56^{ième} édition, p. D-33. CRC Press, Cleveland.
- Crowe, J. H., et Crowe, L. M. (1984). *Sci.* **223**, 701.
- Crowe, L. M., Mouradian, R., Crowe J. H., Jackson, S. A., et Womersley, C. (1984). *Biochim. Biophys. Acta* **769**, 141.
- Daniel, P. F., DeFeudis, D. F., Lott, I. T., et McLuer R. H. (1981). *Carbohydrate Res.* **79**, 161.

- Deslauriers, R., Jarrel, H. C., Byrd, R. A. B., et Smith, I. C. P. (1980a). *FEBS Lett.* 118, 185.
- Deslauriers, R., Jarrel, H. C., Byrd, R. A. B., et Smith, I. C. P. (1980b). *Biochem. Biophys. Research Comm.* 95, p. 1211.
- Deslauriers, R., Byrd, R. A. B., Jarrell, H. C., et Smith, I. C. P. (1982a). Dans "Non Invasive Probe of Tissue metabolism", (Jack S. Cohen, ed.), p. 49 - 77. John Wiley and Son Inc., New York.
- Deslauriers, R., Byrd, R. A. B., Griffiths, D. W., Papineau, M. et Smith, I. C. P. (1982b). *Spectros. Int. J.* 1, 1.
- Dolphin, W. D. (1976). *J. Protozool.* 23, 255.
- Dubes, G. R., et Jensen, T. (1964). *J. Parasitol.* 50, 380.
- Dukena, C. Kester, H. C. M., et Vissel, J. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 14.
- Edwards, S. W., et Lloyds, D. (1977). *J. Gen. Microbiol.* 102, 135.
- Fellenz, M. F., et Gerweck, L. E. (1988). *Radiation Research.* 116, 305.
- Foury, F., et Goffeau, A. (1975). *J. Biol. Chem.* 250, 2354.
- Foxall, D. L., et Cohen, J. S. (1983). *J. Magn. Reson.* 52, 346.
- Foxall, D. L., Cohen, J. S., et Mitchell, J. B. (1984). *Exp. Cell Res.* 54, 521.

- Gadian, D. G., Radda, G. K., Richards, R. E., et Selley, P. J. (1979). Dans "Biological Applications of Magnetic Resonance", (R. G. Shulman, ed.) 463 p. Academic Press, New York.
- Geoffrion, Y. (1982). Thèse de doctorat, Université Laval, Québec.
- Geoffrion, Y., Lareau, S., Deslauriers, R., Butler, K., Pass, M., et Smith, I. C. P. (1985). *Magn. Reson. Med.* 2, 65.
- Gessat, M., et Jantzen, H. (1974). *Arch. Microbiol.* 99, 155.
- Gilman, A. G. (1970). *Proc. Nat. Acad. Sci. (Washington)* 67, 305.
- Glanek, T., et Kopp, S. J. (1985). *Magn. Reson. Imaging* 3, 359.
- Gonzalez-Mendez, R., Wemmer, D., Hann, G., Wade-Jardetzky, N., et Jardetzky, O. (1982). *Biochim. Biophys. Acta* 720, 274.
- Griffiths, A. J. (1970). *Adv. Microb. Physiol.* 4, 105.
- Griffiths, A. J., et Hugues, D. E. (1968). *J. Protozool.* 16, 93.
- Griffiths, A. J., et Hugues, D. E. (1969). *J. Protozool.* 15, 673.
- Gross, J. D., Bradbury, J., Kay, R. R. et Peacy, M. J. (1983). *Nature (London)* 303, 244.
- Hancock, W. S., et Sparrow, J. T. (1984). "HPLC Analysis of Biological Compounds: A Laboratory Guide". Chromatographic Sciences Series, Marcel Dekker Inc. New York., p. 9 - 70.
- Hatanaka C., et Kobara, Y. (1980). *Agric. Biol. Chem.* 44, 2943.

