



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Endocytose du saccharose par le foie de rat in vivo : étude de l'effet d'un prétraitement à la cytochalasine B

Pypaert, Marc

Award date:
1985

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTÉS UNIVERSITAIRES N.D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTÉ DES SCIENCES

ENDOCYTOSE DU SACCHAROSE PAR LE FOIE DE RAT
IN VIVO : ETUDE DE L'EFFET D'UN PRETRAITEMENT
A LA CYTOCHALASINE B

Tome I : TEXTE

Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques
par

MARC PYPAERT

Au terme de ce mémoire, je tiens à remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont collaboré à la réalisation de ce travail; et plus particulièrement mes remerciements vont à:

madame Ronveaux, promoteur de ce mémoire, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour m'avoir guidé et encouragé tout au long de cette année,

Martine et Noëlle pour leur collaboration toujours appréciée et pour leur amitié,

Marie-Thérèse, Rose, Yves, Pascal et Alain pour leurs encouragements et leur amitié,

monsieur Collet pour l'important travail photographique de ce mémoire,

messieurs Dubois et Houbion pour leur disponibilité.

Je tiens à remercier tout particulièrement mes parents, pour m'avoir permis d'entamer ces études et pour la confiance qu'ils ont toujours témoigné à mon égard, ainsi qu'Isabelle, Philippe, Véronique, Emmanuel et Jean-Benoît, qui m'ont encouragé et soutenu durant toute cette année.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

1. L'endocytose	2
2. Microfilaments: structure et fonctions	7
3. La cytochalasine B	11
4. Objet du travail	17

MATERIEL ET METHODES

I. <u>Expérimentation in vivo</u>	
1. Techniques morphologiques	18
2. Techniques biochimiques	21
II. <u>Perfusion en circuit fermé du foie de rat</u>	
1. Appareillage	25
2. Milieu de perfusion	25
3. Technique opératoire et perfusion	27
4. Préparation pour la microscopie électronique	30
5. Techniques biochimiques	30

RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. <u>Effet de la cytochalasine B sur l'endocytose du saccharose par le foie de rat in vivo</u>	
A. <u>Analyse biochimique</u>	
1. Etude de l'effet de doses croissantes de cytochalasine B	34
2. Effet de durées croissantes de traitement au saccharose	40
3. Discussion	48
B. <u>Analyse morphologique</u>	
1. Résultats	54
2. Discussion	59

II. Endocytose du saccharose par le foie de
rat perfusé

- | | |
|--|----|
| 1. Résultats biochimiques | 65 |
| 2. Observations morphologiques | 84 |
| 3. Lactate déshydrogénase et traitement au
saccharose | 87 |
| 4. Discussion | 87 |

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES 94

BIBLIOGRAPHIE

I N T R O D U C T I O N

Malgré le grand nombre de travaux qui ont été réalisés sur l'endocytose fluide, on ne sait encore que très peu de choses actuellement quant aux mécanismes qui interviennent dans ce phénomène.

Comme les microfilaments représentent un des constituants cellulaires qui pourrait jouer un rôle dans ce type d'endocytose, nous avons décidé d'étudier, au cours de ce travail, l'effet d'une substance qui inhibe la contraction de ces microfilaments, la cytochalasine B, sur l'endocytose du saccharose par le foie de rat in vivo.

1. L'endocytose

a. Généralités

L'endocytose est le mécanisme par lequel les cellules prélèvent du matériel extracellulaire pour l'internaliser dans leur cytoplasme. Ce phénomène se réalise à son début grâce à des invaginations de la membrane plasmique. De nombreux termes ont été employés pour décrire différents types d'endocytose, mais en général l'on divise ces phénomènes en 2 grandes catégories :

- la phagocytose, ou ingestion de particules visibles en microscopie optique, tels des microorganismes ou des débris cellulaires, de taille supérieure à $0,5 \mu\text{m}$ (Besterman, Low, 1983; Mellman, 1984).

- la pinocytose, ou capture de petites gouttelettes de fluide extracellulaire via la formation de vésicules d'endocytose de faible diamètre ($0,1 \mu\text{m} - 0,2 \mu\text{m}$) (Mellman, 1984).

Une grande variété de substrats peuvent être prélevés par pinocytose: particules insolubles (lipoprotéines, ferritine, colloïdes, complexes immuns), macromolécules solubles (enzymes, hormones, anticorps, protéines plasmatiques), et le fluide extracellulaire lui-même (Silverstein et al., 1977).

L'on peut distinguer 2 types principaux de pinocytose, selon que la substance pénètre dans la cellule en solution ou suspension dans le fluide extracellulaire (endocytose ou pinocytose fluide) ou selon qu'elle est prélevée après s'être fixée au préalable sur la membrane plasmique (endocytose ou pinocytose adsorptive). Cette dernière forme d'endocytose peut elle-même être subdivisée en pinocytose adsorptive médiée par récepteurs (enzymes lysosomiaux, l'insuline, les VLDL, l' α_2 -macroglobuline), et en pinocytose adsorptive non médiée par récepteurs, et, dans ce cas, les substances se lient de manière non spécifique à la surface cellulaire (par exemple la ferritine cationisée se liant aux sites anioniques de la membrane plasmique) (Besterman, Low, 1983).

L'endocytose fait appel à un ensemble de compartiments cellulaires qui forment l'appareil vacuolaire (Steinman et al., 1983). Celui-ci comporte principalement 4 constituants (figure 1):

- la membrane plasmique.
- les vacuoles de phagocytose et de pinocytose, ou phagosomes et pinosomes. Ces derniers n'ont une durée de vie que de quelques secondes, après quoi ils subissent une série de modifications et de fusions entre eux et avec des lysosomes.
- les lysosomes secondaires, qui participent à la digestion des substrats endocytés et délivrent les produits de cette digestion dans le cytoplasme.
- un complexe qui synthétise les hydrolases lysosomiales, les protéines de sécrétion et les constituants membranaires de l'appareil vacuolaire, et qui est constitué de l'appareil de Golgi, du réticulum endoplasmique et des lysosomes primaires.

b. Endocytose et recyclage

L'idée d'un recyclage de la membrane plasmique a été proposé pour la première fois par Palade en 1956. En 1976, Steinman et ses collaborateurs ont apporté un support expérimental à cette hypothèse. Utilisant la peroxydase de raifort, ou HRP, comme marqueur, ils observèrent que des macrophages endocytèrent l'équivalent de 25 % de leur volume et de 186 % de leur surface cellulaire en 1 heure. D'un autre côté, durant la période de 3 heures étudiée, le volume et la surface de ces macrophages restaient constants, de même que le volume et la surface occupés par les vésicules d'endocytose et les lysosomes secondaires dans leur cytoplasme. Ces résultats les amenèrent à suggérer que la membrane intériorisée lors de l'endocytose serait recyclée et retournerait intacte à la surface cellulaire (Steinman et al., 1976).

Différentes voies possibles pour le recyclage des membranes ont été proposées depuis (figure 2):

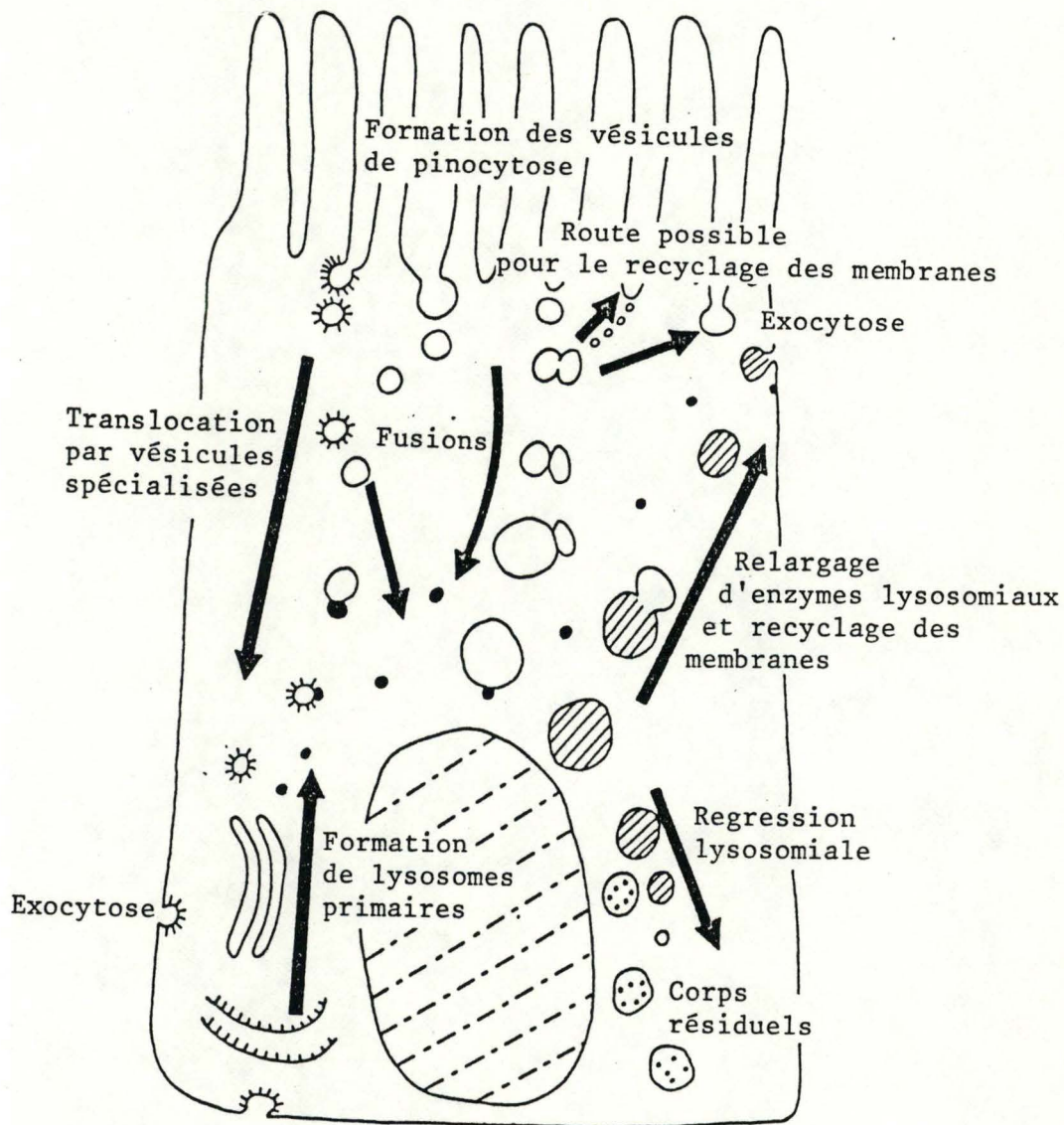


Figure 1: Représentation schématique de la dynamique des membranes associée à l'endocytose (d'après: Pratten et al., 1980).

- recyclage à partir d'un compartiment prélysosomal (endosome) (Duncan, Pratten, 1977; Wall, Hubbard 1981).
- recyclage à partir des lysosomes secondaires (Muller et al., 1980).
- recyclage via l'appareil de Golgi et la formation de granules de sécrétion (Ottosen et al., 1980; Farquhar, Palade, 1981; Farquhar, 1982; Farquhar, 1983).

Une étude particulièrement intéressante pour nous est celle qu'ont menée Besterman et ses collaborateurs sur l'endocytose du saccharose radioactif par des macrophages et fibroblastes en culture (Besterman et al., 1981). Ceux-ci ont en effet observé que la capture du saccharose n'était pas linéaire en fonction du temps et que cette déviation à la linéarité était due à une exocytose constante du marqueur. Afin d'expliquer les cinétiques ainsi obtenues, ils proposèrent l'existence d'au moins deux compartiments intracellulaires placés en série intervenant dans le recyclage rapide des membranes et du fluide endocytés. Un de ces compartiments aurait une faible taille et un turnover rapide, l'autre serait de grande taille et présenterait un turnover beaucoup plus lent.

c. Endocytose du saccharose

L'apparition de vacuoles dans les cellules hépatiques et la présence de phosphatase acide dans ces vacuoles suite à une injection intrapéritonéale d'une solution de saccharose a été décrite pour la première fois par Brewer et Heath (Brewer, Heath, 1964). Les travaux biochimiques de Wattiaux (1966) ont montré que la vitesse de capture du saccharose par le foie est typique d'une endocytose fluide. Elle est en effet constante tant que la saccharémie reste élevée. Depuis, le saccharose a été largement adopté comme marqueur de l'endocytose fluide, et ceci pour diverses raisons:

- on a pu montrer que les membranes plasmique et lysosomiale sont imperméables au saccharose (Cohn, Ehrenreich, 1969; Lloyd, 1969).
- le saccharose n'est pas métabolisé par les macrophages périto-

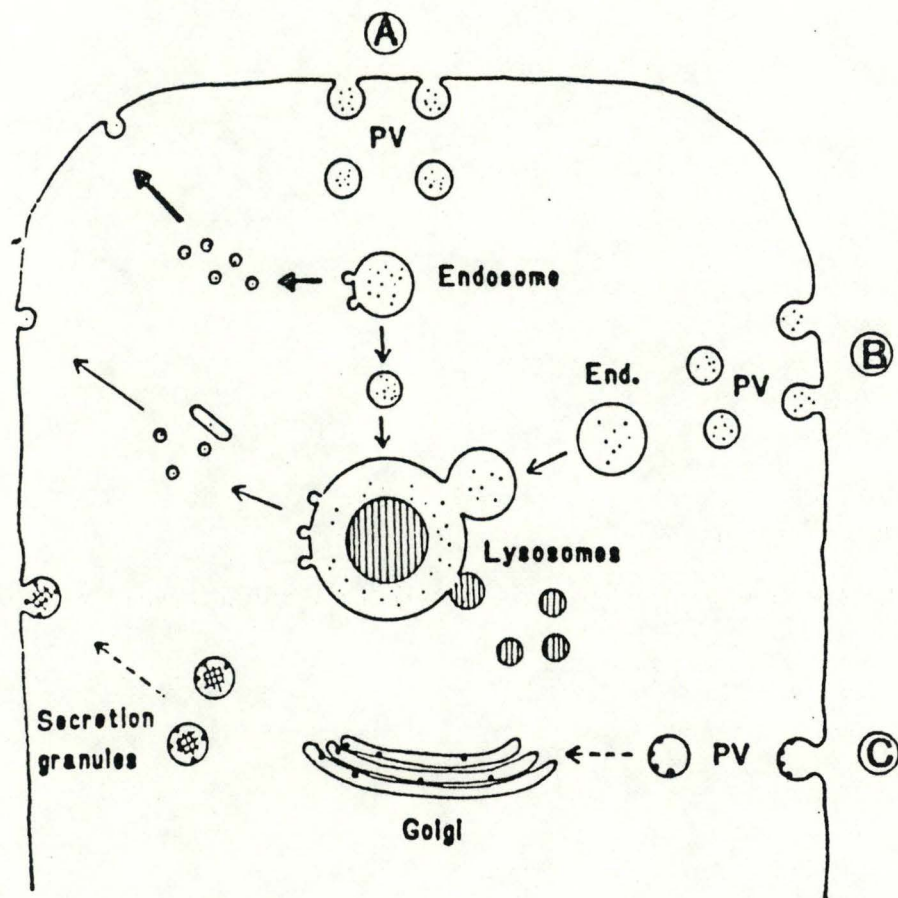


Figure 2: Ce schéma illustre 3 voies possibles pour le recyclage des membranes:

- à partir d'une structure prélysosomiale, ou endosome (voie A).
- à partir des lysosomes (voie B).
- via l'appareil de Golgi et la formation de granules de sécrétion (voie C).

(d'après: Steinman et al., 1983)

néaux, les hépatocytes ou d'autres types cellulaires (Wattiaux, 1966; Munro, 1968; Cohn, Ehrenreich, 1969).

- le saccharose ne s'adsorbe pas sur les membranes plasmiques (Pratten et al., 1977; Ose et al., 1980).

- le saccharose n'affecte pas le taux d'endocytose pour d'autres marqueurs, si ce n'est à des concentrations élevées (Roberts et al., 1977), ou lorsque l'accumulation de vacuoles dans le cytoplasme est telle qu'elle inhibe l'endocytose (Wagner et al., 1971).

Si l'on ne tient pas compte de ces cas extrêmes, le saccharose représente donc un marqueur idéal pour l'étude de l'endocytose fluide.

Plusieurs travaux ont montré que la cytochalasine B, substance interférant avec le réseau de microfilaments situé sous la membrane plasmique, inhibait la phagocytose et la pinocytose (Wagner et al., 1971; Von Figura, Kresse, 1974; Davies, Allison, 1978). De plus, il est assez habituel d'observer des contacts entre les microfilaments et certains organites cellulaires (Aguas, 1981). Ces résultats semblent indiquer que les microfilaments interviendraient dans les phénomènes endocytotiques, mais l'on ne sait pas grand chose actuellement sur leur rôle exact. Ce travail a pour but de tenter d'éclaircir le rôle que joueraient les microfilaments dans l'endocytose du saccharose par les hépatocytes in vivo.

2. Microfilaments: structure et fonction

a. Le cytosquelette

Les microfilaments forment, avec les microtubules et les filaments intermédiaires, les constituants principaux du cytosquelette.

- Les microtubules sont des structures en forme de tubes de 24 nm de diamètre. Ils peuvent atteindre une longueur de plusieurs microns. Ils interviennent dans la motilité, le maintien de la forme cellulaire, l'organisation de l'appareil de Golgi, la sécrétion,

l'endocytose, et de nombreuses autres fonctions cellulaires (Gaskin, Shelanski, 1976).

- Les filaments intermédiaires, d'un diamètre de 8 à 11 nm, ont été observés depuis longtemps par les morphologistes mais n'ont soulevé l'attention des biologistes que très récemment, grâce surtout aux progrès de l'immunocytochimie. Ce sont des constituants normaux des cellules animales où ils apparaissent en général isolés ou en faisceaux (Gaskin, Shelanski, 1976). Ces filaments montrent fréquemment des connections avec d'autres structures du cytoplasme, comme le réticulum endoplasmique, le noyau, les centrioles, les microtubules, et certaines vésicules (French et al., 1982). En réponse à l'action de substances antimitotiques, comme la colchicine, la vinblastine, la podophyllatoxine, divers types cellulaires montrent une augmentation du nombre de filaments intermédiaires présents dans leur cytoplasme. Comme ces substances provoquent la dépolymérisation des microtubules, certains auteurs ont suggéré un modèle de dépolymérisation des microtubules et de réassociation des sous-unités en filaments intermédiaires (Gaskin, Shelanski, 1976). Cependant, une étude ultérieure (Virtanen et al., 1980) a montré qu'un traitement à de basses températures, connu comme induisant un désassemblage rapide des microtubules, ne provoquait aucune modification apparente dans l'organisation des filaments intermédiaires. Ceux-ci pourraient donc maintenir leur organisation indépendamment des microtubules (De Brabander et al., 1975; Virtanen et al., 1980).

b. Les microfilaments

Depuis près de 20 ans, de nombreux travaux ont permis de détecter la présence de microfilaments d'actine dans un grand nombre de cellules non musculaires, animales ou végétales: cellules nerveuses, hépatocytes, cellules intestinales, cellules épidermiques, cellules et plaquettes sanguines, macrophages, cellules reproductrices, chondrocytes, ostéocytes... (Weihing, 1976; Forer, 1978).

L'aspect au microscope électronique de ces filaments est fort

semblable à celui des filaments d'actine musculaires. Ils apparaissent comme de longs filaments de 5 à 8 nm de diamètre, aux extrémités distinctes, composés de 2 chaînes de 5 nm de diamètre s'enroulant l'une autour de l'autre pour former une structure hélicoïdale (Forer, 1978).

L'identification de l'actine en microscopie électronique peut se faire à l'aide de fragments de myosine. En effet, sous l'action de la trypsine, la myosine est clivée en 2 fragments, appelés méromyosine lourde et méromyosine légère. La méromyosine lourde (HMM) contient l'activité ATPasique de la myosine et est capable de se lier à l'actine, lui conférant ainsi une apparence caractéristique dite "en têtes de flèches" au microscope électronique à transmission (Huxley, 1963, cité par: Forer, 1978).

Les microfilaments, ainsi que les microtubules, diffèrent des filaments intermédiaires par le fait qu'ils présentent un équilibre dynamique d'assemblage et de désassemblage de leurs sous-unités, alors que les sous-unités des filaments intermédiaires sont probablement polymérisées aussitôt qu'elles sont synthétisées et restent polymérisées jusqu'à ce que les filaments soient dégradés par protéolyse.

L'actine existe dans la cellule sous forme d'actine globulaire, ou G-actine, ou sous forme de filaments, ou F-actine. La formation des filaments d'actine à partir de ses monomères est de nature coopérative et comporte 2 étapes:

- la formation lente de noyaux constitués de 3 à 4 monomères.
- l'addition, plus rapide, de monomères à ces noyaux, ou élongation (Lin et al., 1980).

Les monomères s'ajoutent plus rapidement à une extrémité du filament qu'à l'autre. Etant donné qu'il existe également à chaque extrémité un taux de dissociation constant du filament, celui-ci conserve une longueur constante car la dissociation à une extrémité compense l'élongation à l'autre extrémité (Coluccio et al., 1984).

Des travaux *in vitro* ont révélé l'existence d'autres molécules, de nature protéique, qui interagissent avec les molécules d'actine et de myosine. La première de celles-ci est un cofacteur qui est nécessaire à l'expression de l'activité ATPasique de la myosine. D'autres protéines, liées à l'actine (actin binding proteins), permettent la transformation *in vitro* d'extraits d'actine en gels (gélification). L'actinine est une de ces protéines (Stossel, Hartwig, 1976; Hartwig, Stossel, 1976; Stendahl et al., 1980).

Dans la plupart des cellules, les microfilaments d'actine sont observés dans une zone périphérique ectoplasmique juste en dessous de la membrane plasmique, et semblent attachés à celle-ci. De plus, ces microfilaments se retrouvent également dans différentes expansions cytoplasmiques (microvillosités, pseudopodes). Dans les hépatocytes, l'on retrouve aussi des microfilaments autour du canalicule biliaire où ils forment un réseau dense qui fournit la pression nécessaire pour assurer la progression de la bile dans le canalicule (Oda et al., 1974; Oda et al., 1977).

Les microfilaments existent dans le cytoplasme soit sous forme de faisceaux de filaments parallèles, soit sous forme d'un réseau filamenteux. Ils présentent fréquemment des liens avec d'autres composants cytoplasmiques, tels le réticulum endoplasmique rugueux, les mitochondries, l'appareil de Golgi, les gouttelettes lipidiques, le centriole (Aguas, 1981), ainsi qu'avec la membrane plasmique (Tilney, 1976; Phillips et al., 1981; Birchmeier, 1984). Dans ce dernier cas, les microfilaments seraient responsables de la mobilité de certaines protéines à l'intérieur de la membrane plasmique, ainsi que de la transmission de signaux à travers celle-ci.

Les microfilaments interviennent dans de nombreuses fonctions cellulaires:

- la motilité cellulaire. Les fibroblastes en culture se déplacent sur un substrat en rompant certains contacts et en formant de nouveaux contacts avec celui-ci au niveau d'expansions cytoplasmiques riches en microfilaments (Goldman et al., 1976; Small, 1981).

- l'étalement des cellules en culture sur leur support solide (Stendahl et al., 1980).

- la phagocytose (Reaven, Axline, 1973; Stendahl et al., 1980). Ces derniers ont montré par immunofluorescence que, lorsqu'un macrophage phagocyte une particule, il émet des pseudopodes qui entourent cette particule et qui présentent une très forte concentration locale en actine et en protéines associées.

- le maintien de la forme cellulaire.

- la cytokinèse (Schroeder, 1976; Schroeder, 1978).

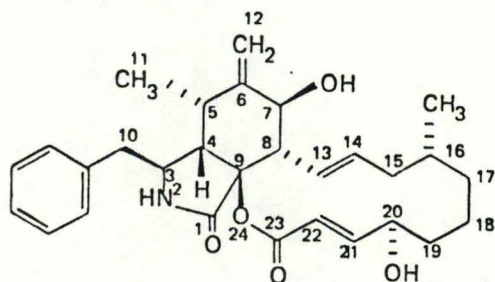
3. La cytochalasine B

a. Structure et mode d'action

Les cytochalasines sont des métabolites secondaires de microorganismes, dans la plupart des cas de moisissures. Les 2 premières substances de cette classe de métabolites ont été isolées par W. B. Turner en 1964. Elles ont été appelées cytochalasine A et B. Le nom "cytochalasine" (*cytos*: cellule; *chalasis*: relachement) a été proposé car, agissant sur la périphérie des cellules, ces substances provoquaient une perte de la forme caractéristique de celles-ci (Tamm, 1978; Tanenbaum, 1978).

Depuis, un grand nombre d'autres molécules ont été isolées et forment une classe de plus de 20 composés.

La cytochalasine B, ou phomine, est isolée à partir de 2 microorganismes différents: Phoma exigua et Helminthosporium dematioides. Sa structure chimique est représentée ci-dessous:



(d'après Tamm, 1978)

Après une première publication en 1966 sur l'influence de la cytochalasine B sur les cellules de mammifères, Carter, en 1967, publia une description plus détaillée de son action sur des fibroblastes de souris en culture. Cette étude montrait 3 effets principaux de la cytochalasine sur ces cellules (Carter, 1967):

- inhibition de la cytokinèse sans inhibition de la division nucléaire, donnant naissance à des cellules multinucléées.
- inhibition de la motilité cellulaire.
- extrusion nucléaire.

De plus, Carter observait l'absence de toxicité de la cytochalasine B, même lorsque les cellules étaient mises en présence de celle-ci pendant plusieurs jours.

Carter proposa un mode d'action de la cytochalasine qui tenait compte de l'adhésion des cellules à leur support de verre, et selon lequel la cytochalasine B serait absorbée à l'interface cellule - verre et y diminuerait la tension d'interface (Carter, 1967).

Schroeder proposa 2 ans plus tard une autre explication qui devait renouveler l'intérêt des biologistes pour la cytochalasine B. Il avait observé en effet que l'inhibition de la cytokinèse par celle-ci était liée à la disparition de l'anneau contractile, que l'on savait alors responsable du clivage de la cellule (Schroeder, 1969, cité par: Spooner, 1978).

Depuis, il ne fait plus doute que les microfilaments représentent le site d'action principal de la cytochalasine B, et diverses explications de cette action ont été proposées:

- la cytochalasine B inhiberait la polymérisation d'actine à l'extrémité du filament où a lieu l'élongation (Lin et al., 1980; Kacich et al., 1983). Mais ce processus, s'il se produisait in vivo, aboutirait à une dépolymérisation nette des microfilaments et à une diminution du nombre de microfilaments présents dans le cytoplasme. Or, un certain nombre d'études morphologiques ont montré qu'il n'y avait pas de diminution du contenu en microfilaments des cellules

traitées par rapport aux cellules témoins (Painter et al., 1981).

- la cytochalasine provoquerait le détachement des microfilaments liés à la membrane plasmique (Wessels et al., 1971, cités par: Tanenbaum, 1978; Phillips et al., 1981).

- un autre mécanisme, basé principalement sur des études in vitro, a été avancé. Hartwig et Stossel, de même que Weihing, ont montré que la cytochalasine B inhibait la capacité qu'ont certains extraits cellulaires d'induire la formation de gels d'actine, et ceci à des concentrations de cytochalasine 10 fois inférieures à celles qui sont nécessaires pour inhiber la phagocytose (Hartwig, Stossel, 1976; Weihing, 1978). Plus récemment, Pollard et ses collaborateurs ont montré que la cytochalasine B agissait directement sur les microfilaments et rompait les interactions filament à filament, réduisant ainsi la puissance du réseau qui ne serait plus capable de propager des forces à grande échelle (MacLean-Fletcher, Pollard, 1980; Pollard, Mooseker, 1981, cités par: Painter et al., 1981).

S'il semble évident actuellement que la cytochalasine B agit en empêchant la transformation sol - gel de l'actine, on ne sait toujours pas si elle agit sur l'actine directement ou sur d'autres protéines liées à celle-ci (Weihing, 1978).

Notons qu'il existe un autre modèle, proposé par Miranda et al. et par Goldman et al. (cités par: Tanenbaum, 1978), selon lequel la cytochalasine produirait un état de contraction soutenu (contracture), sans relaxation, du réseau de filaments d'actine associé à la membrane plasmique.

Tous ces modèles supposent que la cytochalasine puisse pénétrer à l'intérieur des cellules. Lin et Bell ont étudié ce problème, utilisant de la cytochalasine tritiée et des membranes de globules rouges, et ont montré que la cytochalasine B pouvait traverser ce type de membrane (Lin, 1978). La cytochalasine étant, de plus, une molécule hydrophobe, il est très probable qu'elle puisse pénétrer au travers de toutes les membranes biologiques.

Enfin, il convient encore de parler de la réversibilité de l'effet de la cytochalasine B. Le retour à la normale de cellules en culture commence dès les 5 premières minutes d'absence de la cytochalasine dans le milieu, et peut être achevé après quelques minutes comme il ne peut l'être qu'après plusieurs heures, suivant le type cellulaire étudié, le temps d'exposition à l'action de la cytochalasine, la concentration de celle-ci dans le milieu. Les inhibiteurs du métabolisme énergétique inhibent ce phénomène (Godman, Miranda, 1978).

b. Effet de la cytochalasine B sur l'endocytose

L'addition de cytochalasine B dans le milieu de culture de macrophages de souris à des concentrations de 1 à 10 µg/ml inhibe la phagocytose de bactéries opsonisées bien que celles-ci se lient normalement à la membrane plasmique (Allison, 1973; Davies, Allison, 1978). Le même effet s'observe sur des cultures de polymorphonucléaires.

Reaven et Axline ont observé, en microscopie électronique, une accumulation de microfilaments orientés et de microtubules sous la membrane plasmique en contact avec la particule en voie d'ingestion (Reaven, Axline, 1973), ce qui tend à confirmer les observations de Davies et Allison.

Si la phagocytose nécessite une évagination importante du cytoplasme, et donc la participation active du métabolisme énergétique et du cytosquelette, la pinocytose au contraire ne requiert qu'une invagination peu importante de la membrane plasmique, et les microfilaments ne sembleraient pas avoir à jouer un rôle fondamental dans ce processus. Pourtant, certains travaux montrent une inhibition de la pinocytose par la cytochalasine B:

- inhibition de l'endocytose d'enzymes lysosomiaux par des fibroblastes en culture (Von Figura, Kresse, 1974) et par des cellules de foie isolé perfusé (Michelakakis, Dampure, 1984).

- inhibition de l'endocytose du saccharose tritié par les cellules hépatiques de la lignée Chang (Wagner et al., 1971).

Cependant, de nombreuses autres études, utilisant comme marqueurs l'or colloïdal, la ferritine, des antigènes solubles, n'ont montré aucun effet de la cytochalasine B sur la pinocytose (Davies et al., 1973a; Goldman et al., 1973, cités par Davies, Allison, 1978).

c. Autres effets de la cytochalasine B

La sécrétion par différents types cellulaires peut être stimulée ou au contraire inhibée sous l'action de la cytochalasine B (Davies et al., 1973b; Bauduin et al., 1975). L'augmentation de la sécrétion suite à l'action de la cytochalasine s'expliquerait par l'hypothèse selon laquelle les microfilaments d'actine formeraient une barrière séparant les granules de sécrétion de la membrane plasmique. Une aggrégation de ces microfilaments induite par la cytochalasine faciliterait l'accès de ces granules à la surface cellulaire (Stossel, 1981). L'inhibition de la sécrétion au contraire impliquerait un rôle différent des microfilaments dans la sécrétion: ceux-ci guideraient, passivement ou activement, les granules de sécrétion jusqu'à leur site d'extrusion sur la membrane plasmique (Bauduin et al., 1975). Allison a proposé 3 mécanismes par lesquels les microfilaments pourraient intervenir dans la sécrétion (figure 3).

Enfin, la cytochalasine B montre de nombreux autres effets sur la cellule, tous, ou presque, liés à son action sur le réseau de microfilaments:

- extrusion nucléaire (Carter, 1967).
- inhibition de la cytokinèse (Schroeder, 1976; Schroeder, 1978).
- apparition de boursouflures, perte des microvillosités et du mouvement des pseudopodes (Wagner et al., 1971).
- cholestase (Oda et al., 1977).

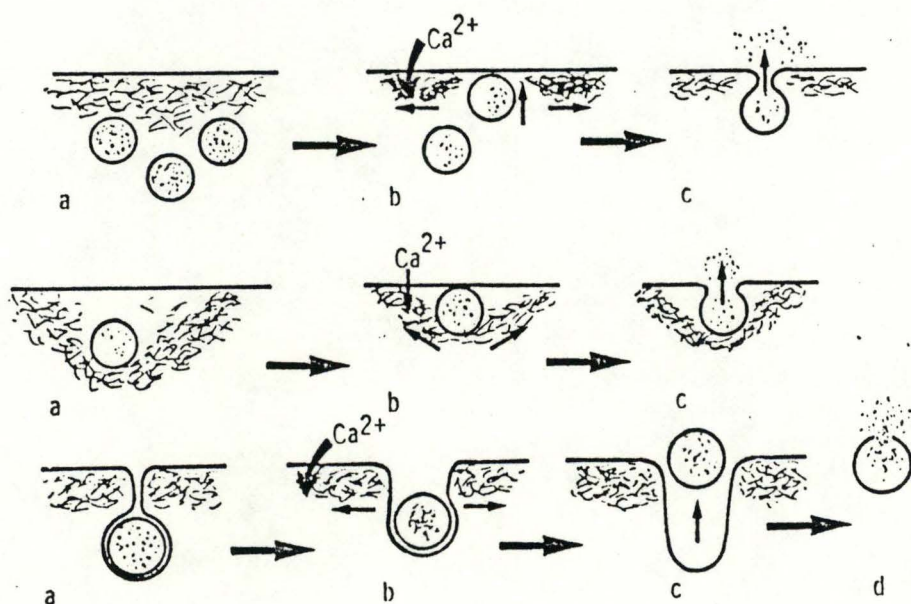


Figure 3: Trois mécanismes par lesquels les microfilaments pourraient intervenir dans la sécrétion (d'après: Allison, 1973):

- 1: le réseau de microfilaments forme une barrière qui sépare les granules de sécrétion de la membrane plasmique (a). Lorsqu'ils se contractent (b), les granules peuvent atteindre la membrane et libérer leur contenu (c).
- 2: les microfilaments forment un anneau autour de la vésicule (a). Lorsqu'ils se contractent (b), ils poussent la vésicule vers la surface cellulaire (c).
- 3: le granule de sécrétion est maintenu dans une invagination de la membrane plasmique (a) dont les parois peuvent s'écarter suite à la contraction des microfilaments (b). Le granule est ainsi libéré (c) et peut décharger son contenu dans le milieu (d).

- inhibition de l'assemblage des microtubules in vitro (Weihsing, 1978).

- inhibition du transport transmembranaire des hexoses (Plagemann et al., 1978).

4. Objet du travail

Il y a 2 ans, dans le cadre d'un travail semblable à celui-ci, l'effet d'un antimicrotubulaire, la colchicine, a été testé sur l'endocytose du saccharose par le foie de rat in vivo. Il semblait dès lors important, afin de compléter de manière logique le schéma expérimental choisi, de tester, dans de mêmes conditions, l'effet d'une substance affectant un autre composant du cytosquelette, les microfilaments.

En effet, bien que les avis divergent à ce sujet, il pourrait y avoir une relation entre le réseau de microfilaments attachés à la membrane plasmique et les phénomènes endocytotiques.

Cette étude semblait d'autant plus intéressante que la cytochalasine B n'a jamais été utilisée pour étudier l'endocytose du saccharose par le foie de rat in vivo.

Nous utiliserons au cours de ce travail 2 approches expérimentales, l'une biochimique, l'autre morphologique. Nous ne nous sommes pas limités à une seule de ces 2 approches parce que nous avons la conviction que, dans un tel type de travail, ces 2 approches sont complémentaires et ne peuvent pas être utilisées l'une sans l'autre. Ainsi, au cours de cette étude, tenterons-nous d'expliquer les résultats biochimiques que nous obtiendrons grâce aux observations morphologiques. Ces dernières seront réalisées sur de mêmes échantillons que ceux ayant servi pour les dosages biochimiques afin de rendre comparables les 2 types de résultats obtenus.

Ce travail pourrait représenter une contribution à l'étude du rôle joué par le cytosquelette dans l'endocytose et, de manière plus générale, dans l'organisation des hépatocytes.

M A T E R I E L E T M E T H O D E S

I. EXPERIMENTATION IN VIVO

1. Techniques morphologiques

a. Traitement des animaux

- Sous légère anesthésie à l'éther, des rats Wistar femelles à jeun pesant entre 160 et 210 g ont reçu une injection dans la veine fémorale gauche de 0,5 ml de cytochalasine B (Sigma, St Louis, USA) dissoute dans une solution de diméthylsulfoxyde (DMSO) 20 % dans du NaCl 0,9 %. Les différentes doses reçues sont:

- 0,038 mg par 100 g de poids corporel
- 0,077 mg par 100 g de poids corporel
- 0,15 mg par 100 g de poids corporel
- 0,3 mg par 100 g de poids corporel

- Certains de ces rats reçoivent également, 1 heure après l'injection de cytochalasine B, une injection intrapéritonéale de 8 ml d'une solution aqueuse de saccharose 50 % (poids/volume) 30 minutes, 1 heure, 2 heures ou 3 heures avant d'être sacrifiés.

- Les rats témoins ont reçu une injection intraveineuse de 0,5 ml d'une solution NaCl-DMSO sans cytochalasine B, suivie ou non d'une injection intrapéritonéale de saccharose hypertonique.

b. Perfusion du foie

- Les animaux sont laparotomisés sous légère anesthésie à l'éther et le foie est préperfusé par la veine porte avec 50 ml de NaCl 0,9 % à l'aide d'un perfuseur Braun V à un débit de 10 ml/minute.

- Les lobes gauche et médian, destinés à l'analyse biochimique, sont séparés du reste du foie en plaçant une pince "clamp" à hauteur de la branche de la veine porte menant à ces 2 lobes.

- Les lobes droit et caudé sont alors immédiatement perfusés par 25 ml de glutaraldéhyde (Ladd, Burlington, USA) 1,5 % dans du tampon cacodylate 0,1 M pH 7,4 à un débit de 5 ml/minute.

- Le tissu est prélevé et les lobes fixés sont séparés.

c. Fixation et inclusion pour la microscopie électronique

- Le foie est coupé en cubes de 1 mm³ à 4°C dans quelques gouttes de fixateur.

- Fixation pendant 1 heure dans de la glutaraldéhyde 2,5 % dans du tampon cacodylate 0,1 M pH 7,4 à 4°C.

- 3 rinçages de 10 minutes dans du tampon cacodylate 0,1 M pH 7,4 additionné de saccharose 7,5 % à 4°C.

- 2 heures de postfixation dans du tétroxyde d'osmium (BDH, Poole, Grande-Bretagne) 1 % dans du tampon cacodylate 0,1 M pH 7,4 à 4°C.

- 1 rinçage de 10 minutes dans du tampon véronal/acétate 0,05 M pH 5,0 à 4°C. Les échantillons sont alors placés en chambre froide pour la nuit dans le même tampon.

- Le lendemain, rinçage des blocs au tampon véronal/acétate 0,05 M pH 5,0 à 4°C (2 rinçages de 10 minutes).

- Traitement à l'acétate d'uranyle (Merck) 0,5 % dans du tampon véronal/acétate 0,05 M pH 5,0 à 4°C pendant 2 heures à l'obscurité.

- Rinçage avec du tampon véronal/acétate 0,05 M pH 5,0 à 4°C pendant 10 minutes.

- Déshydratation dans de l'éthanol 50°, 70° et 90° (2 bains de 5 minutes chaque fois) à 4°C, puis dans de l'éthanol 100° (3 bains de 10 minutes) à la température du laboratoire.

- Inclusion: 2 bains de 10 minutes dans de l'oxyde de propylène, puis 2 bains de 15 minutes dans un mélange 1/1 d'oxyde de propylène et d'Epon (TAAB, Grande-Bretagne). Enfin, un bain de 1 heure et 30 minutes suivi d'un bain d'1 heure sur rotor dans de l'Epon à 37°C.

- Les cubes sont enrobés dans des gélules qui sont mises à l'étuve à 37°C pendant une nuit, à 45°C pendant 24 heures et à 60°C pendant 72 heures.

- Les coupes fines, de 40 nm environ d'épaisseur, ont été réalisées sur ultramicrotome (Ultratome III, LKB), puis contrastées pendant 30 minutes avec une solution aqueuse d'acétate d'uranyle 1 %, suivie de citrate de plomb selon la technique de Reynolds pendant 7 ou 8 minutes. Les grilles ont été observées au microscope électronique à transmission Philips EM 301.

d. Mise en évidence de la phosphatase acide pour la microscopie électronique

- Fixation pendant 2 heures à 4°C dans un mélange de: glutaraldéhyde 2,5 % dans du tampon cacodylate 0,1 M pH 7,4, paraformaldéhyde (Serva, Heidelberg, Allemagne Fédérale) 2 %, CaCl_2 0,15 % et saccharose 5 %.

- 2 rinçages de 10 minutes dans du tampon cacodylate 0,1 M pH 7,4 additionné de saccharose 7,5 % à 4°C. Les échantillons sont alors placés en chambre froide pour la nuit dans le même tampon.

- Le lendemain, les tranches de tissu sont enrobées dans une solution d'agar noble puis coupées au microtome Sorvall TC2. Les coupes, de 40 μm d'épaisseur, sont recueillies dans du tampon cacodylate 0,1 M pH 7,4 additionné de saccharose 7,5 % à 4°C.

- Incubation des coupes pendant 30 minutes à 37°C dans un milieu test ou dans un milieu témoin préparé extemporanément et constitué comme suit:

Milieu test:

- 40 ml d'eau distillée
- 20 ml de tampon acétate de Na 0,1 M pH 5,0
- 20 ml de β -glycérophosphate de Na 5 mM pH 5,0
- 20 ml de nitrate de plomb 15 mM

Milieu témoin:

- 20 ml d'eau distillée
- 20 ml de NaF 50 mM
- 20 ml de tampon acétate de Na 0,1 M pH 5,0
- 20 ml de β -glycérophosphate de Na 5 mM pH 5,0
- 20 ml de PbNO_3 15 mM

- 3 rinçages de 5 minutes dans du tampon cacodylate 0,1 M pH 7,4 additionné de saccharose 7,5 % à 4°C.
- Postfixation dans de l'OsO₄ 1 % dans du tampon cacodylate 0,1 M pH 7,4 pendant 1 heure à 4°C.
- 3 rinçages de 5 minutes dans du tampon véronal/acétate 0,05 M pH 5,0 à 4°C.
- Traitement à l'acétate d'uranyle 0,5 % dans du tampon véronal/acétate 0,05 M pH 5,0 à 4°C à l'obscurité pendant 1 heure.
- 3 rinçages de 5 minutes dans du tampon véronal/acétate 0,05 M pH 5,0 à 4°C.
- Déshydratation progressive dans de l'éthanol 50°, 70° et 90° (2 bains de 5 minutes chaque fois) à 4°C, puis dans de l'éthanol 100° (2 bains de 10 minutes) à la température du laboratoire.
- Inclusion:
 - oxyde de propylène (1 bain de 5 minutes et un bain de 10 minutes).
 - mélange 1/1 d'oxyde de propylène et d'Epon (1 bain de 30 minutes).
 - Epon à 37°C sur rotor (1 bain de 30 minutes).
- Enrobage des coupes dans des assiettes remplies d'Epon.
- Polymérisation à 37°C pendant 1 nuit, à 45°C pendant 24 heures et à 60°C pendant 72 heures.
- Les coupes fines ont été réalisées, contrastées et observées comme décrit précédemment(cf l. c.).

2. Techniques biochimiques

a. Préparation des 2 fractions sur lesquelles les mesures sont effectuées

Les lobes gauche et médian, non fixés lors de la perfusion, sont broyés immédiatement après leur prélèvement au moyen d'un

homogénéiseur de Potter-Elvehjem (Thomas, Phila, USA) dans du mannitol 0,25 M à 4°C (3 passages du piston dont la vitesse de rotation est de 2800 tours/minute).

Une partie de cet homogénat, filtré, est ensuite centrifugé 40 minutes à 39000 RPM ($3 \cdot 10^6$ g.min) dans un rotor type 40. Le surnageant est prélevé et constitue la fraction soluble, ou fraction non sédimentable. Homogénat et surnageant sont dilués 10 fois.

b. Mesure des activités libres, totales et solubles d'enzymes lysosomiaux

- Activité libre de la phosphatase acide

Cette mesure se fait le jour-même de l'expérience, sur des fractions non congelées. Elle indique le taux d'enzyme librement accessible au substrat (Wattiaux, 1966).

- Activités totales de la phosphatase acide et de la β -galactosidase

Ces mesures sont effectuées en ajoutant au milieu d'incubation un détergent, du Triton X-100, à une concentration de 0,1 %. Dans ces conditions, la membrane des lysosomes est détruite et les hydrolases acides sont totalement accessibles à leur substrat (Wattiaux, 1966).

- Activités solubles de la phosphatase acide et de la β -galactosidase

La mesure de ces activités se fait sur les fractions solubles, ou surnageants, décrites précédemment, avec la même mixture que celle utilisée pour déterminer les activités totales des 2 enzymes.

Une unité d'activité enzymatique est déterminée comme étant la quantité d'enzyme capable de décomposer 1 μ mole de substrat par minute dans les conditions de l'essai.

Les conditions dans lesquelles nous avons effectué le dosage de ces 2 enzymes sont reprises dans le tableau I.

ENZYME	SUBSTRAT	TAMPON	T°C	METHODE DE MESURE	REFERENCE
Phosphatase acide	β -glycérophosphate de Na 0,05 M	Acétate (5,0)	37°C	Colorimétrique du phosphate inorganique à 650 nm	Gianetto, de Duve, 1955
β -Galactosidase	p-nitrophénol β -galactoside $3,7 \cdot 10^{-3}$ M	Citrate (3,6)	37°C	Colorimétrique du p-nitrophénol à 400 nm	Sellinger et al., 1960

Tableau I : Méthodes de mesures enzymatiques

c. Dosage des protéines: Méthode de Lowry (1951)

Le dosage se base sur la réaction des groupements tyrosine et tryptophane des protéines, dénaturées au préalable par la soude caustique, avec le réactif de Folin Ciocalteu. La lecture colorimétrique s'effectue à 540 nm. La quantité de protéines est exprimée en mg par gramme de foie.

d. Dosage du saccharose

Il s'effectue sur un filtrat obtenu après déprotéinisation par un mélange équimoléculaire de $ZnSO_4$ et $Ba(OH)_2$ (Weichselbaum, Somogyi, 1941, cité par: Wattiaux, 1966).

Par hydrolyse à 37°C pendant 1 heure en présence d'invertase (Sigma, St Louis, USA) dans du tampon acétate 0,1 M pH 4,5, le saccharose est transformé en un mélange équimoléculaire de glucose et de fructose.

Une partie de ce filtrat ne subit pas l'hydrolyse par l'invertase et donne la mesure du glucose libre.

La partie du filtrat qui a subi l'inversion du saccharose donne la mesure du glucose total. La différence entre les 2 valeurs nous fournit la concentration en saccharose (μ moles par gramme de foie).

Le dosage du glucose se base sur l'oxydation du glucose par la glucose-oxydase et la réduction de l'eau oxygénée ainsi libérée par la peroxydase. Au cours de cette dernière réaction, l'o-dianisidine incolore est oxydée en un composé coloré (lecture colorimétrique à 450 nm).

II. PERFUSION EN CIRCUIT FERME DU FOIE DE RAT

1. Appareillage

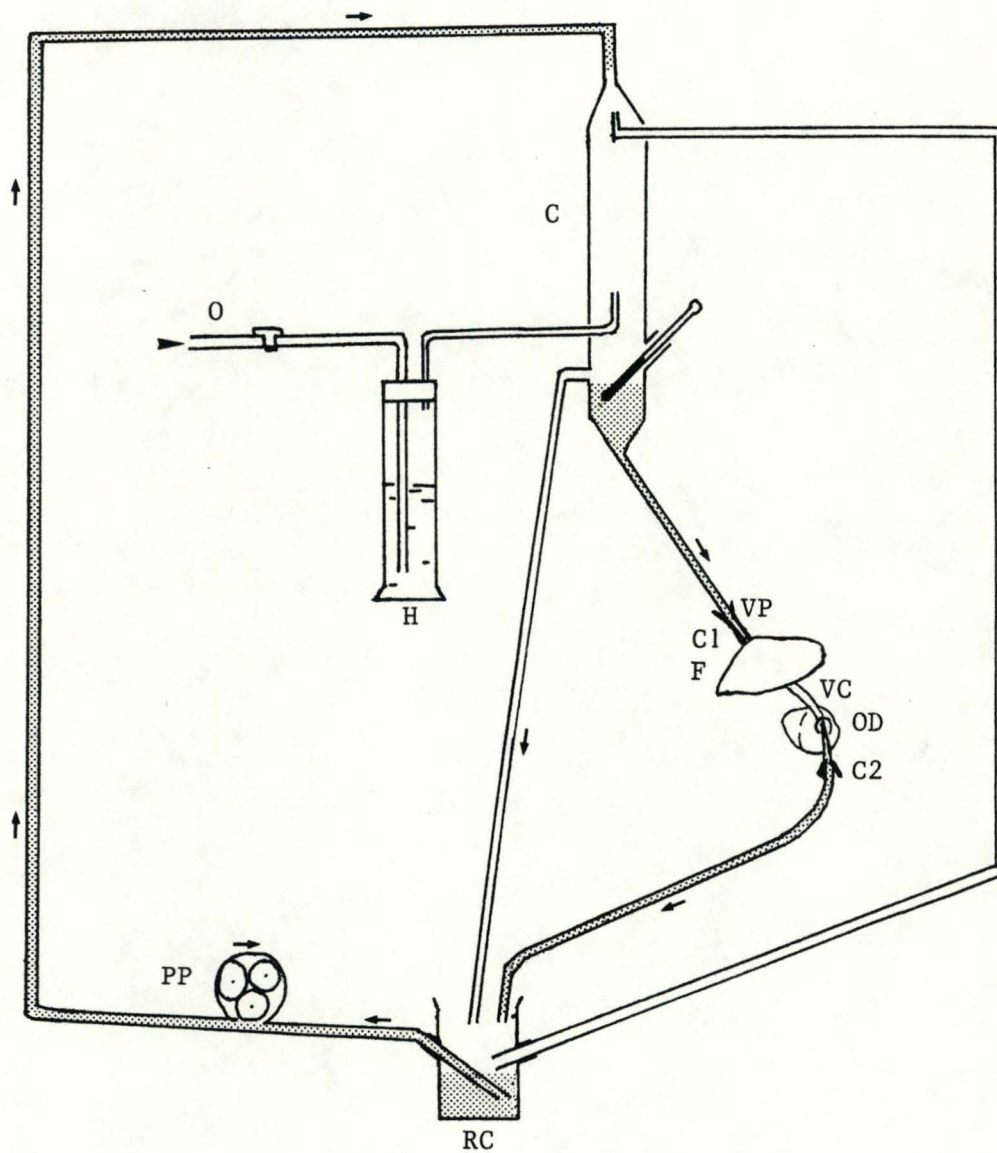
L'installation utilisée est représentée à la figure 1. Le milieu de perfusion est stocké dans un récipient central, relié à une pompe péristaltique (Millipore) qui conduit le perfusat au sommet d'une colonne de verre. Au cours de son passage dans celle-ci, le milieu de perfusion est oxygéné par un mélange gazeux composé de 95 % d'oxygène et de 5 % de dioxyde de carbone (carbogène) saturé en vapeur d'eau. De la colonne, le perfusat est ramené vers le foie d'où il retourne ensuite vers le récipient de départ. Toute l'installation est enfermée dans une enceinte thermostatisée dans laquelle la température est maintenue à 37°C. Le réglage de la pression hydrostatique, et donc du débit, se réalise en faisant varier la différence de hauteur entre la position du rat et le bas de la colonne. Au cours de la perfusion, le pH est contrôlé continuellement grâce à une électrode de pH mètre plongeant dans le réservoir central.

2. Milieu de perfusion

Nous avons utilisé le milieu Leibovitz L-15 avec glutamine (Flow Laboratories, Irvine, Ecosse) comme milieu de perfusion. Sa composition est reproduite ci-dessous.