- Hopkinson, J. (1983). Dans "Immobilized Cells and Organelles", Vol. 1. (Bo Mattiason, editeur), p. 89 - 99. CRC Press Inc, Boca Raton.
- Jungreis, A. M., Jatlow, P., et Wyatt, G. R. (1974). *J. Exp. Zool.* 187, 41.
- Karczmar, G. S., Kretzky, A. P., Bissell, M. J., Klein, M. P., et Weiner, M. W. (1983). *J. Magn. Reson.* 53, 123.
- Kaushal, D. C., et Shulkla, O. P. (1977a). *J. Gen. Microbiol.* 98, 117.
- Kaushal, D. C., et Shulkla, O. P. (1977b). *Indian J. Exp. Biol.* 15, 373.
- Kaushal, D. C., et Shulkla, O. P. (1977c). *Indian J. Exp. Biol.* 15, 542.
- Kay, R. R., Gadian, D. C., et Williams S. R. (1986). *J. Cell Science* 83, 163.
- Knazek, R. A., Gullino, P. M., Kohler, P. O., et Kedrick, R. L. (1972). *Sci.* 178, 65.
- Knop, R. H., Chen, C. W., Mitchell, J. B., Russo, A., McPherson, S., et Cohen, J. S. (1985). *Biochim. Biophys. Acta* 845, 171.
- Krichevsky, M. I., et Love, L. L. (1965). *J. Gen. Microbiol.* 41, 367.
- Krichevsky, M. I., et Wright, B. E. (1963). *J. Gen. Microbiol.* 32, 195.
- Krishna Murti, C. R., et Shukla, O. P. (1984). *J. Biosci.* 5, 475.
- Kushner, D. J., et Onishi, H. (1966). *J. Bacteriol.* 91, 653.

- Lapidot, A. et Irving, C. S. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 1988.
- Larochele, J., et Gagnon, A. (1977). *Comp. Biochem. Physiol.* 59A, 119.
- Lehninger, A. L. (1979). "Biochemistry", 2^{ième} ed., p. 629. Worth Publishers, Inc. New York.
- Lehrfeld, J. (1976). *J. Chromatogr.* 120, 141.
- Lee, C. W. B., Waugh, J. S., et Griffin, R. G. (1986). *Biochemistry.* 25, 3737.
- Levy, G. C., Litcher, R. L., et Nelson, G. L. (1980). "Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy" 2^{ième} ed., 338 p. John Wiley & Son, New York.
- Lloyd, D., Protheroe, R., Williams, T. N., et Williams, J. L. (1983). *FEMS Microbiol. Letters* 17, 143.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., et Randall, J. (1951). *Biol. Chem.* 193, 265.
- Mackenzie, N. E., Hall, J. E., Seed, J. R., et Scott, A. I. (1982). *Eur. J. Biochem.* 121, 657.
- Mattiason, B. (1983). Dans "Immobilized Cells and Organelles", Vol. 1. (Bo Mattiason, editeur), p. 3 - 55. CRC Press Inc, Boca Raton.
- McLaughlin, A., Grathwohl, C., et McLaughlin S. (1978). *Biochim. Biophys. Acta* 513, 338.
- Murphy, T.A., et Wyatt, G. R. (1965). *J. Biol. Chem.* 240, 1500.
- Natchamn, F. (1976). *Z. Anal. Chem.* 282, 209.

- Natchamn. F., et Burda, K. W. (1977). *J. Chromatogr.* 136, 279.
- Natchman, F., Spitzzy, H., et Frei, R. W. (1976a). *Anal. Chem.* 48, 1576.
- Natchman, F., Spitzzy, H., et Frei, R. W. (1976b). *J. Chromatogr.* 122, 123.
- Neff, R. J., Benton, W. F., et Neff, R. H. (1964a) *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 23, 66A.
- Neff, R. H., Ray, S. A., Benton, W. F., et Wilborn, M. (1964b). Dans "Methods in Cell Biology" (D. M. Prescott, ed.) p. 55. Academic Press, New York.
- Neff, R. J., et Neff, R. H. (1969). *Sym. Soc. Exp. Biol.* 23, 51.
- Neff, R. J., et Neff, R. H. (1972). *C. R. Trav. Lab. Carlsberg* 39, 111.
- Neff, R. J., Neff, R. H., et Taylor, R. E. (1958). *Physiol. Zool.*, 21, 73.
- Ogawa, S., Shulman, R. G., Glynn, P. Yamani, T., et Navon, G. (1978). *Biochim. Biophys. Acta* 502, 45.
- Pal, R. A. (1972). *J. Exp. Biol.* 57, 55.
- Panek, A. (1962). *Arch. Biochem. Biophys.* 98, 349.
- Panek, A. D., et Mattoon, J. R. (1977). *Arch. Biochem. Biophys.* 183, 306.
- Panek, A. D., Sampaio, A. L., Braz, G. C., et Mattoon, G. R. (1978). Dans "Biochemistry and Genetic of Yeast", (M. Bacila, B. L. Horecker et A. O. M. Stoppani, ed.) p. 145 - 160. Academic Press, New York.