Ingredient	mg/litre	Ingredient	mg/litre
L-Alanine	225 0	D-Calcium pantothenate	1 00
L-Arginine	500 0	Choline chloride	1 00
L-Asparagine H ₂ O	250 0	Folic acid	1 00
L-Cysteine	120 0	L-Inositol	2 00
L-Glutamine	300 0	Nicotinamide	1 00
Glycine	200 0	Pyridoxine HCl	1 00
L-Histidine	250 0	Riboflavin phosphate, sodium salt	0 10
L-Isoleucine	125 0	Thiamin monophosphate 2H ₂ O	1 00
L-Leucine	125 0	CaCl ₂ 2H ₂ O	185 5
L-Lysine HCl	93 70	KCl	400 0
L-Methionine	75 00	KH ₂ PO ₄	60 00
L-Phenylalanine	125 0	MgSO ₄ 7H ₂ O	400 0
L-Serine	200 0	NaCl	800 0
L-Threonine	300 0	Na ₂ HPO ₄	19 0 0
L-Tryptophan	20 00	D-Galactose	900 0
L-Tyrosine disodium salt	372 9	Phenol red sodium salt	10 00
L-Valine	100 0	Sodium pyruvate	550 0

Figure 1 : Dispositif expérimental de perfusion en circuit fermé du foie de rat.



- | | |
|--------------------------|--|
| C: colonne | RC: réservoir central |
| C1, C2: catheters 1 et 2 | PP: pompe péristaltique |
| VP: veine porte | H: humidificateur |
| F: foie | O: Oxygénation du milieu
par du carbogène |
| VC: veine cave | |
| OD: oreillette droite | |

3. Technique opératoire et perfusion

a. Préparation de la perfusion

Le rat est anesthésié par injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (120 mg/Kg de poids corporel).

Une incision est pratiquée depuis le bas jusqu'au sommet de l'abdomen et les viscères sont déplacés sur la droite de manière à dégager la veine cave inférieure et la veine porte.

Une première ligature est préparée autour de la veine cave inférieure à hauteur du rein, en aval de la veine rénale (les positions des ligatures et des catheters sont représentées à la figure 2).

De l'héparine (500 U.I./Kg de poids corporel) est injectée dans la veine cave en amont de cette première ligature.

Deux ligatures sont préparées autour de la veine porte, distantes l'une de l'autre d'environ 1 cm. Un catheter est introduit dans la veine porte entre ces 2 ligatures. Ces dernières sont alors serrées, celle en aval autour du catheter, l'autre servant à bloquer la circulation dans la veine porte.

Après ouverture de la cage thoracique par 2 incisions parallèles de part et d'autre du sternum, le noeud de la dernière ligature est préparé autour de la portion thoracique de la veine cave. Un catheter est introduit, par l'oreillette droite, dans la veine et la ligature est serrée autour de celle-ci.

Il ne reste plus alors qu'à serrer la toute première ligature de la veine cave pour isoler le foie.

b. Rinçage initial du foie

Le catheter de la veine porte est raccordé au circuit de perfusion. Pendant 10 minutes, le foie est rincé avec du milieu de perfusion à un débit de 10 ml/minute. Cette préperfusion a pour but d'éliminer le sang qui obstrue le réseau de sinusoides du foie.

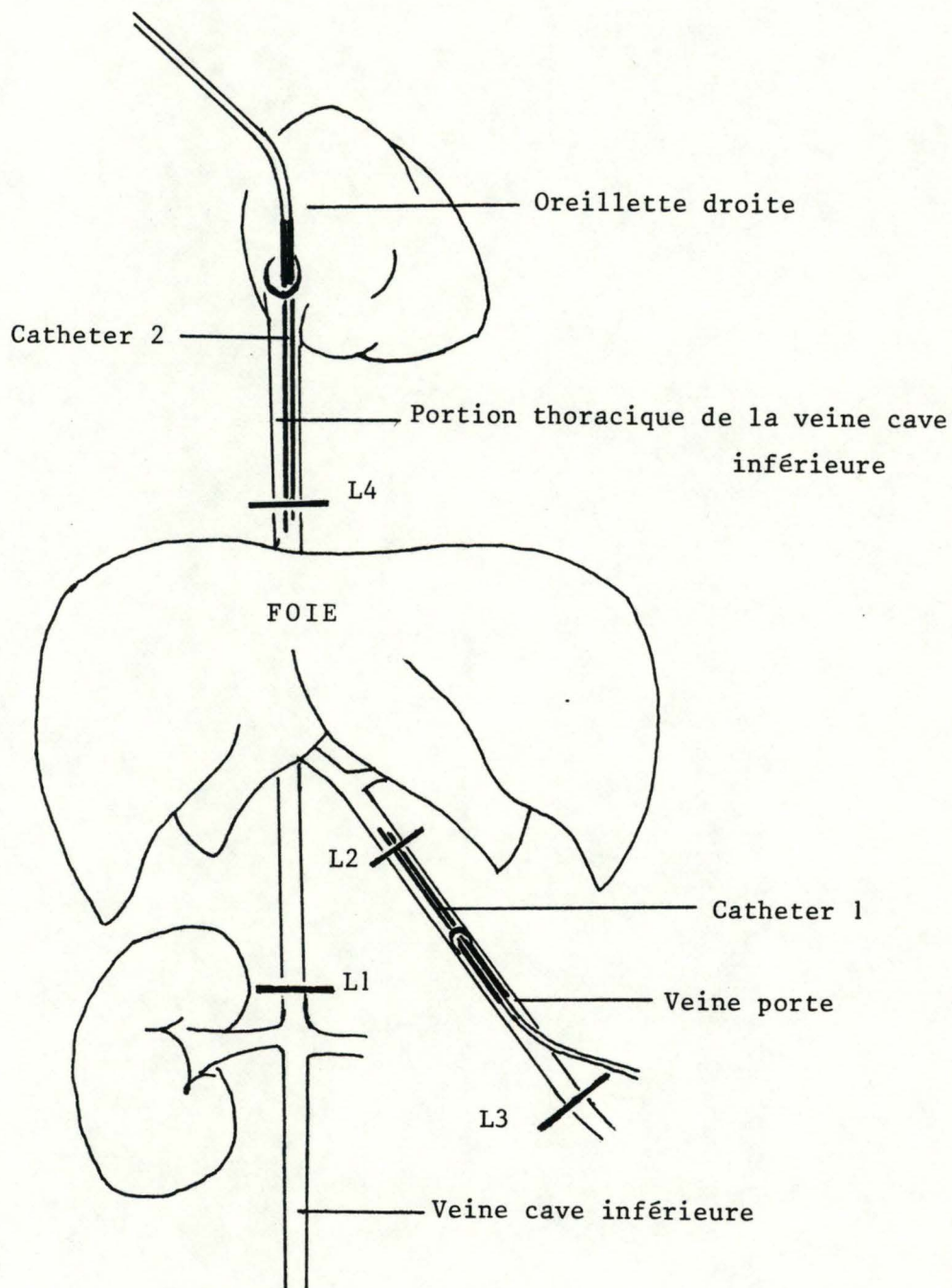


Figure 2 : Positions des ligatures (L1 → L4) et des catheters.

c. Perfusion proprement dite

Après le rinçage initial du foie, le catheter situé sur la portion thoracique de la veine cave est raccordé à son tour au circuit de perfusion et le volume du perfusat est ajusté à 120 ml. Pendant 1 heure, aucune substance n'est ajoutée au milieu de perfusion. Ce délai correspond au temps d'accomodation du foie aux conditions particulières qui lui sont imposées. Ensuite, différents traitements sont appliqués:

- témoin sans DMSO
- témoin avec DMSO
- saccharose sans DMSO
- saccharose avec DMSO

Le DMSO est additionné au perfusat 1 heure après le début de la perfusion. Le volume ajouté est de 1,2 ml, de sorte que la concentration finale de DMSO est de 1 % (v/v).

Le saccharose est ajouté 2 heures après le début de la perfusion. Il est additionné sous forme d'une solution de saccharose 53,4 % dans du milieu de perfusion. Comme le volume ajouté est de 10 ml, la molarité finale du saccharose dans le perfusat est de 0,12 M. Nous avons choisi cette concentration car elle correspond à la la valeur à laquelle se maintient la saccharémie durant une période de 18 heures après l'injection intrapéritonéale d'une solution de saccharose 50 % in vivo (Wattiaux, 1966).

La durée totale de la perfusion est de 4 heures.

d. Postperfusion

Afin de pouvoir mesurer la capture hépatique du saccharose, il est nécessaire d'éliminer la contamination par le saccharose plasmatique. Pour cette raison, après les 2 heures de perfusion en présence du sucre, le foie est à nouveau rincé, avec du milieu Leibovitz sans saccharose. Cette postperfusion s'effectue avec un perfuseur Braun, à un débit de 5 ml/minute, pendant 20 minutes. Le foie est ensuite prélevé. Une partie est immédiatement homogénéisée pour réaliser le fractionnement, une autre est conservée pour l'analyse morphologique.

4. Préparation pour la microscopie électronique

Celle-ci est identique à ce que nous avons décrit précédemment (cf I.l.c.), mise à part la durée de fixation dans la glutaraldéhyde 2,5 % dans du tampon cacodylate 0,1 M pH 7,4 qui est ici de 2 heures du fait de l'absence de préfixation in situ.

5. Techniques biochimiques

a. Fractionnement des foies perfusés

Nous avons utilisé pour cette étape de notre travail le modèle de centrifugation différentielle en milieu homogène établi par de Duve et al. (1955). Une suite de centrifugations, réalisées à des vitesses de plus en plus élevées, permet de purifier, plus ou moins, les particules en fonction de leur taille et/ou de leur densité (figure 3). La technique que nous avons utilisée pour isoler 5 fractions subcellulaires comporte une première étape d'homogénéisation du foie et de centrifugations dans une centrifugeuse de l'International Company (Rotor 253). Les étapes suivantes sont réalisées dans une centrifugeuse Spinco LHV50 (Rotor 40).

Lors de fractionnements, nous avons essayé plusieurs types d'homogénéisation différents, utilisant soit le Potter, soit un homogénéiseur de Dounce (Blaessig Glass, Rochester, USA). Le Dounce, manipulé à la main, représente un système d'homogénéisation beaucoup moins lésant que le Potter car les forces de cisaillement qui sont exercées sur le tissu par le passage du piston s'y font en un seul point. Le Dounce peut s'utiliser avec 2 types de piston: un piston "Loose" ou un piston "Tight".

Le foie est en fait homogénéisé en 3 fois lors d'un fractionnement et après chacune de ces homogénéisations; l'homogénat est centrifugé, à 1700 RPM la première fois, à 1500 RPM les autres fois. Lorsque l'on utilise le Potter comme moyen d'homogénéisation, l'on effectue 1 passage du piston lors de chacune de ces 3 homogénéisations. Avec le Dounce, nous avons décidé d'effectuer 5 passages du

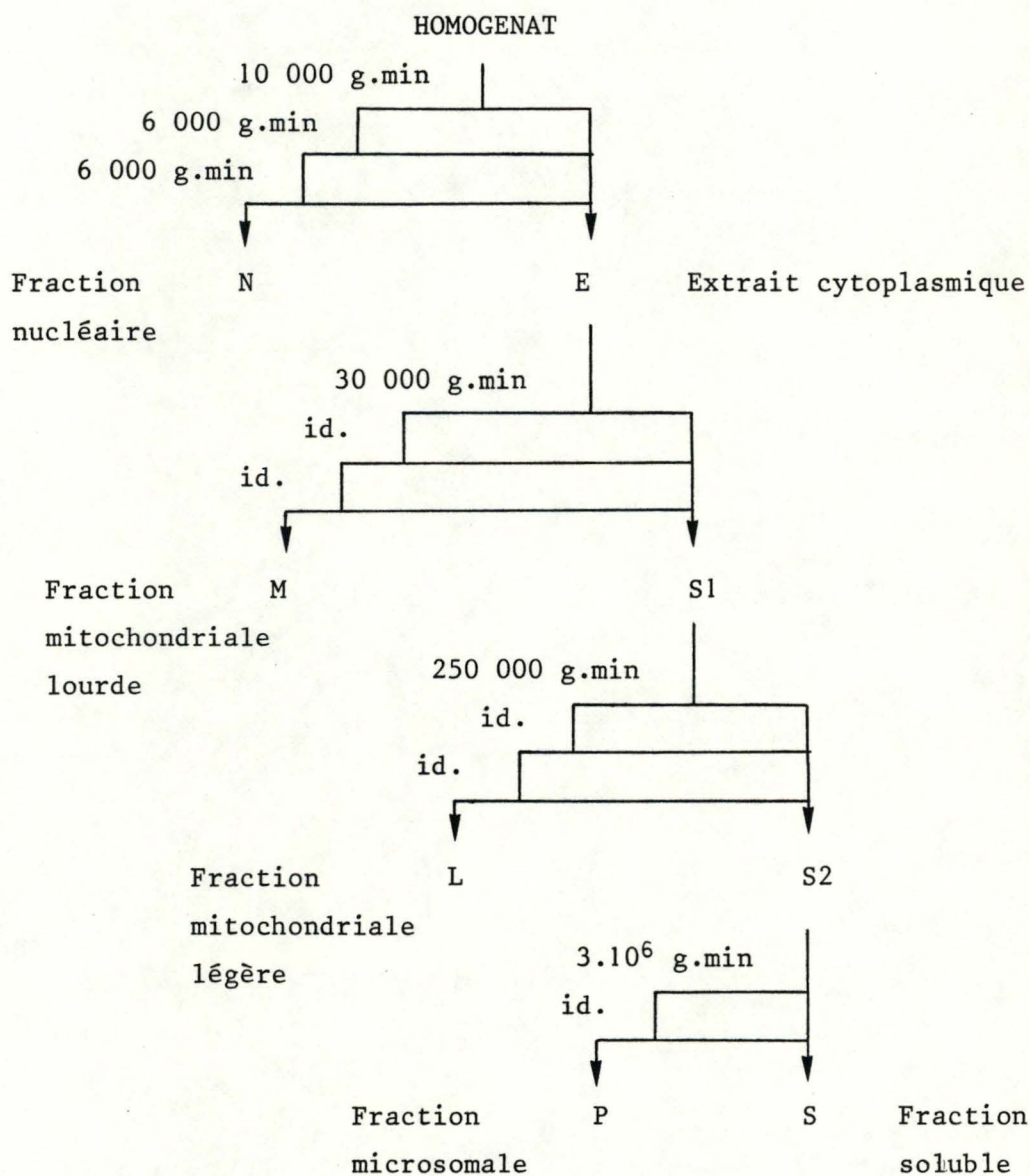


Figure 3 : schéma de centrifugation différentielle en milieu homogène basé sur la méthode de de Duve et al. (1955).

$$g \cdot \text{min} = \int_0^t g_m \cdot dt \quad \text{où} \quad t = \text{temps de centrifugation}$$

g_m = force moyenne de centrifugation, existant à la distance radiale

$$g_m = \frac{1}{981} \cdot \omega^2 \cdot R_m \quad \text{où} \quad R_m = \frac{1}{2} (R_{\min} + R_{\max}), \text{ à mi-hauteur de la colonne de liquide par rapport à l'axe de rotation}$$

$$\omega = \frac{2 \cdot \Pi \cdot \text{tpm}}{60}$$

piston la première fois, 3 passages la seconde fois et 2 passages la dernière fois. De plus, nous avons décidé d'essayer différentes combinaisons à partir des 2 types de piston afin de mettre au point le système d'homogénéisation qui convenait le mieux au matériel que nous fractionnions. Cette démarche est décrite dans la partie Résultats et Discussions de ce travail.

b. Dosages sur les fractions

Les mêmes dosages que ceux décrits précédemment (cf I.2.) ont été effectués sur les fractions obtenues par centrifugation différentielle des foies perfusés, c-à-d les dosages de la phosphatase acide, de la β -galactosidase, du saccharose et des protéines.

Nous avons également dosé, dans le perfusat, la lactate déshydrogénase, qui est un enzyme cytoplasmique. L'activité de cet enzyme dans le milieu de perfusion nous renseignera sur l'état de conservation des cellules du foie durant la perfusion, étant donné que la lactate déshydrogénase n'est libérée que lorsque les cellules sont lésées. Les mesures de l'activité de cet enzyme ont été réalisées sur des échantillons de perfusat prélevés toutes les 30 minutes. Le dosage se base sur l'oxydation, par la lactate déshydrogénase, du NADH en NAD^+ en présence de pyruvate, à 20°C. La lecture s'effectue à 340 nm (Plummer, Wilkinson, 1963). Une unité enzymatique de lactate déshydrogénase est la quantité d'enzyme qui oxyde 1 μmole de NADH par minute, dans les conditions de l'essai.

c. Présentation des résultats

Les répartitions des protéines et des activités enzymatiques sont calculées en % de l'homogénat (E+N). La somme des activités dans les fractions subcellulaires rapportée à l'activité dans l'homogénat (E+N) donne la récupération, une valeur toujours proche de 100 % sauf s'il y a des anomalies. La représentation graphique des répartitions des activités enzymatiques se fait grâce à des histogrammes. En abscisse sont mis les pourcentages de protéines

dans l'ordre où les fractions sont isolées, en ordonnée l'activité spécifique relative (ASR), c'est-à-dire, pour chaque fraction, le rapport du pourcentage d'activité enzymatique sur le pourcentage de protéines dans la fraction.

Nous avons utilisé le même type de représentation pour le saccharose, bien qu'on ne puisse pas parler, dans ce cas, d'activité spécifique relative.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. EFFET DE LA CYTOCHALASINE B SUR L'ENDOCYTOSE DU
SACCHAROSE PAR LE FOIE DE RAT IN VIVO

A. ANALYSE BIOCHIMIQUE

1. Etude de l'effet de doses croissantes de cytochala-
sine B

Cette étude a été menée pour comparer les effets de différents traitements sur les activités de 2 enzymes lysosomiaux, la phosphatase acide et la β -galactosidase, dans les fractions sédimentables et non sédimentables, sur la capture hépatique du saccharose ainsi que la distribution de celui-ci entre les fractions sédimentables et non sédimentables.

Les variations des pourcentages d'activité libre et non sédimentable des 2 hydrolases acides nous renseigneront sur le taux d'endocytose du saccharose par le foie car, lors d'un traitement au saccharose, les lysosomes hépatiques se dilatent et leur membrane se rompt plus facilement lors de l'homogénéisation, libérant ainsi les enzymes dans la solution.

a. Doses de cytochalasine B injectées

Ainsi que nous l'avons déjà mentionné précédemment, les 4 doses de cytochalasine injectées aux rats sont:

- 0,038 mg par 100g de poids corporel
- 0,077 mg par 100g de poids corporel
- 0,15 mg par 100g de poids corporel
- 0,3 mg par 100g de poids corporel

Ces doses ont été choisies parce que, immédiatement après l'injection, elles correspondent à des concentrations de cytochalasine dans le plasma comprises entre 6,25 et 50 $\mu\text{g/ml}$ (10 à 100 μM), si l'on suppose que, chez le rat, le volume total sanguin représen-

te 5,93 % du poids corporel (Thirion et al., 1983). Ces concentrations correspondent à celles généralement utilisées par les auteurs qui ont travaillé avec la cytochalasine B.

Le temps entre l'injection du saccharose et le sacrifice de l'animal est de 2 heures pour toutes les expériences réalisées dans cette partie du travail.

b. Dosages d'enzymes lysosomiaux

- Phosphatase acide (Tableau I, figures 1 à 3)

Les activités totales de cet enzyme ne varient pas selon les traitements et restent comprises entre 7 et 9 unités/g de foie (Tableau I). Les pourcentages d'activité libre et non sédimentable sont par contre très nettement supérieurs chez les rats ayant reçu l'injection du saccharose par rapport à leurs témoins (Tableau I, figure 1).

Pour visualiser l'effet de l'augmentation de la dose de cytochalasine injectée, nous avons représenté, dans la figure 2, l'évolution des pourcentages d'activité libre et non sédimentable chez les rats cytochalasine + saccharose en fonction de la dose injectée. Les zones en pointillés représentent les écarts entre le pourcentage maximal et le pourcentage minimal d'activité libre et non sédimentable chez les rats NaCl-DMSO + saccharose 2h. Le même type de graphique a été réalisé pour les rats prétraités à la cytochalasine mais n'ayant pas reçu l'injection de saccharose (Figure 3). Ils y sont comparés aux rats NaCl-DMSO.

Les pourcentages d'activité libre et non sédimentable tendent à être légèrement supérieurs chez les rats cytochalasine + saccharose par rapport aux rats NaCl-DMSO + saccharose (cf également le tableau I) et inférieurs chez les rats cytochalasine par rapport aux témoins NaCl-DMSO.

- β -galactosidase (Tableau II, figure 4)

Tableau I : Activités totales et pourcentages d'activité libre et non sédimentable de la phosphatase acide

Traitement des rats	Activités totales		Act. libres	Act. non séd.
	u/g foie	u/100 mg protéines	% act. totales	% act. totales
NaCl-DMSO (1)	7,35	3,42	32,8	14,4
Cytoch.(0,038 mg/100g) (1)	8,07	3,63	34,3	11,8
NaCl-DMSO + Saccharose 2h (1)	8,02	3,40	68,6	28,1
Cytoch.(0,038 mg/100g) + Saccharose 2h (1)	7,33	4,10	71,6	30,9
NaCl-DMSO (1)	7,85	3,36	44,5	16,8
Cytoch.(0,077 mg/100g) (1)	8,46	3,72	33,5	13,7
NaCl-DMSO + Saccharose 2h (1)	7,52	3,23	62,8	29,5
Cytoch.(0,077 mg/100g) + Saccharose 2h (2)	8,14	3,68	64,8	30,9
NaCl-DMSO (3)	9,07 ± 0,50	4,29 ± 0,37	33,9 ± 4,3	12,6 ± 2,3
Cytoch.(0,15 mg/100g) (2)	9,16	4,25	28,6	9,8
NaCl-DMSO + Saccharose 2h (3)	8,40 ± 0,81	3,94 ± 0,24	56,8 ± 13,5	25,8 ± 7,8
Cytoch.(0,15 mg/100g) + Saccharose 2h (4)	7,98 ± 1,67	4,15 ± 0,40	63,1 ± 11,3	30,3 ± 7,5
NaCl-DMSO (2)	7,98	3,61	45,0	17,9
Cytoch.(0,3 mg/100g) (2)	7,82	4,02	41,8	15,7
NaCl-DMSO + Saccharose 2h (2)	8,95	3,95	58,8	28,7
Cytoch.(0,3 mg/100g) + Saccarose 2h (3)	7,86 ± 0,79	3,50 ± 0,33	60,1 ± 7,1	27,4 ± 4,8

effet saccharose

(Entre parenthèses, le nombre de déterminations)

Figure 1 : Activités totales, libres et non sédimentables
de la phosphatase acide

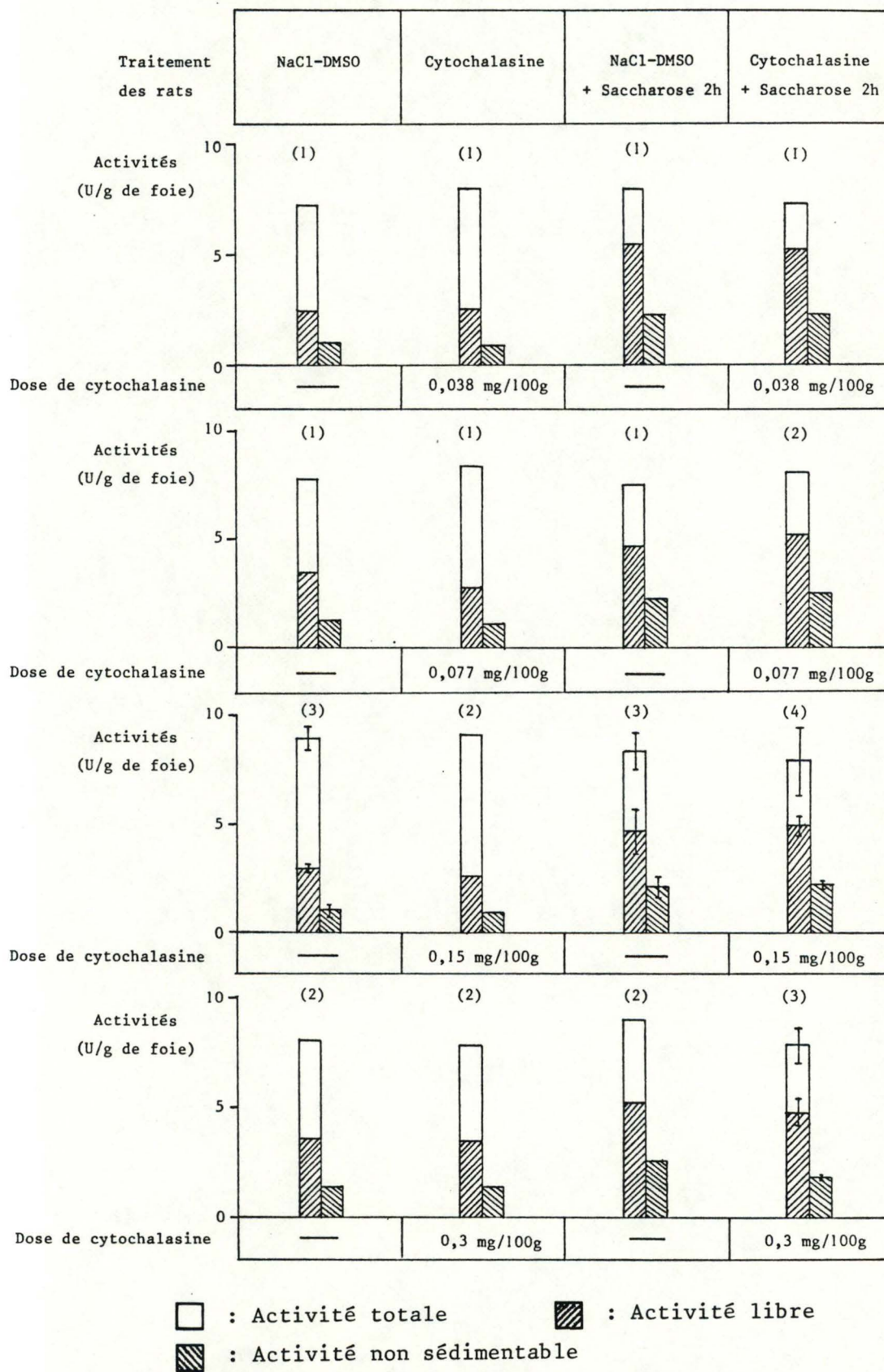
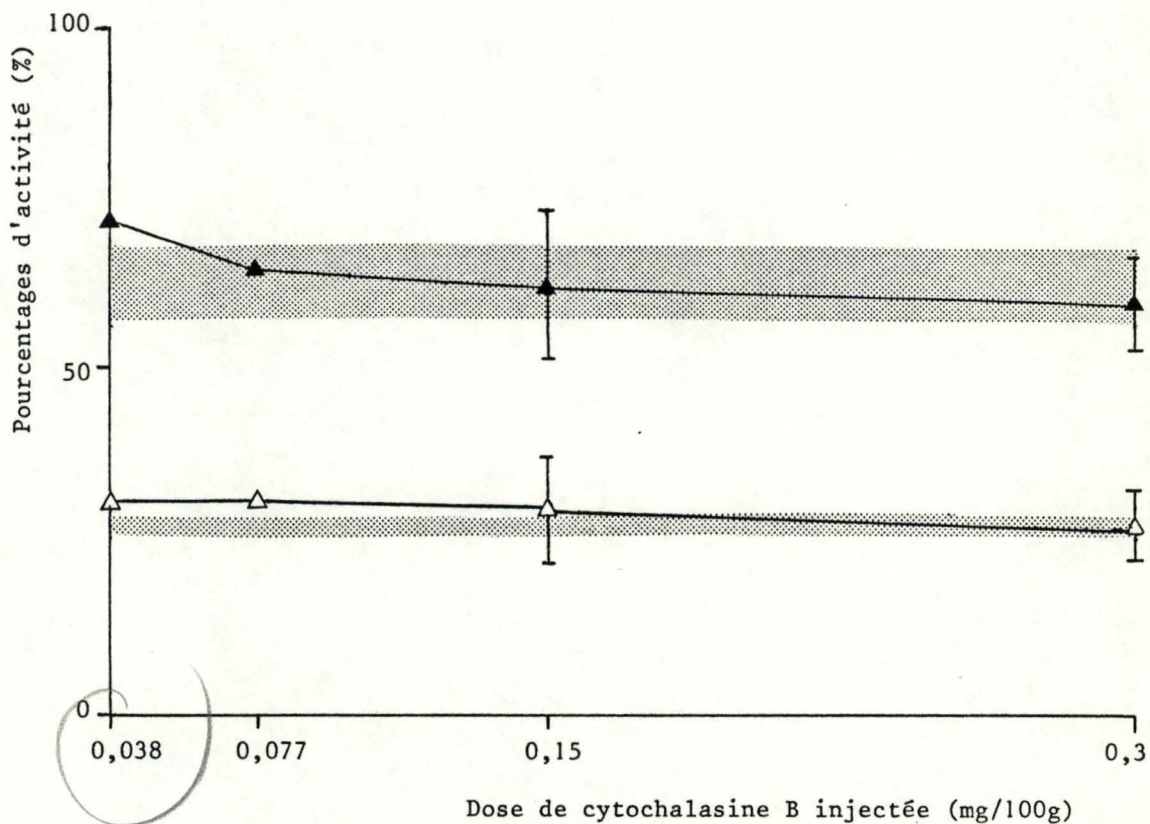
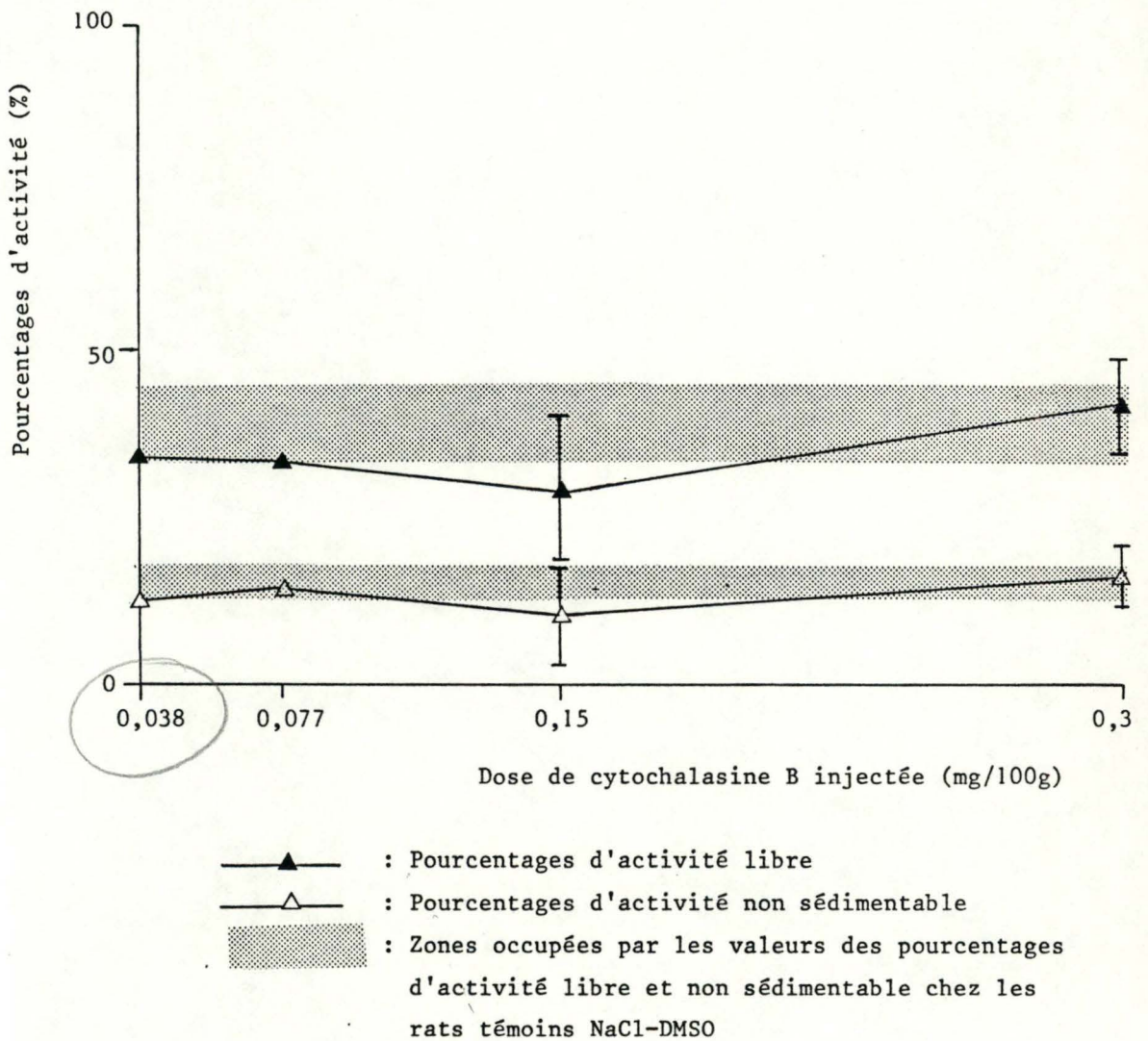


Figure 2 : Evolution des pourcentages d'activité libre et non sédimentable en fonction de la dose de cytochalasine B injectée chez les rats cytochalasine + saccharose 2 heures.



—▲— : Pourcentages d'activité libre
—○— : Pourcentages d'activité non sédimentable
▨ : Zones occupées par les valeurs des pourcentages d'activité libre et non sédimentable chez les rats NaCl-DMSO + Saccharose 2 heures.

Figure 3 : Evolution des pourcentages d'activité libre et non sédimentable en fonction de la dose de cytochalasine B injectée chez les rats cytochalasine.



Les activités totales de la β -galactosidase montrent plus de variations que ce que nous avons observé pour la phosphatase acide, mais ces variations ne semblent pas être liées à un traitement particulier (Tableau II). De même que pour la phosphatase acide, les pourcentages d'activité non sédimentable de la β -galactosidase sont légèrement supérieurs chez les rats cytochalasine + saccharose par rapport aux rats NaCl-DMSO + saccharose (sauf pour une dose de cytochalasine de 0,3 mg/100g) et inférieurs chez les rats cytochalasine par rapport aux témoins NaCl-DMSO (Tableau II, figure 4).

c. Mesure de la capture hépatique du saccharose (Tableau III)

A l'exception de l'expérience réalisée avec la plus faible dose de cytochalasine (0,038 mg/100g), les rats cytochalasine + saccharose présentent des concentrations de saccharose dans les fractions sédimentables et non sédimentables légèrement inférieures à celles obtenues pour les rats saccharose non prétraités à la cytochalasine. Cependant, cette différence ne s'accroît guère lorsque l'on augmente la dose de cytochalasine.

Les pourcentages de saccharose présent dans le surnageant par rapport à l'homogénat sont très nettement supérieurs aux pourcentages d'activité non sédimentable calculés pour la phosphatase acide et la β -galactosidase. Ce phénomène sera discuté plus loin.

2. Effet de durées croissantes de traitement au saccharose

Etant donné l'absence d'effet apparent de l'augmentation de la dose de cytochalasine B injectée sur les pourcentages d'activité libre et non sédimentable des hydrolases acides et sur la capture hépatique du saccharose, nous avons décidé de continuer nos expériences avec la dose la plus faible de cytochalasine. En effet, bien que de nombreux auteurs ont montré l'absence de toxicité de la cytocha-

Tableau II : Activités totales et pourcentages d'activité non sédimentable de la β -galactosidase

Traitement des rats	Activités totales		Act. non séd.
	u/g foie	u/100 mg protéines	% act. totales
NaCl-DMSO (1)	0,81	0,38	27,2
Cytoch.(0,038 mg/100g) (1)	0,85	0,38	17,6
NaCl-DMSO + Saccharose 2h (1)	1,03	0,45	40,4
Cytoch.(0,038 mg/100g) + Saccharose 2h (1)	1,02	0,47	41,9
NaCl-DMSO (1)	0,94	0,40	21,3
Cytoch.(0,077 mg/100g) (1)	0,94	0,41	15,9
NaCl-DMSO + Saccharose 2h (1)	1,02	0,44	42,2
Cytoch.(0,077 mg/100g) + Saccharose 2h (2)	0,93	0,42	49,5
NaCl-DMSO (3)	1,15 \pm 0,17	0,47 \pm 0,07	14,8 \pm 3,5
Cytoch.(0,15 mg/100g) (2)	1,13	0,52	13,3
NaCl-DMSO + Saccharose 2h (3)	1,03 \pm 0,06	0,49 \pm 0,08	37,5 \pm 16,3
Cytoch.(0,15 mg/100g) + Saccharose 2h (4)	1,01 \pm 0,08	0,50 \pm 0,02	42,9 \pm 9,9
NaCl-DMSO (2)	0,97	0,44	31,1
Cytoch.(0,3 mg/100g) (2)	1,02	0,52	20,5
NaCl-DMSO + Saccharose 2h (2)	1,00	0,44	48,2
Cytoch.(0,3 mg/100g) + Saccharose 2h (3)	0,99 \pm 0,13	0,44 \pm 0,05	45,4 \pm 8,1

*effet
Saccharose*

Figure 4 : Activités totales et non sédimentables de la β -galactosidase

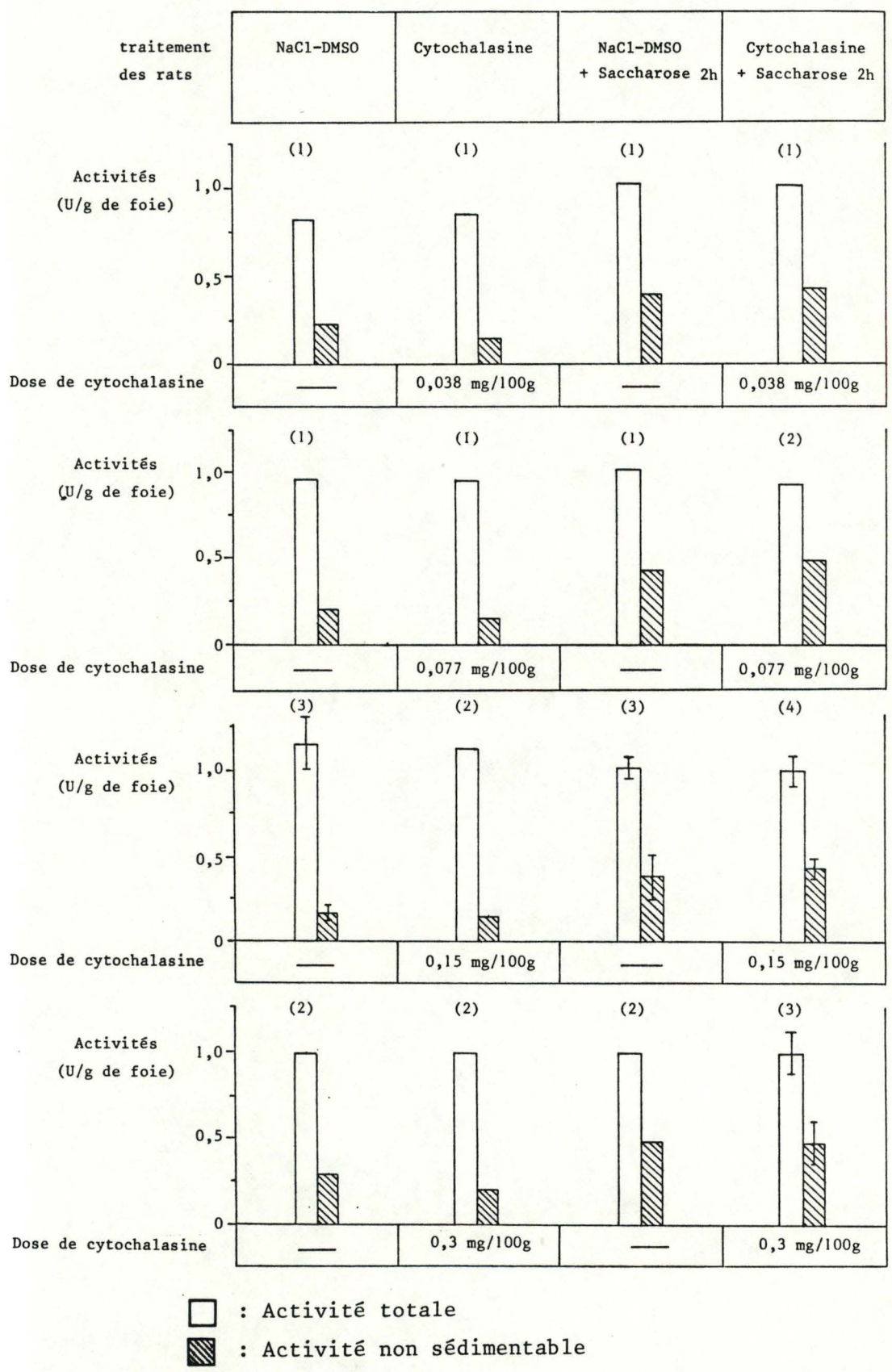


Tableau III : Captures hépatiques du saccharose et pour-
centages de saccharose non sédimentable.

Traitement des rats	Homogénats		% de Saccharose non sédimentable
	μmoles/g foie	μmoles/100 mg protéines	
NaCl-DMSO + Saccharose 2h (1)	14,1	7,9	69,3
Cytoch.(0,038 mg/100g) + Saccharose 2h (1)	17,5	8,1	75,8
NaCl-DMSO + Saccharose 2h (1)	17,5	7,5	73,7
Cytoch.(0,077 mg/100g) + Saccharose 2h (2)	14,3	6,5	78,2
NaCl-DMSO + Saccharose 2h (2)	17,6	8,4	74,7
Cytoch.(0,15 mg/100g) + Saccharose 2h (3)	14,8 ± 3,6	7,3 ± 1,9	74,4 ± 6,2
NaCl-DMSO + Saccharose 2h (2)	19,2	9,4	71,9
Cytoch.(0,3 mg/100g) + Saccharose 2h (3)	15,7 ± 2,9	7,0 ± 1,1	66,3 ± 11,3

la d'efful

lasine B sur des cellules en culture, nous avons fréquemment observé la présence de sang dans l'urine de rats ayant reçu l'injection de cytochalasine à de fortes doses (0,15 et 0,3 mg/100g).

Dans cette partie du travail, nous avons étudié l'effet de la cytochalasine en présence de traitements au saccharose de durées croissantes. Le saccharose est injecté 1 heure après le prétraitement à la cytochalasine ou au mélange NaCl-DMSO, et le rat est sacrifié 30 minutes, 1 heure, 2 heures ou 3 heures après l'injection de ce saccharose. Nous n'avons pas, en fait, recommencé d'expérience cytochalasine (0,038 mg/100g) - saccharose 2 heures étant donné que nous l'avions déjà réalisée dans la première partie de cette étude biochimique, et nous avons donc repris les résultats obtenus alors.

a. Dosage des enzymes lysosomiaux

- Phosphatase acide (Tableau IV, figures 5 et 6)

Les activités totales de cet enzyme ne varient pas selon les traitements. Les activités non sédimentables sont par contre assez nettement supérieures chez les rats ayant reçu l'injection de saccharose par rapport à leurs témoins. Nous n'avons pas pu représenter ici les valeurs des activités libres de la phosphatase acide étant donné qu'il nous manque ces résultats pour 3 des expériences de cette partie de l'analyse biochimique.

Les rats cytochalasine + saccharose montrent des pourcentages d'activité non sédimentable supérieurs à ceux des rats NaCl-DMSO + saccharose, et ceci quelle que soit la durée du traitement au saccharose (Figure 6).

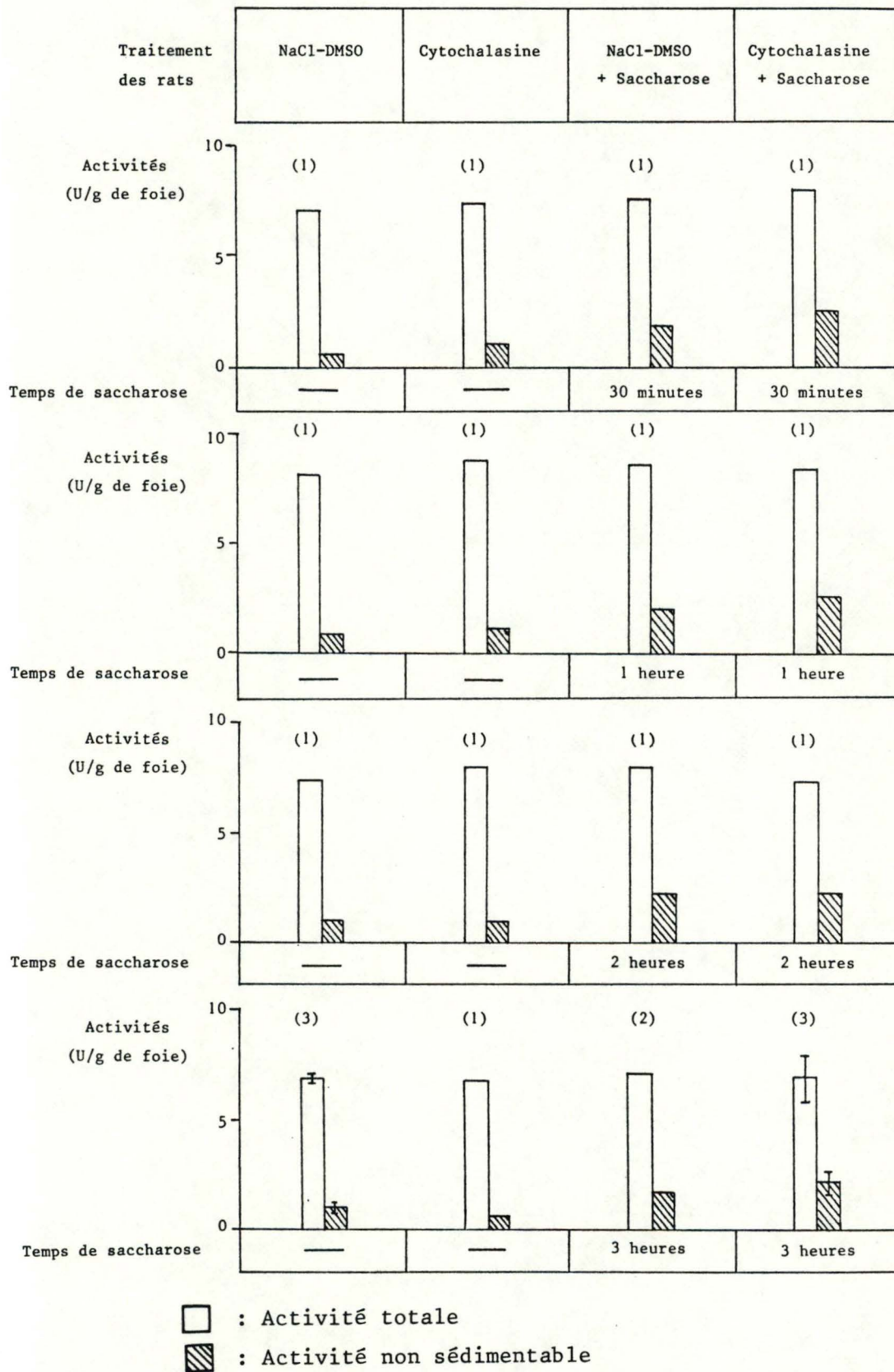
Remarquons enfin que les pourcentages d'activité non sédimentable chez les rats ayant reçu l'injection de saccharose ne varient pas de manière importante lorsque l'on augmente la durée du traitement au saccharose (Figure 6). Ceci devra être discuté ultérieurement.

Tableau IV : Activités totales et pourcentages d'activité non sédimentable de la phosphatase acide

Traitements des rats	Activités totales		Act. non séd.
	U/g foie	U/100 mg protéines	% act. totales
NaCl-DMSO (1)	7,11	3,15	8,7
Cytoch. (0,038 mg/100g) (1)	7,41	3,39	15,5
NaCl-DMSO + Saccharose 30' (1)	7,66	3,21	24,8
Cytoch. (0,038 mg/100g) + Saccharose 30' (1)	7,94	3,26	31,5
NaCl-DMSO (1)	8,14	3,56	9,8
Cytoch. (0,038 mg/100g) (1)	8,74	3,96	12,6
NaCl-DMSO + Saccharose 1h (1)	8,60	4,13	22,2
Cytoch. (0,038 mg/100g) + Saccharose 1h (1)	8,37	4,04	30,2
NaCl-DMSO (1)	7,35	3,42	14,4
Cytoch. (0,038 mg/100g) (1)	8,07	3,63	11,8
NaCl-DMSO + Saccharose 2h (1)	8,02	3,40	28,1
Cytoch. (0,038 mg/100g) + Saccharose 2h (1)	7,33	4,10	30,9
NaCl-DMSO (3)	6,79 ± 0,22	3,15 ± 0,10	15,1 ± 3,8
Cytoch. (0,038 mg/100g) (1)	6,75	3,68	8,6
NaCl-DMSO + Saccharose 3h (2)	6,97	3,87	23,6
Cytoch. (0,038 mg/100g) + Saccharose 3h (3)	6,81 ± 1,06	3,48 ± 0,53	31,1 ± 5,1

cf. Tableau
I
13 d'effets
Vps

Figure 5 : Activités totales et non sédimentables
de la phosphatase acide



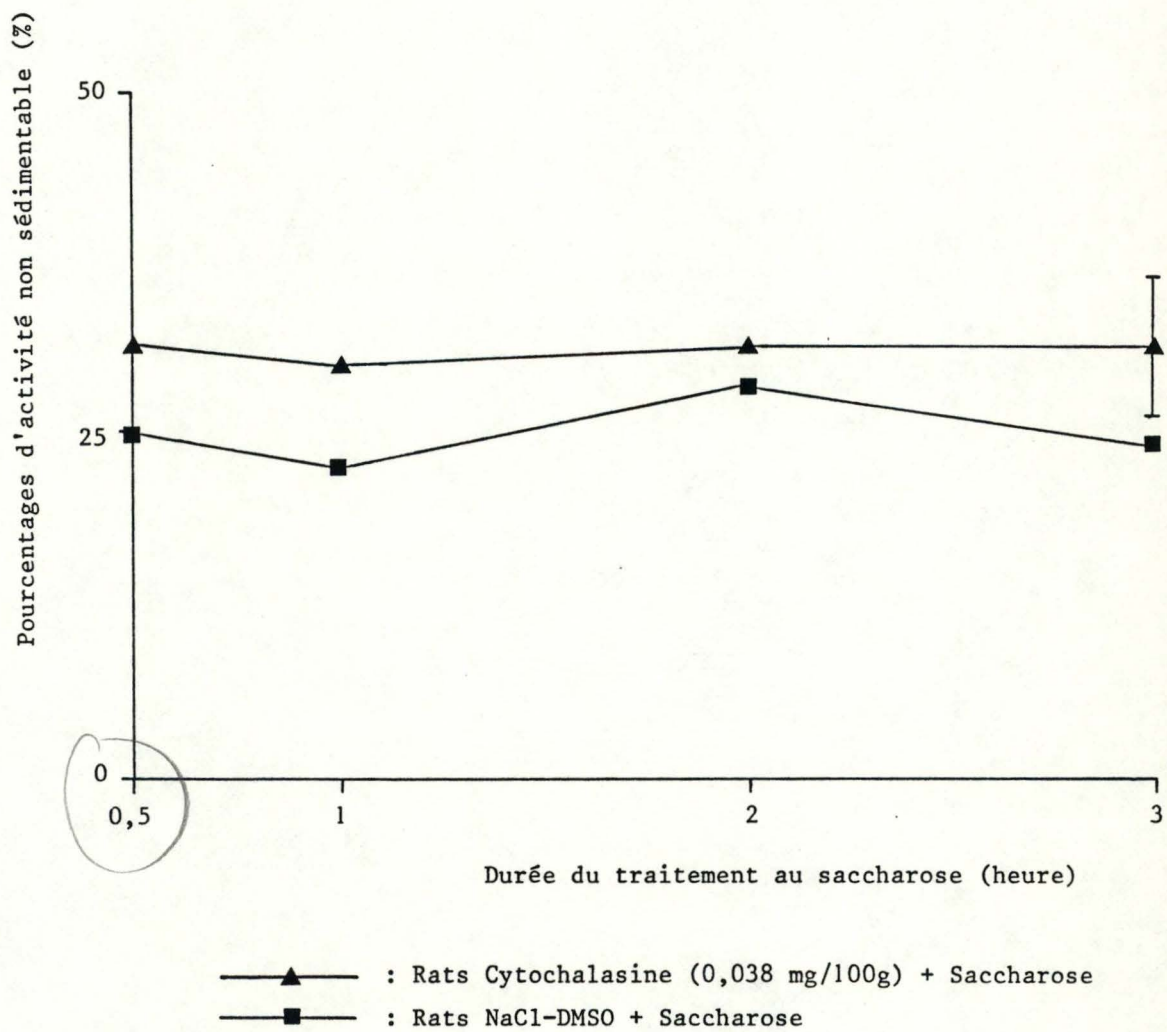


Figure 6 : Evolution des pourcentages d'activité non sédimentable en fonction de la durée du traitement au saccharose chez les rats cytochalasine + saccharose et NaCl-DMSO + saccharose.