- Pigon, A. (1972). *Exp. Cell Res.* 73, 170.
- Prescott, L. M., Hoyne, H. E., Crockett, D., et Hui, E. (1973). *Can. J. Microbiol.* 19, 1131.
- Prusch, R. D., et Hannafin, J. A. (1979). *J. Gen. Physiol.* 74, 511.
- Rabinovitch, M., et DeStephano, M. J. (1971). *Exp. Cell Res.* 64, 275.
- Raizada, M. K., et Krishna Murti, C. R. (1972). *J. Cell Biol.* 52, 743.
- Rosness, P. E. et Wright, B. E. (1974). *Arch. Biochem. Biophys.* 164, 60.
- Roth, M. (1971). *Anal. Biochem.* 43, 880.
- Rudolph, A. S., et Crowe, J. H. (1985). *Cryobiology* 22, 367.
- Rudolph, A. S., Crowe, J. H., et Crowe, L. M. (1986). *Biochem. J.* 49, 504a.
- Santos, H. et Turner, D. L. (1986). *J. Magn. Reson.* 68, 345.
- Satre, M. et Martin, J.-B. (1985). *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 132, 140.
- Schobert, B., et Tschesche, H. (1978). *Biochim. Biophys. Acta* 541, 270.
- Seilds, R. et Burnett, W. (1960). *Anal. Chem.* 82, 885.
- Seifter, S., Dayton, S., Novic, C. et Muntwyler (1950). *Arch. Biochem.* 25, 191.
- Seilhamer, J. J., et Byers, T. J. (1978). *J. Protozool.* 25, 486.
- Shaka, A. J., Keeler, J. Frenkiel, T. A., et Freeman, R. (1983). *J. Magn. Reson.* 52, 335.

- Stewart, J. R., et Weisman, R. A. (1972). *J. Cell Biol.* 52, 117.
- Stewart, W. E., et Sidall, T. H. (1970). *Chem. Rev.* 70, 517.
- Stoppani, A. O. M., et Ramos, E. H. (1978). Dans "Biochemistry and Genetics of Yeast", (M. Bacila, B. L. Horecker et A. O. M. Stoppani, ed.), p. 171 - 196. Academic Press, New York.
- Tanaka, N., Goodnell, H., et Karger, B. L. (1978). *J. Chromatogr.* 158, 233.
- Thompson, J. E. (1977). Dans "Methods in Cell Biology" vol. 15. (D. M. Prescott, ed.). p. 303. Academic Press, New York.
- Tomlinson, G. (1967). *J. Protozool.* 14, 114.
- Tomlinson, G., et Jones, E. A. (1962). *Biochim. Biophys. Acta* 63, 194.
- Torchia, D. A., Lejerla, J. R. Jr., et Deber, C. M. (1974). *J. Am. Chem. Soc.* 96, 5009.
- Torrey, H. C. (1949). *Phys. Rev.* 76, 1059.
- Toutser, O., et Shaw, D. R. D. (1962). *Physiol. Review* 42, 181.
- Ugurbil, K., Rottenberg, H., Glynn, P., et Shulman, R. G. (1982). *Biochemistry.* 21, 1068.
- Ulsamer, A. G., Wright, P. L., Weizel, M. G., et Korn, E. D. (1971). *J. Cell Biol.* 51, 193.
- Verma, A. K. et Raizada, M. K. (1975). *Cell Differ.* 4, 167.
- Villemez, C. L., Carlo, P. L., et Russell, M. A. (1985). *J. Cell Biochem.* 29, 373.
- Weisman, R. A. (1976). *Annu. Rev. Microbiol.* 30, 189.

- Weisman, R. A., et Moore, M. O. (1969). *Exp. Cell Res.* 54, 17.
- Weisman, R. A., et Korn, E. D. (1967). *Biochemistry* 6, 485.
- Weisman, R. A., Speigel, R. S., et McCauley, J. G. (1970). *J. Biochim. Biophys. Acta* 201, 45.
- Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowers, R. D., et Somero, G. N. (1982). *Science* 217, 1214.