- β -galactosidase (Tableau V, figure 7)

Les activités totales de la β -galactosidase varient fortement d'un rat à l'autre, mais ces variations ne semblent pas être liées à un traitement particulier. Les pourcentages d'activité non sédimentable sont supérieurs chez les rats traités au saccharose par rapport aux rats qui n'ont pas reçu l'injection de saccharose, mais ces différences semblent moins constantes que celles que nous avons obtenues pour la phosphatase acide.

Les rats cytochalasine + saccharose montrent à nouveau des pourcentages d'activité non sédimentable supérieurs à ceux obtenus avec des rats non prétraités à la cytochalasine avant l'injection du saccharose.

b. Capture hépatique du saccharose (Tableau VI)

Si les concentrations de saccharose présentent des valeurs plus élevées dans les homogénats de foies de rats qui n'ont pas reçu l'injection de cytochalasine (à l'exception d'une seule expérience), les pourcentages de saccharose non sédimentable sont par contre supérieurs chez les rats prétraités à la cytochalasine. Quant aux concentrations relativement élevées mesurées dans l'homogénat et le surnageant après 30 minutes, elles s'expliquent probablement par une mauvaise perfusion du foie.

3. Discussion

Nous n'avons obtenu une capture du saccharose supérieure chez un rat prétraité à la cytochalasine par rapport à son témoin que lors d'une seule expérience. Dans tous les autres cas, la cytochalasine inhibe, partiellement, l'endocytose du saccharose par le foie. Bien qu'il faille rester très prudent vis-à-vis de ces résultats étant donné le nombre peu élevé d'expériences réalisées, ces résultats semblent en accord avec ceux obtenus par Wagner) et ses collaborateurs. Ceux-ci ont en effet mon-

(-)

Tableau V : Activités totales et pourcentages d'activité non sédimentable de la β -galactosidase

Traitement des rats	Activités totales		Act. non séd.
	U/g foie	U/100 mg protéines	% act. totales
NaCl-DMSO (1)	0,87	0,39	20,7
Cytoch.(0,038 mg/100g) (1)	0,63	0,29	39,7
NaCl-DMSO + Saccharose 30' (1)	0,80	0,34	45,0
Cytoch.(0,038 mg/100g) + Saccharose 30' (1)	0,97	0,40	53,6
NaCl-DMSO (1)	0,76	0,40	22,8
Cytoch.(0,038 mg/100g) (1)	0,71	0,37	23,6
NaCl-DMSO + Saccharose 1h (1)	1,06	0,51	36,8
Cytoch.(0,038 mg/100g) + Saccharose 1h (1)	1,21	0,58	42,9
NaCl-DMSO (1)	0,81	0,38	27,2
Cytoch.(0,038 mg/100g) (1)	0,85	0,38	17,6
NaCl-DMSO + Saccharose 2h (1)	1,03	0,45	40,4
Cytoch.(0,038 mg/100g) + Saccharose 2h (1)	1,02	0,47	41,9
NaCl-DMSO (3)	0,60 \pm 0,09	0,27 \pm 0,04	20,5 \pm 5,3
Cytoch.(0,038 mg/100g) (1)	0,66	0,36	13,6
NaCl-DMSO + Saccharose 3h (2)	0,58	0,32	42,0
Cytoch.(0,038 mg/100g) + Saccharose 3h (3)	0,67 \pm 0,29	0,35 \pm 0,16	48,8 \pm 3,4

Figure 7 : Activités totales et non sédimentables
de la β -galactosidase

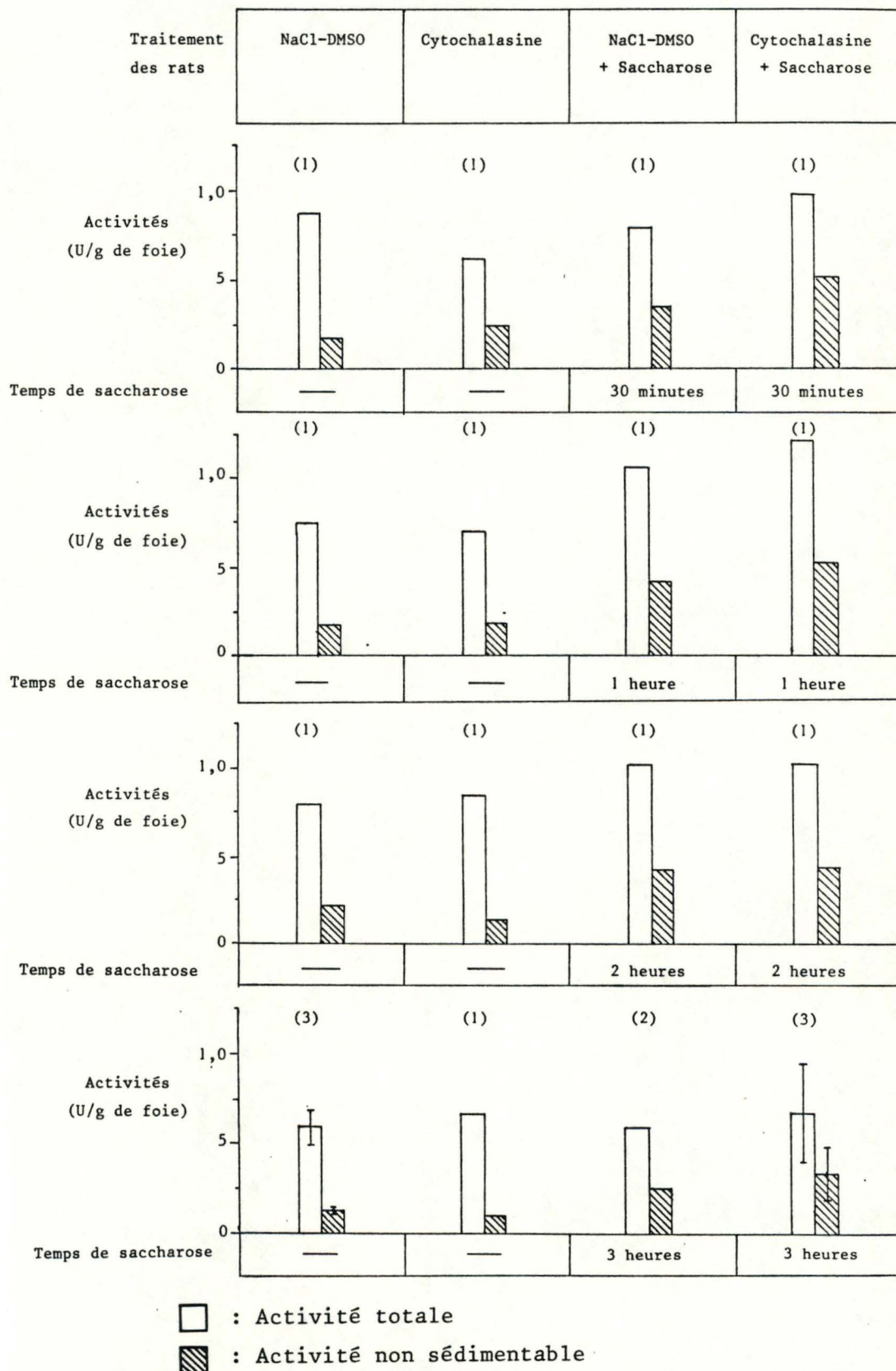


Tableau VI : Captures hépatiques du saccharose et pourcentages de saccharose non sédimentable

Traitement des rats	Homogénats		% de Saccharose non sédimentable
	µmoles/g foie	µmoles/100 mg protéines	
NaCl-DMSO + Saccharose 30' (1)	12,4	5,2	58,4
Cytoch. (0,038 mg/100g) + Saccharose 30' (1)	6,2	2,6	68,1
NaCl-DMSO + Saccharose 1h (1)	8,6	4,2	65,3
Cytoch. (0,038 mg/100g) + Saccharose 1h (1)	4,1	2,0	87,8
NaCl-DMSO + Saccharose 2h (1)	14,1	7,9	69,3
Cytoch. (0,038 mg/100g) + Saccharose 2h (1)	17,5	8,1	75,8
NaCl-DMSO + Saccharose 3h (2)	16,4	8,0	57,5
Cytoch. (0,038 mg/100g) + Saccharose 3h (3)	14,3 ± 1,2	7,4 ± 0,8	69,8 ± 9,7

tré que la cytochalasine B, à une concentration de 20 µg/ml, inhibait l'endocytose fluide du saccharose par des cellules de foie en culture (Wagner et al., 1971). Cependant, nos résultats ne concordent pas avec la majorité des résultats obtenus depuis, qui montrent l'absence d'effet de la cytochalasine B sur l'endocytose de type fluide (Davies, Allison, 1978). Seule l'analyse morphologique nous permettra de proposer une explication à cette contradiction apparente.

Il nous faut à présent tenter d'expliquer certaines observations faites au cours de cette analyse biochimique:

- La capture hépatique ~~hépatique~~ du saccharose, à l'exception d'une seule expérience, est toujours supérieure chez les rats NaCl-DMSO + saccharose par rapport aux rats ayant subi le prétraitement à la cytochalasine. Par contre, les rats cytochalasine + saccharose montrent, à l'exception des expériences menées avec la plus forte dose de cytochalasine, des pourcentages d'activité libre et non sédimentable des enzymes lysosomiaux supérieurs aux pourcentages obtenus pour les rats ayant reçu l'injection de saccharose sans prétraitement préalable à la cytochalasine. Ces différences contradictoires pourraient s'expliquer par une action lésante de la cytochalasine sur la membrane lysosomiale. Cette explication ne semble cependant pas convenir car les rats prétraités à la cytochalasine sans injection ultérieure du sucre montrent des pourcentages d'activité libre et non sédimentable inférieurs à ceux obtenus pour les rats témoins NaCl-DMSO. Il se pourrait donc que ce soit la combinaison des 2 traitements, à la cytochalasine et au saccharose, qui soit responsable de ce phénomène.

- Alors que la capture hépatique ~~hépatique~~ du saccharose augmente graduellement lorsque l'on augmente la durée du traitement au saccharose, les pourcentages d'activité non sédimentable de la phosphatase acide et de la β-galactosidase chez les rats NaCl-DMSO + saccharose et cytochalasine + saccharose ne semblent pas varier. Nous pourrions supposer, pour expliquer ce phénomène, que les lyso-

somes chargés en saccharose contiendraient proportionnellement plus d'hydrolases après 30 minutes qu'après 3 heures de traitement au saccharose. Etant donné qu'après 3 heures le nombre de lysosomes chargés est plus élevé, la quantité d'hydrolases libérées resterait globalement identique. Cependant, étant donné que nous n'avons réalisé qu'une seule expérience pour des temps de traitement au saccharose de 30 minutes, 1 heure et 2 heures, il se pourrait que ce phénomène ne soit dû qu'à la variabilité normale des pourcentages d'activité non sédimentable des 2 hydrolases et il nous apparaît par conséquent assez difficile de tirer, ici, des conclusions à ce sujet.

Remarquons pour terminer l'écart important entre les pourcentages de saccharose non sédimentable chez les 2 types de rats traités au saccharose et les valeurs que nous avons relevées pour les hydrolases lysosomiales. Wattiaux signalait déjà cet écart durant les premières heures suivant l'injection du saccharose. Il invoque 3 facteurs pouvant contribuer à cet écart (Wattiaux, 1966):

- Une contamination possible par du saccharose plasmatique résultant d'une perfusion insuffisante.

- L'existence d'une forme de transit du sucre entre le plasma et les lysosomes, soit libre dans le cytoplasme, soit associée à des structures perméables au sucre ou détruites lors de l'homogénéisation.

- La répartition inégale du saccharose entre les lysosomes au début de la capture. Si la fragilité des lysosomes est fonction de leur taille, on doit s'attendre à voir se rompre de préférence les granules les plus chargés de saccharose et donc à observer une libération proportionnellement plus grande de saccharose que d'enzyme.

B. ANALYSE MORPHOLOGIQUE

1. Résultats

a. Rats témoins NaCl-DMSO (Planches I et II)

L'examen au microscope électronique confirme l'aspect normal des cellules hépatiques de ces rats contrôles. Les canalicules biliaires apparaissent non dilatés, et sont bordés de part et d'autre par des corps denses d'aspect classique. Les vacuoles d'autophagie sont généralement assez rares. L'appareil de Golgi est situé en bordure des canalicules biliaires. Il montre des citernes normalement dilatées contenant des lipoprotéines en relative abondance.

De nombreux microfilaments sont présents au voisinage des canalicules biliaires et de l'espace de Disse.

b. Rats cytochalasine (Planches III à IX)

Les canalicules biliaires sont généralement fortement dilatés, mais il est souvent possible, sur une même coupe de foie, d'observer des degrés différents de dilatation des canalicules. Dans les hépatocytes de rats traités avec de fortes doses de cytochalasine, l'on peut observer une diminution très nette du nombre de microvillosités dans la lumière des canalicules biliaires et dans l'espace de Disse (Figures 15 et 18). Notons cependant que, même pour ces doses, il est toujours possible de distinguer le réseau de microfilaments sous la membrane plasmique sinusoidale et canaliculaire.

L'aspect des corps denses, quelle que soit la dose injectée, est toujours fort différent de celui des corps denses d'hépatocytes de rats témoins. Ils présentent une matrice hétérogène contenant des inclusions claires (Figures 7 à 13, 16 et 17). La nature de ces inclusions sera discutée ultérieurement.

Les sacculés des dictyosomes de l'appareil de Golgi apparaissent assez dilatés (Figures 8 à 13, 17) et souvent plus dispersés

autour du canalicule biliaire que chez des rats témoins. Leur contenu en VLDL ne semble pas différer fortement de ce que nous avons observé chez ces derniers.

Nous observons fréquemment, sous la membrane plasmique sinusoidale, des vésicules de tailles diverses contenant des lipoprotéines ainsi que des lysosomes ayant ingéré des VLDL (Figures 14 et 18).

Ces caractéristiques se retrouvent, bien que parfois à des degrés différents, pour toutes les doses de cytochalasine testées.

c. Rats NaCl-DMSO + saccharose 2 heures (Planches X à XIII)

Après 2 heures de traitement au saccharose, nous observons, dans les hépatocytes, de nombreuses vacuoles claires aux électrons. Leur taille est généralement nettement supérieure à celle des corps denses. Il est parfois possible de deviner le halo caractéristique des lysosomes sous leur membrane limitante (Figures 21 et 24). Cette dernière présente fréquemment des interruptions (Figures 22 et 25). Ces vacuoles sont généralement localisées dans le voisinage des canalicules biliaires.

Nous observons fréquemment des fusions entre des vacuoles claires et des vacuoles d'autophagie. Ceci explique que ces premières contiennent, outre un matériel finement granulaire, de nombreux résidus membranaires (Figures 21 et 22). La présence de ces structures membranaires en voie de dégradation à l'intérieur des vacuoles claires s'explique également par le fait qu'il est courant d'observer ces vacuoles englobant une portion du cytoplasme environnant.

Les citernes des dictyosomes de l'appareil de Golgi sont dilatées et d'aspect clair aux électrons (Figures 22 et 24).

Il est souvent possible d'observer, à proximité des vacuoles claires, des corps denses non chargés de saccharose (Figure 19).

Enfin, de nombreuses lipoprotéines (VLDL) sont présentes dans l'espace de Disse (Figure 25).

d. Rats cytochalasine + saccharose 2 heures (Planches XIV à XXI)

Nous retrouvons, dans les hépatocytes de ces rats, certaines caractéristiques que nous avons déjà mentionné pour des hépatocytes de rats traités uniquement à la cytochalasine B, et ceci pour toutes les doses testées:

- dilatation importante des canalicules biliaires avec réduction du nombre de microvillosités présentes dans leur lumière.
- matrice hétérogène des corps denses avec présence d'inclusions claires d'aspect lipidique.

Associées aux canalicules biliaires et aux corps denses qui les bordent encore, nous observons, de même que chez les rats NaCl-DMSO + saccharose, de grandes vacuoles claires de saccharose. Celles-ci présentent fréquemment des inclusions semblables à celles observées dans les corps denses (Figures 26, 27 et 35) et sont souvent associées à des vacuoles d'autophagie avec lesquelles elles peuvent fusionner (Figure 26).

Les citernes de l'appareil de Golgi présentent un aspect peu différent de celui des hépatocytes de rats NaCl-DMSO + saccharose.

Nous observons moins de VLDL au niveau de l'espace de Disse que chez les rats traités au saccharose sans prétraitement à la cytochalasine. Ces lipoprotéines semblent par contre s'être accumulées sous la membrane sinusoïdale à l'intérieur de vésicules de sécrétion et de lysosomes (Figure 36). Nous observions déjà cela chez des rats traités uniquement à la cytochalasine (cf figures 14 et 18).

e. Rats NaCl-DMSO + saccharose 30 minutes, 1 heure et 3 heures

(Planches XXII à XXV)

- Saccharose 30 minutes (Planches XXII et XXIII)

Les vacuoles claires sont moins grandes et moins nombreuses

que chez les rats saccharose 2 heures. Elles sont cependant plus abondantes au niveau des cellules endothéliales bordant les capillaires sinusoides. Des lysosomes non dilatés et des vacuoles d'autophagie sont observés fréquemment à proximité des vacuoles claires, ainsi que des peroxysomes qui semblent plus abondants (Figure 44). L'espace de Disse contient relativement peu de lipoprotéines.

- Saccharose 1 heure (Planche XXIV)

Les vacuoles claires, bien que plus nombreuses déjà, sont encore peu abondantes et localisées principalement près des canalicules biliaires, où s'observent également des corps denses non dilatés. Les dictyosomes de l'appareil de Golgi montrent des citernes claires et légèrement dilatées.

- Saccharose 3 heures (Planche XXV)

Les vacuoles claires sont beaucoup plus abondantes et se retrouvent dispersées dans le cytoplasme et à proximité des noyaux. De nombreuses vacuoles d'autophagie sont présentes, ainsi que quelques corps denses d'aspect normal, mais ceux-ci sont déjà beaucoup plus rares.

f. Rats cytochalasine (0,038 mg/100g) + saccharose 30 minutes, 1 heure et 3 heures (Planches XXVI à XXIX)

- Saccharose 30 minutes (Planche XXVI)

Les hépatocytes de ces rats montrent des canalicules biliaires assez dilatés, entourés de nombreux corps denses et de vacuoles claires peu abondantes. Les corps denses présentent à nouveau les inclusions claires caractéristiques du prétraitement à la cytochalasine.

- Saccharose 1 heure (Planche XXVII)

L'aspect des hépatocytes de ces rats est fort semblable à celui décrit pour les rats cytochalasine + saccharose 30 minutes. Les vacuoles claires y sont cependant plus grandes et plus nombreuses.

- Saccharose 3 heures (Planches XXVIII et XXIX)

Les vacuoles sont très abondantes et semblent localisées préférentiellement à proximité des noyaux. Les vacuoles d'autophagie sont très abondantes et montrent fréquemment des fusions avec des vacuoles claires (Figure 53). Des particules qui pourraient être des VLDL sont parfois observées dans ces vacuoles claires. Les citernes de l'appareil de Golgi sont relativement peu dilatées.

g. Marquage cytochimique de la phosphatase acide

(Planches XXX à XXXII)

- Rats témoins NaCl-DMSO (Planche XXX)

Les seules vésicules positives au marquage de la phosphatase acide sont les corps denses péribiliariers, dont la matrice, homogène, présente une accumulation assez dense de précipité de phosphate de plomb.

- Rats cytochalasine (Planche XXX)

Les corps denses, positifs au marquage, présentent une matrice plus hétérogène dans laquelle nous observons de grandes inclusions claires, non marquées, que nous avons déjà décrites précédemment.

- Rats NaCl-DMSO + saccharose (Planche XXXI)

Après 2 heures de traitement au saccharose, le marquage se retrouve principalement au niveau des grandes vacuoles claires de saccharose. Cependant d'autres structures, plus petites, sont également positives et pourraient correspondre à des lysosomes

non encore dilatés.

Après un traitement au saccharose de 3 heures, le marquage se retrouve exclusivement au niveau des vacuoles de saccharose, et semble plus intense. Ces vacuoles contiennent énormément de figures myéliniques résultant de la fusion de ces vacuoles avec des vacuoles d'autophagie.

- Rats cytochalasine (0,038 mg/100g) + saccharose

(Planche XXXII)

Il n'est pas possible, quelle que soit la durée du traitement au saccharose, d'observer une différence importante au niveau de l'intensité du marquage à l'intérieur des vacuoles de saccharose par rapport aux rats saccharose n'ayant pas reçu l'injection de cytochalasine. De même, le nombre de figures myéliniques à l'intérieur de ces vacuoles ne semble pas différer fortement de ce que nous observions chez les rats NaCl-DMSO + saccharose (Figure 61).

2. Discussion

a. Formation de vacuoles claires induite par le saccharose

La formation de vacuoles claires dans les hépatocytes de rats ayant reçu une injection de saccharose semblerait faire intervenir deux mécanismes: la concentration dans les lysosomes d'une partie au moins du saccharose capté par le foie et l'accumulation d'eau qu'elle entraîne (Wattiaux, 1966).

Certains auteurs ont suggéré que les vacuoles claires proviendraient des corps denses modifiés par le traitement au saccharose, étant donné qu'ils observent une diminution du nombre de corps denses normaux parallèlement à la durée du traitement au saccharose (Vercruyssen, 1983). Ceci permettrait d'expliquer que, même après 3 heures de traitement au saccharose, nous obser-

vions encore des corps denses d'aspect normal à proximité des vacuoles claires.

De même, la persistance de ces lysosomes non dilatés nous permet de comprendre l'écart important que nous avons observé entre les pourcentages de saccharose et ceux d'hydrolases lysosomiales dans les fractions non sédimentables par rapport aux homogénats (cf I.A.).

Nous avons observé fréquemment, chez les rats traités au saccharose, des fusions entre vacuoles claires et entre celles-ci et des vacuoles d'autophagie. Ces fusions pourraient également expliquer l'augmentation de taille des vacuoles au cours du temps (Vercruyssen, 1983).

L'augmentation du nombre de vacuoles d'autophagie chez les rats traités au saccharose est, quant à elle, difficilement explicable. L'on pourrait penser que ce phénomène provient d'un effet toxique du saccharose sur les cellules, mais la plupart des études in vitro signalent le maintien de la capacité de prolifération des cellules cultivées en présence de saccharose.

Notons enfin que de nombreux auteurs ont décrit une induction de la synthèse et de l'activité des hydrolases lysosomiales par le saccharose (Wattiaux, 1966; Warburton, Wynn, 1976; Kato et al., 1984). Nous n'avons pas observé, dans la partie biochimique de ce travail, d'augmentation des activités totales de la phosphatase acide et de la β -galactosidase chez les rats traités au saccharose par rapport à leurs témoins.

b. Effets de la cytochalasine B sur l'ultrastructure des hépatocytes

OK | L'effet de la cytochalasine B le plus spectaculaire que nous avons pu observer est la dilatation du canalicule biliaire. Outre cette dilatation, nous avons également observé une diminution nette du nombre de microvillosités présentes dans

la lumière des canalicules. Ces observations sont en accord avec ce que l'on sait à propos du rôle des microfilaments dans la sécrétion biliaire (Oda, Phillips, 1977; Kacich et al., 1983; Klaasen, Watkins, 1984).

Au niveau de l'espace de Disse, par contre, l'effet de la cytochalasine semble moins apparent. Le nombre de microvillosités ne diminue que faiblement lorsque l'on augmente la dose de cytochalasine injectée, et nous n'avons jamais observé d'évaginements de la membrane plasmique ni de boursouflures décrites par d'autres auteurs (Wagner et al., 1971). La cytochalasine semblerait donc avoir un effet plus important sur la membrane canaliculaire.

Nous avons signalé précédemment (cf Introduction) que la cytochalasine B n'agissait pas en dépolymérisant les microfilaments, et que le contenu en microfilaments des cellules traitées par rapport aux cellules témoins ne diminuait pas (Painter et al., 1981). Nos observations morphologiques concordent avec ce que mentionnent ces auteurs car, pour toutes les doses de cytochalasine testées, nous avons pu distinguer encore nettement le réseau de microfilaments bordant la membrane plasmique canaliculaire et sinusoidale.

Dans les hépatocytes de rats traités à la cytochalasine, nous avons fréquemment observé une autophagie plus importante que chez les témoins NaCl-DMSO. Nous nous expliquons mal cette induction de l'autophagie car de nombreux auteurs ont signalé l'absence de toxicité de la cytochalasine B, d'ailleurs sur cellules en culture (Carter, 1967; Wagner et al., 1971).

Enfin, il nous faut parler également de l'aspect particulier des corps denses observés aussi bien chez les rats cytochalasine + saccharose que chez les rats ayant reçu l'injection de cytochalasine sans injection ultérieure de saccharose. Les inclusions blanchâtres que contiennent ces corps denses semblent être des grains de résidus lipidiques (Ghadially, 1982). Comme

cette accumulation de lipides dans les corps denses apparaît systématiquement chez tous les rats traités à la cytochalasine, nous pouvons en déduire qu'il s'agit d'un phénomène induit par la cytochalasine.

OK

Nous avons vu précédemment que la cytochalasine, suivant le type cellulaire impliqué, stimulait ou inhibait la sécrétion de produits cellulaires (Bauduin et al., 1975; Davies, Allison, 1978) ou d'enzymes lysosomiaux (Davies et al., 1973). Or, le foie est le site majeur de synthèse, d'assemblage et de sécrétion des lipoprotéines plasmatiques, VLDL et HDL (Hamilton, Kayden, 1974; Higgins, Hutson, 1984). Si la cytochalasine inhibe la sécrétion de ces lipoprotéines par les hépatocytes, les vésicules de sécrétion contenant ces lipoprotéines qui s'accumuleraient dans le cytoplasme pourraient fusionner avec les lysosomes (= crinophagie) et donner naissance aux inclusions lipidiques que nous observons à l'intérieur des corps denses. Cette hypothèse semblerait confirmée par le fait que nous observons, chez les rats traités à la cytochalasine, un nombre plus important de vésicules contenant des lipoprotéines sous la membrane plasmique ainsi que, chez les rats ayant reçu de plus l'injection de saccharose, un nombre moins important de lipoprotéines dans l'espace de Disse.

c. Effet de la cytochalasine B sur la capture hépatique du saccharose in vivo

Nous avons observé précédemment une diminution de la capture hépatique du saccharose chez les rats prétraités à la cytochalasine par rapport aux témoins NaCl-DMSO + saccharose (cf I.A.). Nous pouvons l'expliquer aisément si nous supposons, comme nous l'avons fait plus haut, que la cytochalasine inhibe, du moins partiellement, la sécrétion de lipoprotéines par les hépatocytes. Ce ralentissement de l'apport membranaire à la surface cellulaire aurait un effet défavorable sur la capture du saccharose en interférant avec le recyclage des membranes, indispen-

sable au bon fonctionnement des phénomènes endocytotiques (Farquhar, 1982; Steinman et al., 1983; Hohman, Bowers, 1984; Mellman, 1984). Etant donné qu'il existe d'autres voies pour le recyclage des membranes que la sécrétion, et que ces voies ne sont peut-être pas affectées par la cytochalasine, nous pouvons comprendre alors que nous n'ayons obtenu qu'une inhibition partielle de l'endocytose du saccharose par la cytochalasine.

d. Effet de la cytochalasine sur l'endocytose fluide

Bien que nous ayons observé une légère inhibition de l'endocytose du saccharose par la cytochalasine, nos résultats n'indiquent en aucun cas que les microfilaments puissent jouer un rôle direct dans l'endocytose fluide, et concordent de ce fait avec ce que signalent d'autres auteurs à ce sujet (Davies, et al., 1973_a; Davies, Allison, 1978; Thyberg, 1980). Cependant, nous ne pouvons pas comparer une étude in vivo telle que nous l'avons réalisée avec les études sur cellules en culture décrites par ces auteurs. En effet, lors d'expériences effectuées sur des cellules in vitro, il est possible de calculer avec précision la concentration de cytochalasine B présente dans le milieu de culture, et donc en contact direct avec les cellules. Dans le cas des expériences que nous avons menées, par contre, il est impossible de connaître la concentration de cytochalasine B présente dans la biophase des hépatocytes. Nous pouvons tout au plus en estimer la concentration dans le plasma sanguin, mais il est certain que cette valeur surestime la concentration réelle de cytochalasine agissant au niveau des hépatocytes. Afin de pouvoir affirmer si l'absence d'effet direct de la cytochalasine B sur l'endocytose était due réellement à l'indépendance de l'endocytose de type fluide vis-à-vis du système contractile des microfilaments ou si elle n'était due qu'au fait que la concentration de cytochalasine agissant au niveau du foie était trop faible, nous avons décidé de changer de modèle expérimental et de

travailler sur foie perfusé. Dans un tel système en effet la cytochalasine n'aurait pas la possibilité de diffuser vers d'autres organes où elle pourrait agir préférentiellement. Avant de tester l'effet de la cytochalasine sur l'endocytose du saccharose par le foie perfusé, il nous fallait nous assurer d'abord que, dans de telles conditions, le foie montrait une surcharge lysosomiale semblable à celle que nous observions in vivo en présence de saccharose, sans prétraitement à la cytochalasine.

II. ENDOCYTOSE DU SACCHAROSE PAR LE FOIE DE RAT PERFUSE

La perfusion du foie de rat est un système expérimental fréquemment utilisé pour l'étude des hépatocytes. Ce modèle présente de nombreux avantages (Dunn et al., 1983):

- Des réactifs ou des inhibiteurs du métabolisme peuvent être introduits dans la circulation hépatique sans interférence éventuelle avec d'autres organes.
- Ces substances peuvent être retirées rapidement de la circulation par le remplacement du milieu de perfusion.
- La température du milieu de perfusion, et donc du foie, peut être modifiée et ses effets sur différents paramètres étudiés très facilement.
- Il est possible de faire varier rapidement la température d'une valeur à l'autre.
- Enfin, les techniques de fractionnement subcellulaire existant pour le foie intact peuvent être utilisées dans le cas du foie perfusé.

Des études menées sur foie perfusé ont permis de montrer que les hépatocytes conservaient intacts, dans de telles conditions, leurs capacités d'endocytose (Dunn et al., 1980; Wall, Hubbard, 1981; Dunn et al., 1983), de biosynthèse (Labadie et al., 1976; Dunn, Englard, 1981) et de catabolisme (Labadie et al., 1975).

Nous pouvons donc espérer pouvoir reproduire, chez le foie perfusé, une surcharge lysosomiale par le saccharose identique à celle que nous observons in vivo.

1. Résultats biochimiques

Nous avons choisi d'utiliser, pour cette partie du travail, la technique de centrifugation différentielle afin de pouvoir bénéficier de plus d'informations sur la localisation intracellu-

laire éventuelle du saccharose au début de sa capture par le foie. L'homogénéisation est un facteur très important lorsque l'on utilise une telle technique. La surcharge lysosomiale rendant les lysosomes plus fragiles, nous avons cru bon, dès le départ, de nous servir d'un homogénéiseur de Dounce. C'est pour cette raison que nous avons choisi, dans nos premières expériences, de comparer, pour des rats perfusés en présence ou non de saccharose, les 2 types d'homogénéiseurs les plus courants, le Potter et le Dounce.

a. Foie perfusé témoin: choix du Potter ou du Dounce en présence ou non de DMSO (Tableau I, figure 1)

La comparaison des 4 premières distributions de la figure 1 nous révèle l'effet, déjà connu, de la perfusion sur la distribution des hydrolases acides: une diminution nette du pic d'activité spécifique relative dans la fraction L, accompagnée ici d'une réduction du pourcentage d'activité dans M et d'une augmentation dans la fraction S. Notons également le déplacement des distributions vers la droite pour le foie perfusé, avec une augmentation assez nette du pourcentage de protéines dans la fraction nucléaire.

L'addition de DMSO dans le milieu de perfusion ne semble pas avoir d'effet important sur la distribution des 2 hydrolases. Les différences que nous observons entre les distributions obtenues pour les témoins perfusés avec ou sans DMSO et homogénéisés au Potter ne seraient dues, à notre avis, qu'aux conditions dans lesquelles ont été réalisés ces perfusions et fractionnements, techniques que nous ne maîtrisons pas parfaitement dans ces premières expériences.

La comparaison entre les distributions des 2 enzymes obtenues après fractionnement de foies perfusés témoins DMSO à l'aide d'un homogénéiseur de Dounce ou de Potter est plus révélatrice. Nous observons un net déplacement des distributions vers

Tableau I : Répartition des pourcentages de protéines et d'activité de 2 enzymes lysosomiaux dans les fractions obtenues par centrifugation différentielle de foies perfusés et non perfusé

Traitements	Dosages effectués	Pourcentages d'activité enzymatique					
		N	M	L	P	S	Récupération
Témoin non perfusé Potter	Pase acide	4,6	49,8	19,9	15,0	10,7	99,4
	β -gal	9,4	52,8	13,2	3,8	20,8	93,0
	Protéines	15,6	28,1	3,4	19,8	33,0	106,7
Témoin perfusé Potter	Pase acide	14,3	30,5	19,7	16,8	18,7	71,4
	β -gal	16,2	29,7	10,8	5,4	37,9	84,1
	Protéines	23,3	24,1	3,9	16,3	32,5	105,4
Témoin DMSO perfusé Potter	Pase acide	16,5	26,7	14,0	17,1	25,6	96,7
	β -gal	20,3	25,0	7,8	4,7	42,2	88,9
	Protéines	29,2	19,8	3,3	16,3	31,4	92,4
Témoin DMSO perfusé Dounce	Pase acide	17,2	53,4	13,5	7,7	8,2	98,2
	β -gal	27,3	51,9	6,5	1,3	12,9	92,8
	Protéines	24,9	33,7	4,4	8,6	28,4	94,2

(Entre parenthèses, le système d'homogénéisation utilisé)

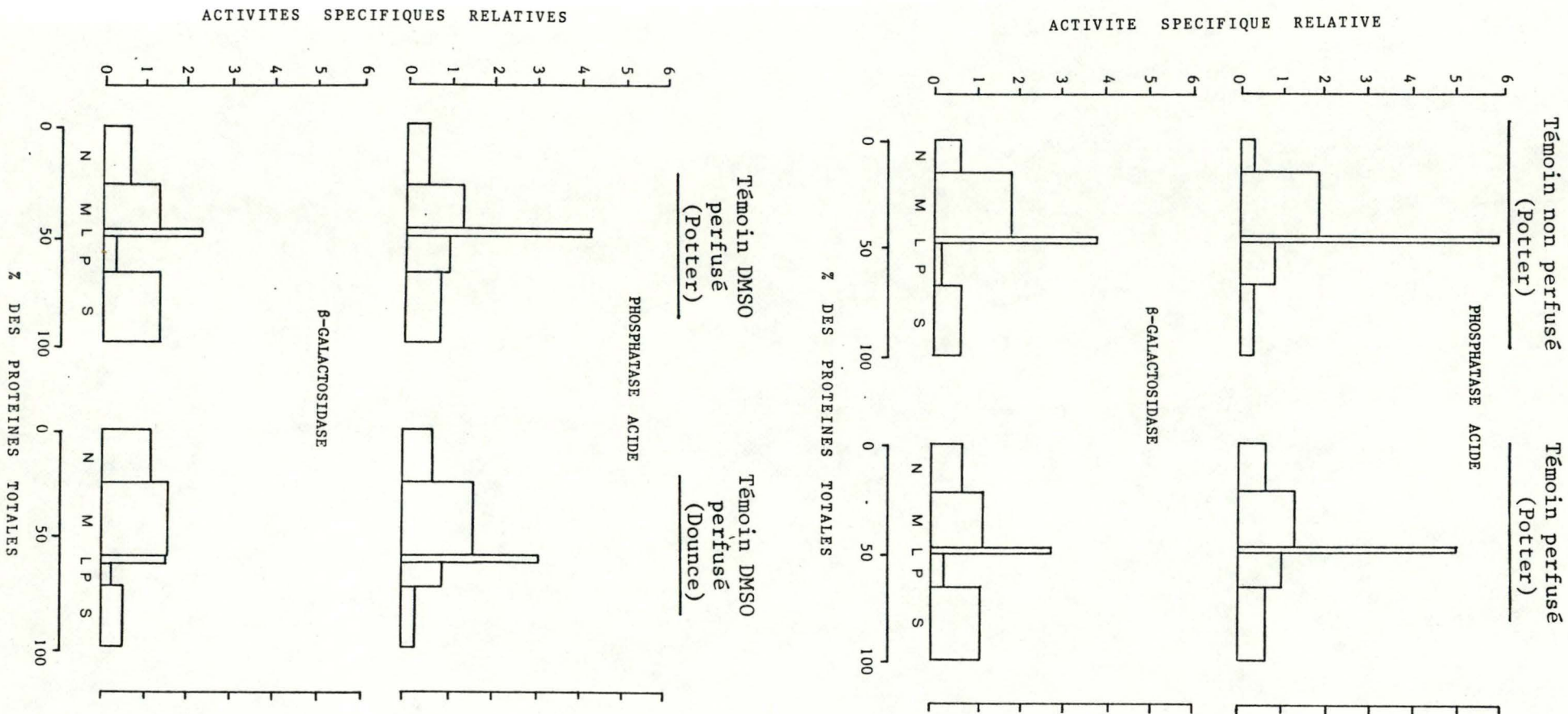


Figure 1 : Distributions de la phosphatase acide et de la β -galactosidase dans les fractions obtenues par centrifugation différentielle.
(Entre parenthèses, le système d'homogénéisation utilisé)

la droite lorsque nous utilisons le Dounce, la somme des pourcentages de protéines des 2 fractions lourdes, N et M, dépassant 50 %. Nous observons également un abaissement important du pic d'activité spécifique relative de la phosphatase acide et de la β -galactosidase dans la fraction L. Enfin, ainsi que nous nous y attendions, le pourcentage d'activité des 2 hydrolases dans la fraction non sédimentable (S) est nettement inférieur lorsque nous utilisons le Dounce comme moyen d'homogénéisation.

b. Foie perfusé en présence de saccharose: homogénéisation par le Potter et par le Dounce (Tableau II, figure 2)

Nous observons à nouveau l'augmentation du pourcentage de protéines dans les fractions N et M conjuguées lorsque nous utilisons le Dounce comme moyen d'homogénéisation, ainsi d'ailleurs qu'une diminution des pourcentages d'activité des deux hydrolases dans la fraction S. Le pic d'activité spécifique relative des hydrolases dans la fraction L est cependant plus élevé pour le foie homogénéisé au Dounce, mais cet effet est dû en partie au pourcentage plus élevé de protéines dans cette fraction pour le foie homogénéisé au Potter (Tableau II).

Pour ce qui est de la distribution du saccharose, nous n'observons aucune différence significative entre les 2 types d'homogénéisation. Dans les 2 cas, en effet, nous obtenons plus de 90 % de saccharose dans la fraction non sédimentable et quelques pourcents seulement dans les autres fractions, principalement N et M. Bien que les concentrations de saccharose dans l'homogénat (E + N) soient fort comparables à celles que nous obtenions in vivo, à savoir 26,8 μ moles/g de foie pour le foie homogénéisé au Potter et 21,9 μ moles/g de foie pour celui homogénéisé au Dounce, les pourcentages de saccharose non sédimentable sont par contre anormalement élevés par rapport à ceux que nous avons obtenu in vivo (cf I.A.). De même, ces distributions ne ressemblent en rien à celles obtenues par Wattiaux (1966) après une surcharge en saccharose de 2 heures in vivo. Ce dernier

Tableau II : Répartition des pourcentages de protéines, de saccharose et des activités de 2 enzymes lysosomiaux dans les fractions obtenues par centrifugation différentielle de foies perfusés

Traitements	Dosages effectués	Pourcentages d'activité enzymatique					
		N	M	L	P	S	Récupération
DMSO 1h/ saccharose 2h (Potter)	Pase acide	10,2	25,2	15,2	18,1	31,3	83,9
	β -gal	11,3	22,5	7,0	4,2	54,9	84,5
	Saccharose	3,2	2,9	0,2	1,9	91,8	98,4
	Protéines	21,0	25,7	4,7	15,2	33,4	99,1
DMSO 1h/ saccharose 2h (Dounce)	Pase acide	19,8	37,8	11,7	12,1	18,3	102,5
	β -gal	26,6	35,3	8,4	3,6	26,1	101,2
	Saccharose	4,0	4,6	0	1,3	90,1	100,5
	Protéines	27,1	26,1	3,1	12,8	30,9	89,8

(Entre parenthèses, le système d'homogénéisation utilisé)

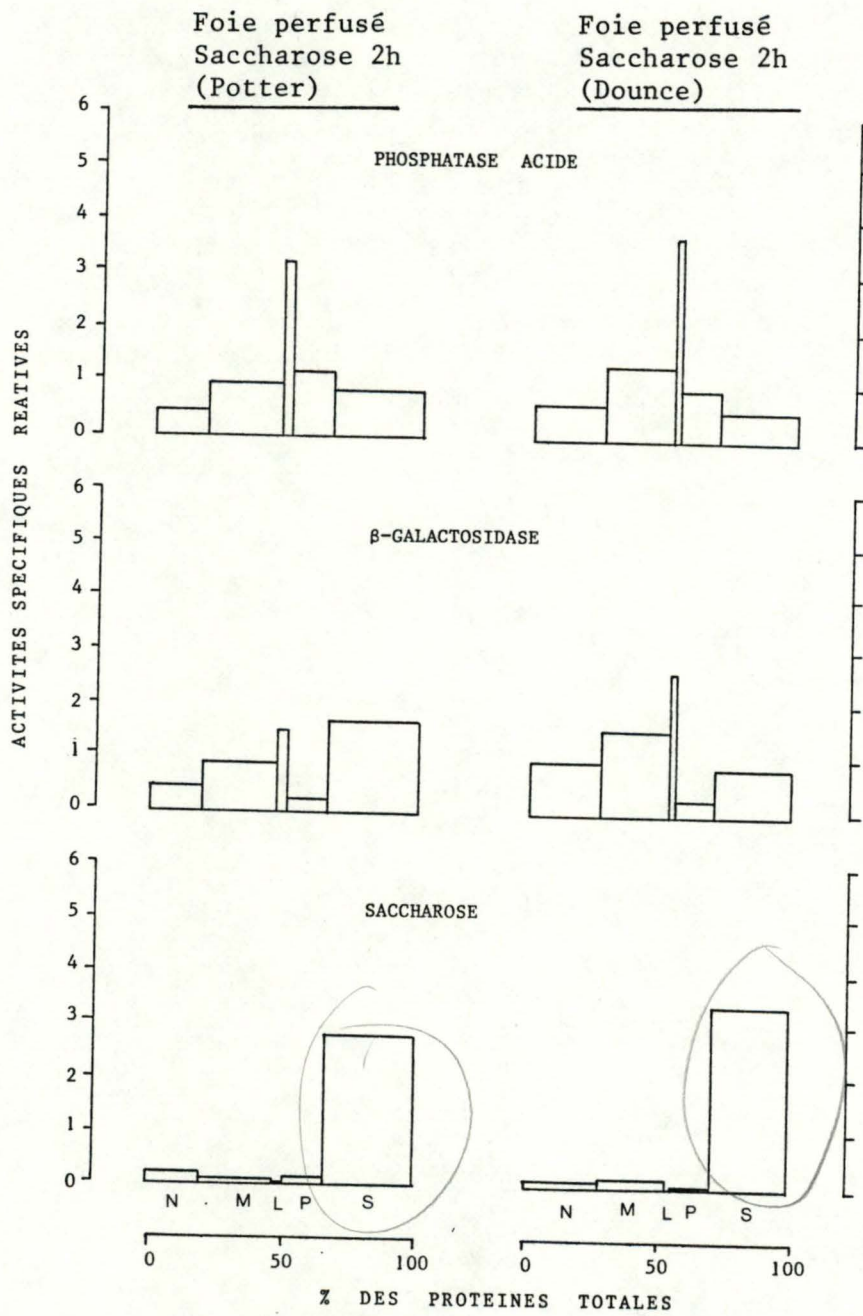


Figure 2 : Distributions de la phosphatase acide, de la β -galactosidase et du saccharose dans les fractions obtenues par centrifugation différentielle de foies perfusés.

(Entre parenthèses, le système d'homogénéisation utilisé)

observait par ailleurs des modifications dans les distributions des hydrolases acides après un traitement au saccharose de 2 heures que nous ne retrouvons pas dans les distributions que nous avons obtenues: augmentation des pourcentages d'activité dans les fractions M et S, diminution de ceux-ci dans la fraction L.

Ceci pourrait laisser supposer que la surcharge lysosomiale en saccharose n'a pas eu lieu, ou du moins que très partiellement, et que le saccharose que nous trouvons en grande quantité dans les fractions non sédimentables ne serait dû qu'à une contamination par le saccharose persistant dans la circulation hépatique à la fin de la perfusion, étant donné que le foie n'a pas été rincé après les 2 heures de perfusion en présence de saccharose pour ces 2 expériences. Afin de déterminer si cette explication est valable, nous avons, lors des expériences décrites par la suite, effectué un rinçage avec du milieu sans saccharose à la fin de la perfusion pour les foies traités au saccharose.

Remarque: lors des fractionnements au Dounce que nous venons de décrire, les 3 homogénéisations ont été faites par, respectivement, 5 passages d'un piston Tight, 3 passages d'un piston Loose, puis 2 passages d'un piston Loose à nouveau.

c. Choix de la technique d'homogénéisation au Dounce

(Tableaux III et IV, figures 3 à 6)

Lors des fractionnements de foies perfusés homogénéisés au Dounce, nous avons, dans un grand nombre de cas (pour plus de 50 % des fractionnements), obtenu un pourcentage anormalement élevé de protéines dans la fraction nucléaire (ces résultats ne sont pas reproduits dans ce travail). Apparemment, notre système d'homogénéisation ne convenait pas, mais nous désirions toutefois continuer à homogénéiser nos foies perfusés à l'aide du Dounce. Nous avons dès lors décidé de tester différentes combinaisons des deux types de piston, sur foies perfusés témoins et sur foies perfusés trai-

tés pendant 2 heures au saccharose, et de comparer les résultats avec ceux obtenus par la technique d'homogénéisation au Dounce décrite précédemment. Les 4 techniques d'homogénéisation que nous avons retenues sont (entre parenthèses, le nombre de passages du piston à chaque homogénéisation):

- Tight (5) - Loose (3) - Tight (2)
- Tight (5) - Loose (3) - Potter (1)
- Tight (5) - Tight (3) - Tight (2)
- Loose (5) - Tight (3) - Tight (2)

Dans une de ces combinaisons, nous utilisons à nouveau le Potter, mais comme nous ne l'utilisons que pour la troisième homogénéisation, son action lésante est atténuée car la plus grande partie des lysosomes sont séparés de la fraction nucléaire lors de la première homogénéisation et la centrifugation qui lui succède.

Les fractionnements que nous réalisons pour ces expériences ont été simplifiés. Après la séparation de la fraction N et de l'extrait cytoplasmique, une partie de ce dernier est centrifugée pendant 35 minutes à 40 000 RPM ($3 \cdot 10^6$ g.min). Nous obtenons, après cette centrifugation, deux fractions, la première correspondant au surnageant habituel, ou fraction S, l'autre à la somme des fractions M, L et P.

- Témoins DMSO (Tableau III, figure 3 et 4)

Les distributions obtenues avec les différents types d'homogénéisation ne semblent guère différer les unes des autres. Si nous tenons compte cependant du pourcentage de protéines dans N, il nous faut rejeter le système d'homogénéisation utilisant, successivement, le piston Tight, le piston Loose, puis le Tight à nouveau. Il ne nous est pas possible, pour l'instant, de choisir parmi les autres techniques d'homogénéisation proposées.

Tableau III : Répartition des pourcentages de protéines et d'activité de 2 enzymes lysosomiaux dans les fractions obtenues par centrifugation différentielle de foies perfusés témoins

DMSO

Système d'homogénéisation	Dosages effectués	Pourcentages d'activité enzymatique			
		N	MLP	S	Récupération
Tight (5) Loose (3) Loose (2)	Pase acide	23,9	55,3	20,8	92,8
	β -gal	28,0	43,4	28,6	89,0
	Protéines	25,1	41,0	33,9	105,6
Tight (5) Loose (3) Tight (2)	Pase acide	32,9	53,0	14,1	91,9
	β -gal	36,9	38,9	24,2	92,1
	Protéines	37,4	27,7	34,9	103,0
Tight (5) Loose (3) Potter (1)	Pase acide	29,5	54,0	16,5	90,4
	β -gal	31,7	42,8	25,5	93,4
	Protéines	32,8	34,0	33,2	103,5
Tight (5) Tight (3) Tight (2)	Pase acide	26,2	53,2	20,6	96,7
	β -gal	30,8	38,7	30,5	91,7
	Protéines	32,4	35,4	32,2	101,0
Loose (5) Tight (3) Tight (2)	Pase acide	25,8	58,9	15,3	90,1
	β -gal	33,4	45,4	21,2	89,2
	Protéines	31,4	36,9	31,7	93,1

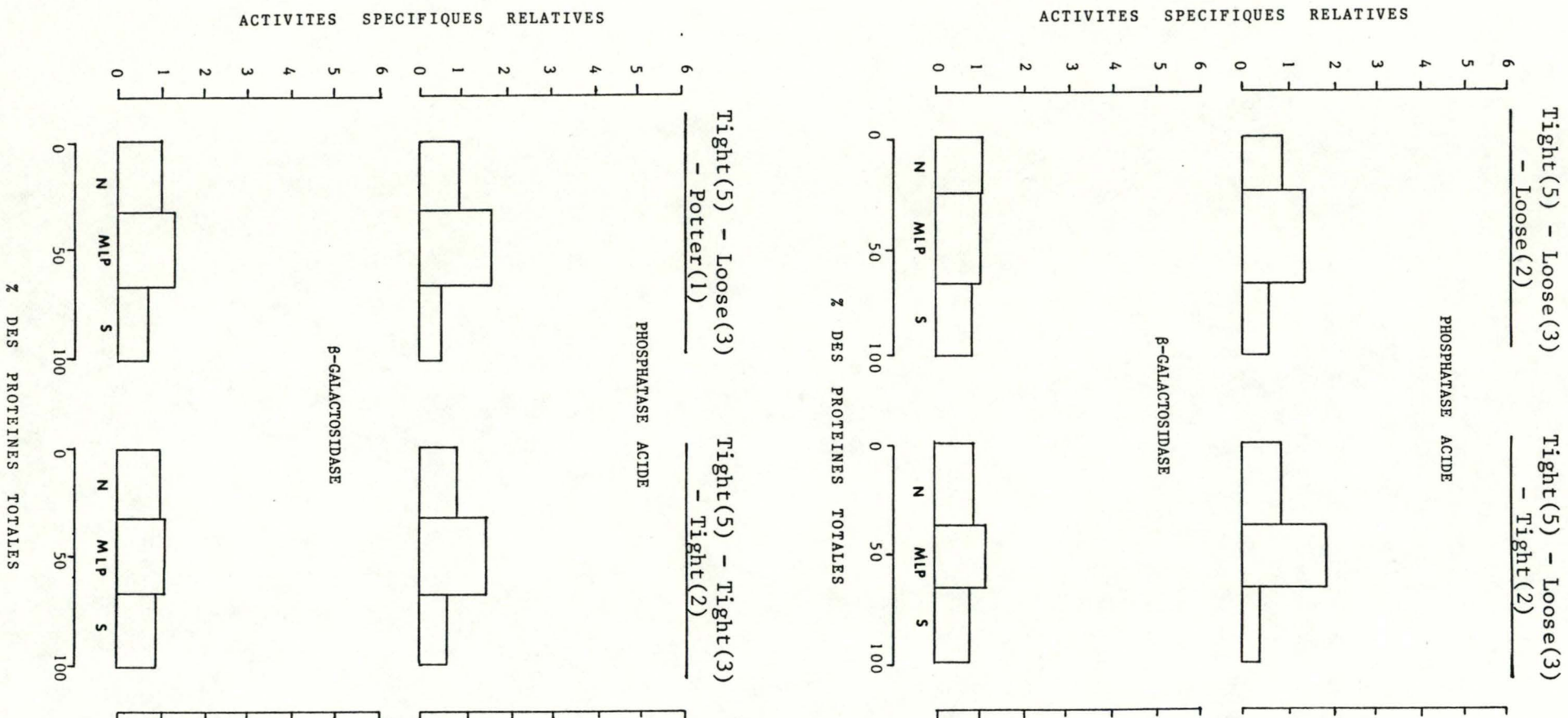


Figure 3 : Distributions de la phosphatase acide et de la β -galactosidase dans les fractions obtenues par centrifugation différentielle de foies perfusés témoins DMSO .

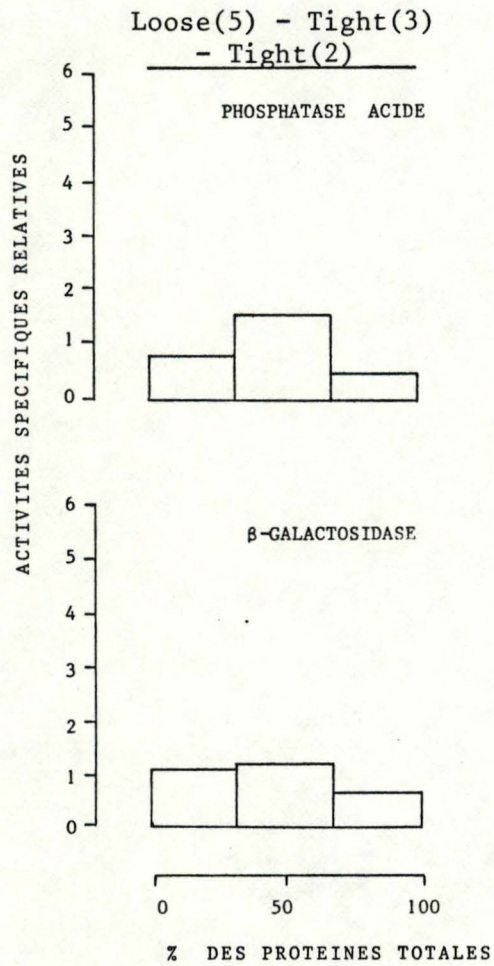


Figure 4 : Distributions de la phosphatase acide et de la β -galactosidase dans les fractions obtenues par centrifugation différentielle de foies perfusés témoins DMSO (suite).

- Foies perfusés en présence de saccharose pendant 2 heures

(Tableau IV, figures 5 et 6)

OK | Pour la phosphatase acide, l'homogénéisation qui nous paraît le mieux convenir est celle pour laquelle nous avons utilisé 3 fois le piston Tight. En effet, le pourcentage de phosphatase acide y est minimal dans la fraction nucléaire ainsi que dans la fraction S. Il est évident que, pour les foies perfusés traités au saccharose, il faille tenir compte de cette dernière fraction puisque nous avons justifié le choix initial du Dounce par le fait qu'il lèserait moins la membrane lysosomiale fragilisée par le traitement au saccharose.

Cependant, si l'on tient compte de la distribution de la β -galactosidase, cette technique d'homogénéisation ne paraît pas idéale puisque nous obtenons un pourcentage d'activité de l'enzyme assez élevé dans la fraction non sédimentable. Il faut toutefois noter que cette distribution a été obtenue en réalisant la moyenne de 2 expériences, pour lesquelles nous avons obtenu, la première fois, 62,3 % et, la deuxième fois, 33,3 % d'activité de la β -galactosidase dans la fraction non sédimentable. Or, lors de la première expérience, une mousse importante et d'abondants débris brunâtres sont apparus dans le perfusat environ 20 minutes avant la fin de la perfusion, et l'examen au microscope électronique a révélé la présence de nombreuses vacuoles d'autophagie dans les hépatocytes de ce foie. La deuxième perfusion s'étant déroulée, elle, sans problèmes, nous avons préféré ne tenir compte que de cette perfusion dans notre raisonnement et, dans ce cas, ce système d'homogénéisation semble à nouveau convenir. Nous avons donc décidé, pour les fractionnements ultérieurs, de n'utiliser que le piston Tight lors de l'homogénéisation.

Tableau IV : Répartition des pourcentages de protéines et d'activité de 2 enzymes lysosomiaux dans les fractions obtenues par centrifugation différentielle de foies perfusés traités au saccharose pendant 2 heures

Système d'homogénéisation	Dosages effectués	Pourcentages d'activité enzymatique			
		N	MLP	S	Récupération
Tight (5) Loose (3) Loose (2)	Pase acide	19,8	61,6	18,3	102,5
	β -gal	26,6	47,3	26,1	101,2
	Protéines	27,1	42,0	30,9	89,8
Tight (5) Loose (3) Tight (2)	Pase acide	35,0	39,0	26,0	100,3
	β -gal	32,9	27,8	39,2	93,9
	Protéines	35,4	30,7	33,9	92,2
Tight (5) Loose (3) Potter (1)	Pase acide	36,9	30,6	32,8	96,6
	β -gal	31,4	28,6	40,0	92,4
	Protéines	29,7	30,8	39,5	97,1
Tight (5) Tight (3) Tight (2)	Pase acide	9,6	67,4	23,0	91,5
	β -gal	9,8	42,9	47,8	85,7
	Protéines	19,9	47,3	32,8	96,5
Loose (5) Tight (3) Tight (2)	Pase acide	19,0	56,7	24,3	86,6
	β -gal	21,6	24,2	54,3	77,4
	Protéines	28,5	39,1	32,6	103,3

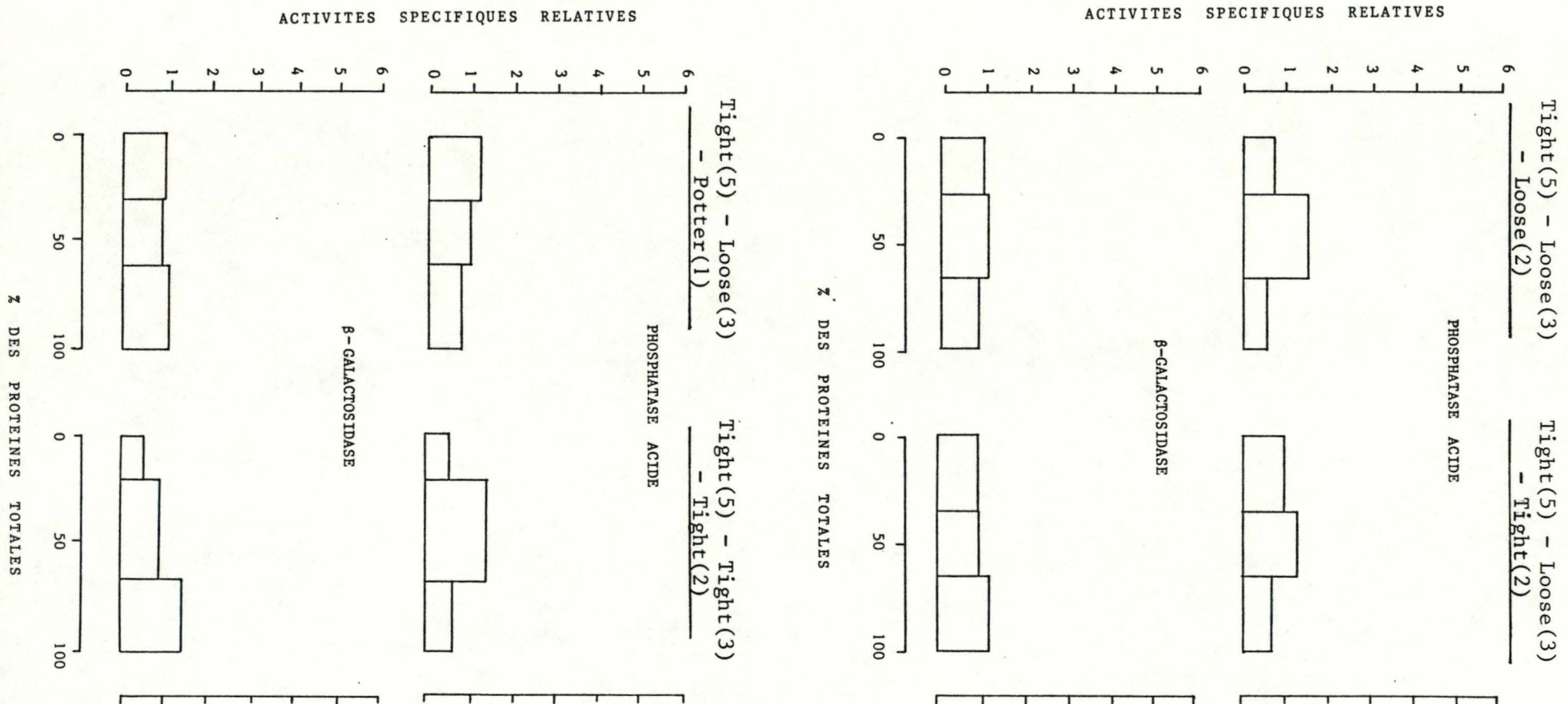


Figure 5 : Distributions de la phosphatase acide et de la β -galactosidase dans les fractions obtenues par centrifugation différentielle de foies perfusés traités au saccharose pendant 2 heures.

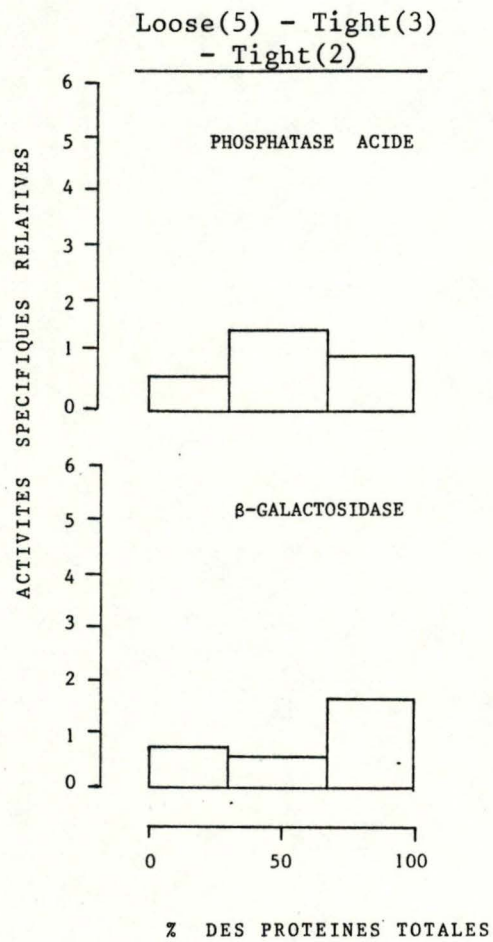


Figure 6 : Distributions de la phosphatase acide et de la β -galactosidase dans les fractions obtenues par centrifugation différentielle de foies perfusés traités au saccharose pendant 2 heures (suite).

d. Effet de la variation de l'osmolarité du milieu de perfusion sur la capture du saccharose par le foie de rat perfusé

(Tableau V, figure 7)

L'osmolarité normale du sérum de rat est comprise entre 280 et 350 mosm/litre. Nous avons mesuré l'osmolarité du milieu de perfusion que nous utilisons, le milieu Leibovitz, avec ou sans saccharose. Si, sans saccharose, celui-ci présente une osmolarité fort comparable à la valeur physiologique normale chez le rat, environ 350 mosm/l, la valeur obtenue avec du milieu additionné de saccharose 0,12 M est beaucoup plus élevée: 470 mosm/l. Nous nous sommes demandé si cette hypertonie du milieu de perfusion n'était pas responsable de l'absence apparente de surcharge en saccharose des lysosomes que nous avons observée précédemment. Afin de tester cette hypothèse, nous avons décidé de comparer les distributions obtenues pour les 2 hydrolases acides et le saccharose après perfusion du foie avec:

- du milieu Leibovitz additionné de saccharose 0,12 M (470 mosm/l).
- du milieu Leibovitz additionné de saccharose 0,08 M (410 mosm/l).
- une solution saline tamponnée additionnée de saccharose 0,12 M (386 mosm/l). Sa composition est reproduite ci-dessous:

Ingrédients	g/litre
NaCl	6,9
KCl	0,36
KH ₂ PO ₄	0,13
MgSO ₄ (anhydre)	0,14
CaCl ₂ (anhydre)	0,24
HEPES	4,74
BSA	20,0
Penicilline	0,06

Tableau V : Répartition des pourcentages de protéines, de saccharose et d'activité de 2 enzymes lysosomiaux dans les fractions obtenues par centrifugation différentielle de foies perfusés

Traitements	Dosages effectués	Pourcentages d'activité enzymatique					
		N	M	L	P	S	Récupération
Milieu Leibovitz + saccharose 0,12 M 2 hrs	Pase acide	4,9	43,2	19,8	16,4	15,7	97,3
	β -gal	8,4	43,6	10,1	4,6	33,3	94,8
	Saccharose	3,1	3,7	0,9	2,7	89,6	80,7
	Protéines	15,5	32,6	4,5	12,8	34,6	93,4
Milieu Leibovitz + saccharose 0,08 M 2 hrs	Pase acide	8,0	44,0	20,9	10,4	16,7	87,9
	β -gal	11,9	42,7	13,3	2,4	31,9	74,1
	Saccharose	0	3,1	0,4	0	96,5	107,2
	Protéines	20,8	28,7	6,2	9,9	34,4	95,4
Solution saline tamponnée + saccharose 0,12 M 2 hrs	Pase acide	11,2	51,0	7,9	9,7	20,1	89,4
	β -gal	19,6	40,8	4,4	2,0	33,2	101,9
	Saccharose	4,0	5,3	1,4	4,9	84,4	93,3
	Protéines	15,3	28,9	5,7	16,0	34,1	91,2

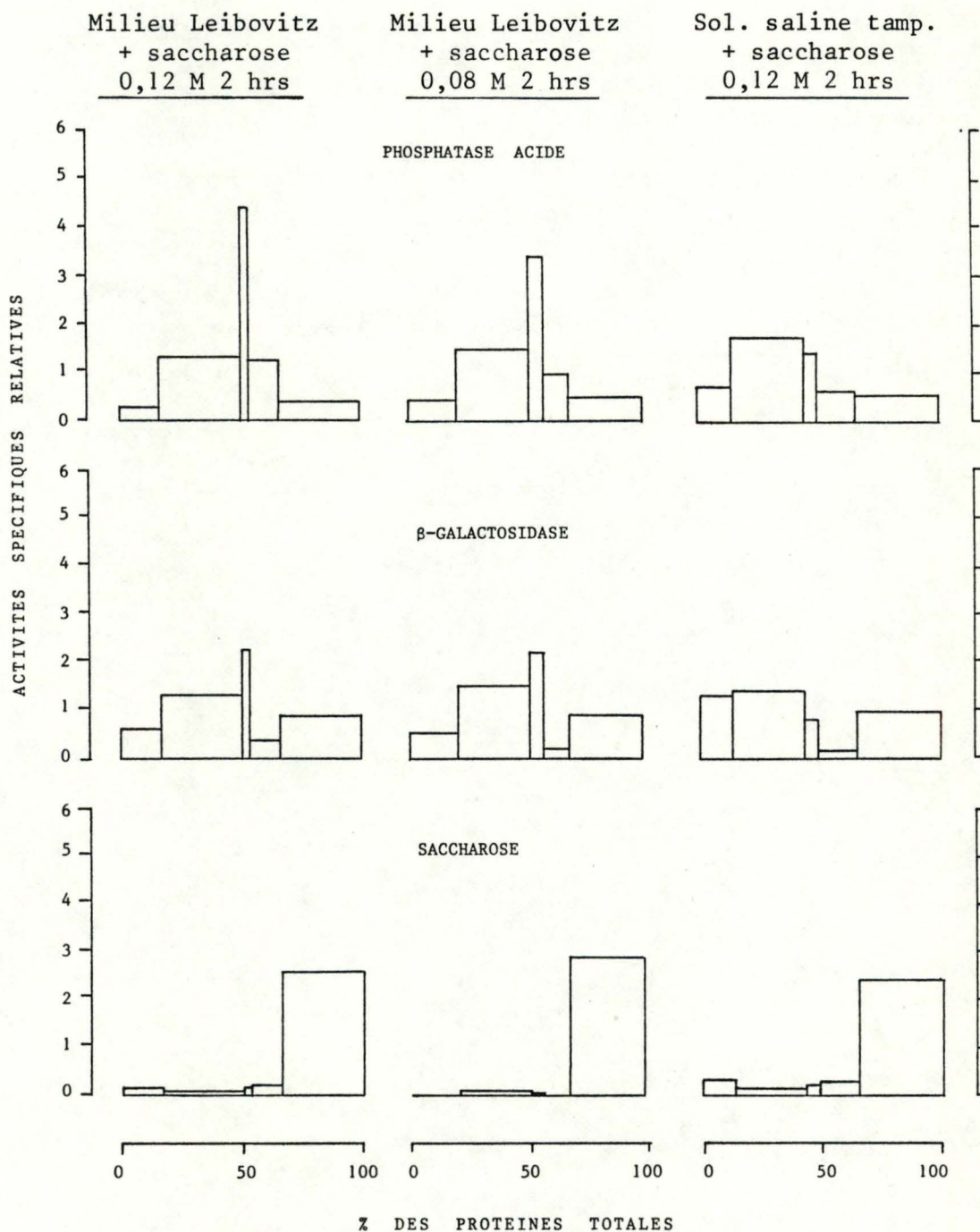


Figure 7 : Distributions de la phosphatase acide, de la β -galactosidase et du saccharose dans les fractions obtenues par centrifugation différentielle de foies perfusés.

L'évolution de la distribution des 2 hydrolases acides lorsque l'on abaisse l'osmolarité du perfusat ressemble fortement à ce que Wattiaux a décrit lors d'une surcharge lysosomiale progressive en saccharose (Wattiaux, 1966): abaissement du pic d'activité spécifique relative dans la fraction L, accompagné d'une augmentation de ces activités dans les fractions M et S. Cependant, les distributions obtenues pour le saccharose ne montrent que très peu de différences lorsque nous diminuons l'osmolarité du perfusat bien que, pour la dernière de ces perfusions, nous obtenions, et ceci pour la première fois, moins de 90 % dans la fraction non sédimentable. Même dans ce cas, le pourcentage de saccharose présent dans la fraction L est minime, à peine 1,4 %, et rien ne nous permet de penser que la surcharge lysosomiale a eu lieu.

Les concentrations de saccharose dans l'homogénat (E + N) sont, pour ces perfusions, peu différentes de celles obtenues sans rinçage du foie (cf l.b.). Nous obtenons, respectivement: 16,9 μ moles, 6,7 μ moles (Saccharose 0,08 M) et 15,6 μ moles de saccharose par gramme de foie.

2. Observations morphologiques

a. Foies perfusés témoins (Planches XXXIII et XXXIV)

L'aspect des cellules varie selon leur localisation dans le foie. Les cellules en bordure de l'espace porte présentent souvent un grand nombre de vacuoles claires, d'assez grandes tailles, situées en périphérie des cellules. De telles vacuoles se retrouvent encore dans les hépatocytes lorsque l'on se dirige vers la veine centrolobulaire, mais en nombre moins important. Elles semblent délimitées par une membrane unitaire.

Le réticulum apparait légèrement dilaté, ainsi d'ailleurs que les citernes périnucléaires et les mitochondries. Il faut cependant noter que ces modifications varient de cellule à cel-

lule et que certains hépatocytes présentent un aspect tout à fait normal.

Les corps denses et les peroxysomes sont généralement abondants et bien conservés. La chromatine nucléaire présente fréquemment une condensation en périphérie des noyaux.

Les canalicules biliaires ne sont pas dilatés et leur lumière n'est parfois plus visible à faible grossissement.

Enfin, les saccules de l'appareil de Golgi semblent dispersés dans la cellule de sorte qu'il est souvent difficile d'observer un dictyosome intact.

b. Foies perfusés traités pendant 2 heures avec du saccharose
0,12 M (Planches XXXV et XXXVI)

L'aspect des cellules de ces foies ne diffère guère de ce que nous avons observé pour des foies perfusés témoins. De même, nous n'observons aucune différence entre foies perfusés avec ou sans DMSO.

Nous observons à nouveau une légère condensation de la chromatine en périphérie des noyaux. Les mitochondries sont peu dilatées. Le réticulum peut être dilaté ou non suivant les cellules observées, et semble moins abondant que dans les hépatocytes in vivo. Par contre le nombre de petites vésicules dans le cytoplasme a augmenté. Celles-ci présentent fréquemment des particules de VLDL dans leur lumière, et il est parfois possible d'observer des ribosomes attachés à la membrane qui les limite (Figures 66 et 68).

Nous observons à nouveau la présence de grandes vacuoles claires dispersées dans le cytoplasme, de taille et d'aspect différent des vacuoles claires de saccharose que nous avons observées in vivo (Figure 65).

Les dictyosomes de l'appareil de Golgi apparaissent petits, clairs et dilatés (Figures 66 et 67). A proximité de ces dictyo-

somes, ainsi qu'à proximité des noyaux, il est possible d'observer de nombreux lysosomes. Ceux-ci présentent une matrice différente des corps denses péribiliariens classiques, et montrent fréquemment des interruptions de leur membrane limitante (Figures 66 et 68). Outre ces lysosomes, l'on peut observer des vésicules de même taille que les lysosomes qui présentent une matrice très claire (Figure 67).

Notons enfin l'autophagie abondante dans les hépatocytes de ces foies perfusés, ainsi que la présence de nombreux microtubules dans le cytoplasme et autour des canalicules biliaires où ils sont accompagnés de microfilaments (Figure 67).

c. Foie perfusé pendant 2 heures avec du saccharose 0,08 M

(Planches XXXVII et XXXVIII)

L'aspect de ce foie perfusé ressemble fortement à ce que nous avons décrit précédemment. Les lysosomes présentent une matrice assez claire dans laquelle nous distinguons des inclusions de type lipidique. L'autophagie est abondante, les mitochondries et les ribosomes apparaissent dilatés. Seuls les corps denses sont positifs lors d'un marquage cytochimique de la phosphatase acide.

d. Foie perfusé par une solution saline tamponnée et traité pendant 2 heures par du saccharose 0,12 M (Planches XXXIX et IL)

Les cellules présentent, au centre de leur cytoplasme, une accumulation de vacuoles dont certaines ressemblent aux vacuoles induites par le saccharose in vivo, mais de taille nettement inférieure. L'autophagie est abondante, le réticulum est dilaté mais non les mitochondries.

Le marquage cytochimique de la phosphatase acide permet de mettre en évidence l'enzyme lysosomal à l'intérieur des petites vacuoles décrites ci-dessus. Les grandes vacuoles que nous observions déjà chez les témoins ne sont, quant à elles, pas marquées.

3. Lactate déshydrogénase et traitement au saccharose

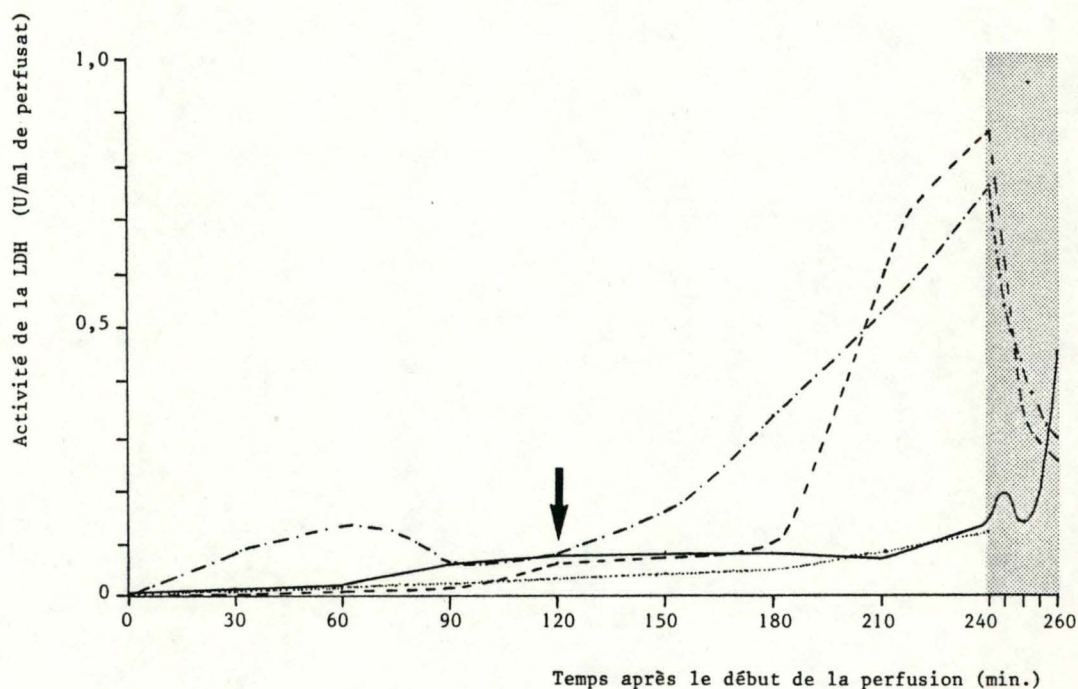
Dans la figure 8, nous avons représenté l'évolution de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) en fonction du temps écoulé depuis le début de la perfusion, et ceci pour des foies témoins et traités au saccharose. L'activité de la lactate déshydrogénase n'augmente que très peu au cours du temps chez les foies témoins, ainsi d'ailleurs que chez les foies traités au saccharose 0,12 M. Chez ces derniers, l'augmentation la plus importante de l'activité de la LDH a lieu 1 heure avant l'addition du saccharose dans le perfusat et, après 2 heures de perfusion, l'activité de l'enzyme se stabilise jusqu'au rinçage final du foie où elle montre à nouveau une augmentation brusque. L'augmentation de l'activité de l'enzyme ne semble donc pas être liée en particulier au traitement au saccharose.

Pour les foies traités avec du saccharose 0,08 M ou perfusés avec une solution saline tamponnée additionnée de saccharose 0,12 M, l'augmentation de l'activité de la LDH est beaucoup plus importante, mais elle a lieu, pour le premier foie, 1 heure seulement après l'addition du sucre et, pour le deuxième, bien avant l'addition du saccharose au perfusat. Notons que, pour ce dernier foie, la diminution de l'activité de l'enzyme observée après 1 heure de perfusion est due au fait que nous avons dû ajouter du milieu frais dans le circuit de perfusion, étant donné une perte importante de perfusat au niveau du récipient central.

OK | Ces résultats semblent indiquer l'absence d'effet toxique du traitement au saccharose sur les hépatocytes de foie perfusé.

4. Discussion

Nous nous sommes demandés si les foies perfusés que nous avons observé au microscope électronique n'avaient pas souffert, partiellement du moins, d'une hypoxie car nous retrouvions dif-



- : Foies perfusés témoins (moyenne pour 4 foies)
- : Foies perfusés en présence de saccharose 0,12 M (moyenne pour 3 foies)
- : Foie perfusé en présence de saccharose 0,08 M
- . - . - : Foie perfusé par une solution saline tamponnée en présence de saccharose 0,12 M

La flèche indique le moment où le saccharose est additionné au perfusat.

La zone en pointillé représente le rinçage final du foie réalisé pendant 20 minutes avec du milieu sans saccharose.

Figure 8 : Evolution de l'activité de lactate déshydrogénase (LDH) dans le perfusat en fonction du temps écoulé depuis le début de la perfusion.

férentes modifications morphologiques caractéristiques de la nécrose cellulaire (Wyllie, 1981):

- réticulum endoplasmique dilaté et fragmenté en de nombreuses vésicules,
- mitochondries parfois dilatées,
- marginalisation et condensation de la chromatine,
- dilatation de la citerne périnucléaire,
- augmentation de l'autophagie.

Cependant, certaines observations semblent indiquer que les hépatocytes des foies que nous avons perfusé n'ont pas subi d'hypoxie:

- Nous avons fréquemment observé des cellules visiblement altérées en contact avec des cellules qui ne présentaient aucune caractéristiques morphologiques de la nécrose. Comment expliquer la présence de ces cellules intactes si notre milieu de perfusion n'était pas suffisamment oxygéné ?

- Au cours de la nécrose cellulaire, la dégranulation du réticulum endoplasmique rugueux a lieu avant la fragmentation de celui-ci en vésicules. Or, nous avons très souvent observé des ribosomes attachés à la membrane de ces vésicules.

- La rupture de l'équilibre actif entre les concentrations intra- et extracellulaire de calcium, responsable de la dilatation des mitochondries dans la nécrose cellulaire, a pour résultat également une dépolymérisation des microtubules. Or, nous avons pu observer à plusieurs reprises des microtubules intacts dans le cytoplasme des hépatocytes examinés.

Comment expliquer alors les modifications observées ? Certaines de ces modifications pourraient s'expliquer par des lésions causées aux cellules par une éventuelle surpression au début de la perfusion. Cette explication n'est cependant valable

que pour les cellules fortement altérées. Pour les autres cellules ayant apparemment moins souffert de la perfusion, diverses explications peuvent être proposées. La dilatation et la vésiculation du réticulum endoplasmique pourraient se comprendre soit par une entrée accrue d'eau dans la cellule, soit par une accumulation de produits de sécrétion (Ghadially, 1982). Il nous semble cependant que cette deuxième explication convienne mieux que la première car il nous paraît difficile de justifier une entrée d'eau dans la cellule alors que nous avons démontré au préalable l'hypertonie du milieu de perfusion utilisé. Les produits de sécrétion qui s'accumuleraient dans le réticulum endoplasmique pourraient être des VLDL, que nous avons fréquemment observées dans les vésicules décrites précédemment. Cette accumulation de VLDL pourrait expliquer partiellement l'autophagie importante observée dans les hépatocytes de foies perfusés, ainsi que la présence d'inclusions lipidiques dans les lysosomes de ces cellules.

La dilatation de la matrice mitochondriale peut, de la même façon que pour le réticulum endoplasmique, donner lieu à diverses explications (Ghadially, 1982):

- changements osmotiques dans l'environnement des organites,
- le jeûne,
- l'obstruction des canalicules biliaires,
- un déséquilibre ionique (principalement du calcium).

Enfin, il est possible d'expliquer l'augmentation de l'autophagie dans le foie de rat perfusé par un renouvellement accéléré des protéines. Mortimore et Ward ont en effet montré que lorsqu'un foie de rat est perfusé avec du milieu bien oxygéné, contenant des érythrocytes et de l'albumine bovine, la protéolyse était généralement plus importante que la biosynthèse protéique (Mortimore, Ward, 1976). Ceci semble se confirmer dans nos expériences puisque la quantité moyenne de protéines que

nous avons obtenue dans les homogénats de foies perfusés est d'environ 160 mg/g de foie, alors que cette valeur dépassait 200 mg/g de foie in vivo.

Il semblerait donc, au vu de ces constatations, que le système d'oxygénation du perfusat que nous avons utilisé était efficace, mais il aurait été intéressant de pouvoir, par exemple, doser l'ATP dans l'homogénat d'un foie perfusé afin de comparer les valeurs obtenues aux valeurs physiologiques normales pour le foie de rat.

Nous devons nous demander à présent si les résultats obtenus semblent indiquer ou non qu'une surcharge lysosomiale en saccharose a eu lieu dans les foies perfusés traités pendant 2 heures au saccharose.

Nous avons suggéré, afin d'expliquer les pourcentages très élevés de saccharose mesurés dans les fractions non sédimentables lors de nos premières perfusions (cf II.1.b.), une contamination éventuelle par du saccharose persistant dans la circulation hépatique à la fin de la perfusion. Cependant, malgré un rinçage du foie avec du milieu sans saccharose lors des perfusions suivantes, nous retrouvons chaque fois un pourcentage de sucre élevé dans la fraction S, et la quantité totale de saccharose dans l'homogénat conserve des valeurs semblables à celles obtenues sans rinçage du foie. Si nous tenons compte de plus de la faible différence observée entre les pourcentages d'hydrolases acides présentes dans la fraction non sédimentable chez les foies témoins et les foies traités au saccharose, nous pouvons penser que le saccharose serait associé, dans les hépatocytes, à une structure non lysosomiale qui serait détruite lors de l'homogénéisation. Cette structure pourrait être les grandes vacuoles claires observées en périphérie des hépatocytes, vacuoles non marquées par la cytochimie de la phosphatase acide. Il se pourrait que ces vacuoles soient ce que l'on appelle des "vacuoles de perfusion". De mêmes vacuoles ont été observées

par d'autres auteurs (Dunn et al., 1983) à la périphérie de cellules de foies perfusés avec un milieu bien oxygéné, ce qui indique que ces vacuoles ne sont pas semblables aux vacuoles observées dans les cellules souffrant d'hypoxie. Il est possible d'imaginer une filtration du perfusat additionné de saccharose à l'intérieur de ces vacuoles de perfusion. Ce saccharose, non éliminé par le rinçage du foie à la fin de la perfusion, serait libéré lors de l'homogénéisation du foie et se retrouverait, à la fin du fractionnement, dans la fraction non sédimentable.

A côté de ces grandes vacuoles claires, nous avons observé, en quantité importante, des lysosomes de taille supérieure et d'aspect plus clair que les corps denses que nous observions in vivo. Nous pourrions par conséquent supposer que ces lysosomes contiennent du saccharose qui aurait été endocyté par les hépatocytes. Cependant, des études sur foie perfusé ont montré que la perfusion provoquait des altérations de la taille et de la densité des lysosomes. Ceux-ci auraient, après perfusion, une taille et une densité supérieures (Neely et al., 1977). De plus, les distributions obtenues pour le saccharose ne semblent en aucun cas indiquer qu'une surcharge a eu lieu. En effet, Wattiaux, après un traitement au saccharose d'une durée de 2 heures in vivo, récupérait entre 30 et 40 % du saccharose sous forme sédimentable (Wattiaux, 1966). Or, dans le meilleur des cas, nous ne récupérons que 15 % du saccharose sous forme sédimentable, et moins de 10 % pour toutes les autres perfusions. De plus, rien ne nous permet d'affirmer que ce saccharose sédimentable n'est pas dû à une contamination, lors des fractionnements, des culots de centrifugation par les surnageants qui contiennent le saccharose non sédimentable. Même si une capture du saccharose a eu lieu lors des perfusions, celle-ci n'a pas atteint la même ampleur que celle atteinte in vivo.

Nous pouvons proposer différentes explications à cette absence, peut-être partielle, de surcharge lysosomiale:

form'absolu
par ?

- Le saccharose serait endocyté et atteindrait les lysosomes, mais serait progressivement exocyté lors du rinçage du foie. Mais alors comment expliquer les résultats obtenus lorsque nous n'avons pas effectué de rinçage ?

- L'autophagie et la protéolyse étant plus importantes que la synthèse protéique dans le cas de cellules de foie perfusé (Gordon, 1973; Mortimore, Ward, 1976), la disponibilité en membrane ne serait pas suffisante que pour assurer un taux d'endocytose normal.

- L'accumulation de produits de sécrétion dans les vésicules du réticulum endoplasmique résultant d'une inhibition éventuelle de la sécrétion de ces produits interfèrerait avec le recyclage normal des membranes.

- Les vacuoles de perfusion étant limitées par une membrane unitaire de structure semblable à la membrane plasmique, l'accumulation de ces vacuoles de grande taille dans les hépatocytes réduirait la disponibilité en membrane nécessaire à l'endocytose.

Il est probable que plusieurs de ces facteurs, conjugués à d'autres facteurs que nous n'avons pas envisagés, se combinent pour produire l'inhibition, peut-être partielle, de l'endocytose du saccharose que nous avons observée.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Au cours de ce travail, nous avons voulu apporter notre contribution à l'étude du rôle que pourraient jouer les microfilaments dans l'endocytose de type fluide.

Quoiqu'il faille les considérer avec précautions, nos résultats biochimiques semblent indiquer une inhibition partielle de la capture hépatique du saccharose due à la cytochalasine B. Ces résultats semblent en contradiction avec ceux obtenus par Davies et Allison qui ont signalé l'absence d'effet de la cytochalasine B sur l'endocytose fluide par des macrophages et des polymorphonucléaires in vitro (Davies, Allison, 1978). Cependant, des études menées sur foie isolé perfusé (Michelakakis, Dampure, 1984) et sur hépatocytes en culture (Wagner et al., 1971) ont montré une inhibition de l'endocytose par la cytochalasine B. Ne pourrait-on pas expliquer cette contradiction apparente en envisageant les fonctions différentes de ces types cellulaires ? Les hépatocytes présentent en effet, par rapport aux macrophages et aux polymorphonucléaires, une différence capitale: ces cellules sont impliquées de façon très importante dans la sécrétion de produits cellulaires: sécrétion de protéines plasmatiques et de lipoprotéines. Si la cytochalasine inhibe cette sécrétion par les hépatocytes, et étant donné le rôle fondamental que joue le recyclage des membranes dans les phénomènes endocytotiques, l'on peut comprendre l'inhibition de l'endocytose fluide par la cytochalasine B pour des hépatocytes et l'absence d'effet de cette substance sur l'endocytose par les macrophages et polymorphonucléaires, qui sont deux types cellulaires impliqués d'une façon moindre dans la sécrétion de produits cellulaires.

Afin de mieux cerner le rôle que jouent les microfilaments dans la sécrétion et l'endocytose, il serait intéres-

sant de réaliser de telles expériences sur des hépatocytes isolés. Avec un tel modèle expérimental, il nous serait possible de connaître avec exactitude la concentration de cytochalasine présente dans la biophase des cellules. De plus, il nous serait ainsi possible d'ajouter au milieu, en plus du marqueur habituel, une certaine quantité de marqueur radioactif pendant un court instant, puis de le retirer et d'étudier la cinétique de relargage de ce marqueur dans le milieu. Cette exocytose du marqueur, constante durant le temps de la surcharge, étant la conséquence du recyclage des membranes (Besterman et al., 1981), il serait possible de déterminer si l'action de la cytochalasine se situe au niveau de l'endocytose ou au contraire de la sécrétion du marqueur, et donc de déterminer avec plus de précision le rôle joué par les microfilaments dans ces mécanismes cellulaires.

B I B L I O G R A P H I E

AGUAS A.P. (1981)

Direct contact between actin-like microfilaments and organelles in pig leydig cells.

J. Ultrastruct. Res., 74, 175-182.

ALLISON A.C. (1973)

The role of microfilaments and microtubules in cell movement, endocytosis and exocytosis.

In: Locomotion of Tissue Cells (Porter R., Fitzsimons D.W., Eds.), Ciba Foundation Symposium 14 (New Series), pp 109-148, Excerpta Medica, Amsterdam.

BAUDUIN H., STOCK C., VINCENT D., GRENIER J.F. (1975)

Microfilamentous system and secretion of enzyme in the exocrine pancreas. Effect of cytochalasin B.

J. Cell Biol., 66, 165-181.

BESTERMAN J.M., AIRHART J.A., WOODWORTH R.C., LOW R.B. (1981)

Exocytosis of pinocytosed fluid in cultured cells: kinetic evidence for rapid turnover and compartmentation.

J. Cell Biol., 91, 716-727.

BESTERMAN J.M., LOW R.B. (1983)

Endocytosis: a review of mechanisms and plasma membrane dynamics.

Biochem. J., 210, 1-13.

BIRCHMEIER W. (1984)

Cytoskeleton structure and function.

TIBS, 9 (4), 192-194.

BREWER D.B., HEATH D. (1964)

Development of sucrose vacuoles from liver-cell lysosomes.

J. Path. Bact., 87, 405-408

CARTER S.B. (1967)

Effects of cytochalasins on mammalian cells.

Nature (Lond.), 213, 261-264.

COHN Z.A., EHRENREICH B.A. (1969)

The uptake, storage and intracellular hydrolysis of carbohydrates by macrophages.

J. Experim. Med., 129, 201-225.

COLUCCIO L.M., TILNEY L.G. (1984)

Phalloidin enhances actin assembly by preventing monomer dissociation.

J. Cell Biol., 99, 529-535.

DAVIES P., ALLISON A.C. (1978)

Effects of cytochalasin B on endocytosis and exocytosis.

In: Cytochalasins, biochemical and cell biological aspects (Tanenbaum S.W., Ed.), Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 46, 143-160.

DAVIES P., ALLISON A.C., HASWELL A.D. (1973_a)

The quantitative estimation of pinocytosis using radioactive colloidal gold.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 52 (2), 627-634.

DAVIES P., ALLISON A.C., HASWELL A.D. (1973_b)

Selective release of lysosomal hydrolases from phagocytic cells by cytochalasin B.

Biochem. J., 134, 33-41.

DE BRABANDER M., AERTS F., VAN DE VEIRE R., BORGERS M. (1975)

Evidence against interconversion of microtubules and filaments.

Nature, 253, 119-120.

DE DUVE C., PRESSMAN B.C., GIANETTO R., WATTIAUX R., APPELMANS F. (1955)

Biochem. J., 60, 604-617.

DUNCAN R., PRATTEN M.K. (1977)

Membrane economics in endocytic system

J. theor. Biol., 66, 727-735.

DUNN W.A., ENGLARD S. (1981)

Carnitine biosynthesis by the perfused rat liver from exogenous protein-bound trimethyllysine.

J. Biol. Chem., 256, 12437-12444.

DUNN W.A., HUBBARD A.L., ARONSON N.N. (1980)

Low temperature selectively inhibits fusion between pinocytotic vesicles and lysosomes during heterophagy of ¹²⁵I-asialofetuin by the perfused rat liver.

J. Biol. Chem., 255 (12), 5971-5978.

DUNN W.A., WALL D.A., HUBBARD A.L. (1983)

Use of isolated, perfused liver in studies of receptor-mediated endocytosis.

In: Methods in Enzymology (Fleischer S., Fleischer B., Eds.), Academic Press, New York, 98, pp 225-241.

FARQUHAR M.G. (1982)

Membrane recycling in secretory cells: pathway to the Golgi complex.

In: Membrane Recycling, Ciba Foundation Symposium 92, pp 157-183, Pitman Books Ltd, London.

FARQUHAR M.G. (1983)

Multiple pathways of exocytosis, endocytosis, and membrane recycling: validation of a Golgi route.

Fed. Proc., 42, 2407-2413.

FARQUHAR M.G., PALADE G.E. (1981)

The Golgi apparatus (complex)-(1954-1981)- from artifact to center stage.

J. Cell Biol., 91 (1), 77s-103s.

FORER A. (1978)

Electron microscopy of actin.

In: Principles and Techniques of Electron Microscopy, Biological Applications (Hayat M.A., Ed.), 9, pp 126-173.

FRENCH S.W., KONDO I., IRIE T., IHRIG T.J., BENSON N., MUNN R. (1982)

Morphological study of intermediate filaments in rat hepatocytes.

Hepatology, 2 (1), 29-38.

GASKIN F., SHELANSKI M.L. (1976)

Microtubules and intermediate filaments.

Essays in Biochemistry, 12, 115-146.

GHADIALLY F.N. (1982)

Ultrastructural pathology of the cell and matrix (second edition), Butterworths, London.

GIANETTO R., DE DUVE C. (1955)

Biochem. J., 59, 433-438.

GODMAN G.C., MIRANDA A.F. (1978)

Cellular contractility and the visible effects of cytochalasin.

In: Cytochalasins, Biochemical and Cell Biological Aspects (Tanenbaum S.W., Ed.), Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 46, pp 277-429.

GOLDMAN R.D., SCHLOSS J.A., STARGER J.M. (1976)

Organizational changes of actin-like microfilaments during animal cell movement.

In: Cell Motility (Goldman R., Pollard T., Rosenbaum J., Eds.), Cold Spring Harbor Conf. Cell Proliferation, 3, pp 217-245.

GORDON A.H. (1973)

The role of lysosomes in protein catabolism.

In: Lysosomes in Biology and Pathology, 3 (Dingle J.T., Ed.), Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 29, pp 89-137.

HAMILTON R.L., KAYDEN H.J. (1974)

The liver and the formation of normal and abnormal plasma lipoproteins.

In: The Liver: Normal and Abnormal Functions, part A (Becker F.F., Ed.), 531-572.

HAMOIR-KEBERS F. (1982)

Etude des structures subcellulaires du foie en régénération, après une hépatotectomie partielle.

Thèse de doctorat, FNDP, Namur.

HARTWIG J.H., STOSSEL T.P. (1976)

Interactions of actin, myosin, and an actin-binding protein of rabbit pulmonary macrophages.

J. Cell Biol., 71, 295-303.

HIGGINS J.A., HUTSON J.L. (1984)

The roles of Golgi and endoplasmic reticulum in the synthesis and assembly of lipoprotein lipids in rat hepatocytes.

J. Lipid Res., 25, 1295-1305.

HOHMAN T.C., BOWERS B. (1984)

Hydrolase secretion is a consequence of membrane recycling.

J. Cell Biol., 98, 246-252.

KACICH R.L., RENSTON R.H., JONES A.L. (1983)

Effects of cytochalasin D and colchicine on the uptake, translocation and biliary secretion of horseradish peroxidase and (¹⁴C)sodium taurocholate in the rat.

Gastroenterology, 85, 385-394.

KATO T., OKADA S., YUTAKA T., YABUUCHI H. (1984)

The effects of sucrose loading on lysosomal hydrolases.

Mol. Cell. Biochem., 60, 83-98.

KLAASSEN C.D., WATKINS J.B. (1984)

Mechanisms of bile formation, hepatic uptake, and biliary excretion.

Pharmacol. Rev., 36 (1), 1-67.

LABADIE J.H., CHAPMAN K.P., ARONSON N.N. (1975)

Glycoprotein catabolism in rat liver.

Lysosomal digestion of ionated asialo-fetuin.

Biochem. J., 152, 271-279.

LABADIE J.H., DUNN W.A., ARONSON N.N. (1976)

Hepatic synthesis of carnitine from protein-bound trimethyllysine.

Biochem. J., 160, 85-95.

LIN S. (1978)

Interaction of cytochalasins with the red blood cell membrane and its association proteins.

In: Cytochalasins, Biochemical and Cell Biological Aspects (Tanenbaum S.W., Ed.), Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 46, pp 499-520.

LIN D.C., TOBIN K.D., LIN S. (1980)

Cytochalasins inhibit nuclei-induced polymerisation by blocking filament elongation.

J. Cell Biol., 84, 455-460.

LLOYD J.B. (1969)

Studies of permeability of rat liver lysosomes to carbohydrates.

Biochem. J., 115, 703-707.

LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., DANDALL R.J. (1951)

Protein measurement with the Folin phenol reagent.

J. Biol. Chem., 193, 265-275.

MELLMAN I. (1984)

Membrane recycling during endocytosis.

In: Lysosomes in Biology and Pathology, 7 (Dingle J.T., Dean R.T., Sly W., Eds.), Elsevier, Amsterdam, pp 201-229.

MICHELAKAKIS H., DAMPURE C.J. (1980)

The uptake and release of lysosomal enzymes by isolated perfused rat liver.

Biochemical Society Transactions, 590th Meeting, Sheffield, 8, 569.

MICHELAKAKIS H., DAMPURE C.J. (1984)

The effect of cytochalasin B on the release of lysosomal enzymes and intralysosomally stored PVP by the isolated perfused rat liver.

Biochem. Pharmacol., 33, 2047-2053.

MORTIMORE G.E., WARD W.F. (1976)

Behaviour of the lysosomal system during organ perfusion. An enquiry into the mechanism of hepatic proteolysis.

In: Lysosomes in Biology and Pathology, 5 (Dingle J.T., Dean R.T., Eds.), Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 45, pp 157-184.

MULLER W.A., STEINMAN R.M., COHN Z.A. (1980)

The membrane proteins of the vacuolar system. II. Bidirectional flow between secondary lysosomes and plasma membrane.

J. Cell Biol., 88, 304-314.

MUNRO T.R. (1968)

Sucrose-induced vacuolation in living chinese hamster fibroblasts.

Exp. Cell Res., 52, 392-400.

NEELY A.N., COX J.R., FORTNEY J.A., SCHWORER C.M.,
MORTIMORE G.E. (1977)

Alterations of lysosomal size and density during rat liver perfusion. Suppression by insulin and amino acids.

J. Biol. Chem., 252, 6948-6954.

ODA M., PHILLIPS M.J. (1977)

Bile canalicular membrane pathology in cytochalasin B - induced cholestasis

Lab. Invest., 37, 350-356.

- ODA M., PRICE V.M., FISHER M., PHILLIPS M.J. (1974)
Ultrastructure of bile canaliculi, with special reference
to the surface coat and the pericanalicular web.
Lab. Invest., 31, 314-323.
- OSE L., OSE T., REINERTSEN R., BERG T. (1980)
Fluid endocytosis in isolated rat parenchymal and non-
parenchymal liver cells.
Exp. Cell Res., 126, 109-119.
- OTTOSEN P.D., COURTOY P.J., FARQUHAR M.G. (1980)
Pathways followed by membrane recovered from the surface
of plasma cells and myeloma cells.
J. Exp. Med., 152, 1-19.
- PHILLIPS M.J., ODA M., YOUSEF M.I., FUNATSU K. (1981)
Effects of cytochalasin B on membrane-associated micro-
filaments in a cell-free system.
J. Cell Biol., 91, 524-527.
- PLAGEMANN P.G., WOHLUETER R.M., GRAFF J.C., MARZ R. (1978)
Inhibition of carrier-mediated and non-mediated permeation
processes by cytochalasin B.
In: Cytochalasins, Biochemical and Cell Biological Aspects
(Tanenbaum S.W., Ed.), Elsevier/North-Holland Biomedical
Press, 46, pp 445-473.
- PLUMMER D.T., WILKINSON J.H. (1963)
Organ specificity and lactate-dehydrogenase activity. 2.
Some properties of human-heart and liver preparations.
Biochem. J., 87, 423-429.

PRATTEN M., DUNCAN R., LLOYD J. (1980)

Adsorptive and passive pinocytic uptake.

In: Coated Vesicles (Ockleford C., Whyte A., Eds.),
Cambridge University Press, pp 179-218.

PRATTEN M.K., WILLIAMS K.E., LLOYD J.B. (1977)

A quantitative study of pinocytosis and intracellular
proteolysis in rat peritoneal macrophages.

Biochem. J., 168, 365-372.

REAVEN E.P., AXLINE S.G. (1973)

Subplasmalemmal microfilaments and microtubules in resting
and phagocytosing cultivated macrophages.

J. Cell Biol., 59, 12-27.

SCHROEDER T.E. (1976)

Actin in dividing cells: evidence for its role in cleavage
but not mitosis.

In: Cell Motility (Goldman R., Pollard T., Rosenbaum J.,
Eds.), Cold Spring Harbor Conf. Cell Proliferation, 3,
pp 265-278.

SCHROEDER T.E. (1978)

Cytochalasin B, cytokinesis, and the contractile ring.

In: Cytochalasins, Biochemical and Cell Biological Aspects
(Tanenbaum S.W., Ed.), Elsevier/North-Holland Biomedical
Press, 46, pp 91-112.

SELLINGER O.Z., BEAUFAY H., JACQUES P., DOYEN A.,

DE DUVE C. (1960)

Tissue fractionation studies. 15. Intracellular distri-
bution and properties of β -N-acetylglucosaminidase and
 β -galactosidase in rat liver.

Biochem. J., 74, 450-456.

SILVERSTEIN S.C., STEINMAN R.M., COHN Z.A. (1977)

Endocytosis.

Ann. Rev. Biochem., 46, 669-722.

SMALL J.V. (1981)

Organisation of actin in the leading edge of cultured cells: influence of osmium tetroxyde and dehydration on the ultrastructure of actin meshworks.

J. Cell Biol., 91 (2), 695-705.

SPOONER B.S. (1978)

Cytochalasins as probes in selected morphogenetic processes.

In: Cytochalasins, Biochemical and Cell Biological Aspects (Tanenbaum S.W., Ed.), Elsevier/ North-Holland Biomedical Press, 46, pp 65-89.

STEINMAN R.M., BRODIE S.E., COHN Z.A. (1976)

Membrane flow during pinocytosis. A stereologic analysis.

J. Cell Biol., 68, 665-687.

STEINMAN R.M., MELLMAN I.S., MULLER W.A., COHN Z.A. (1983)

Endocytosis and the recycling of plasma membrane.

J. Cell Biol., 96, 1-27.

STENDAHL O.I., HARTWIG J.H., BROTSCHI E.A., STOSSEL T.P. (1980)

Distribution of actin-binding protein and myosin in macrophages during spreading and phagocytosis.

J. Cell Biol., 84, 215-224.

STOSSEL T.P. (1981)

Actin filaments and secretion: the macrophage model.

Meth. in Cell Biol., 23, 215-230.

STOSSEL T.P., HARTWIG J.H. (1976)

Interactions of actin, myosin and a new actin-binding protein of rabbit pulmonary macrophages.

J. Cell Biol., 68, 602-619.

TAMM C. (1978)

Chemistry and biosynthesis of cytochalasins.

In: Cytochalasins, Biochemical and Cell Biological Aspects (Tanenbaum S.W., Ed.), Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 46, pp 15-51.

TANENBAUM J. (1978)

Approaches to the molecular biology of cytochalasin action.

In: Cytochalasins, Biochemical and Cell Biological Aspects (Tanenbaum S.W., Ed.), Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 46, pp 521-559.

THIRION J., THIBAUT-VERCRUYSSSEN R., RONVEAUX-DUPAL M-F.,
WATTIAUX R. (1983)

Experimental sucrose overloading of rat liver lysosomes: effect of pre-treatment with invertase.

Eur. J. Cell Biol., 31, 107-113.

THYBERG J. (1980)

Internalization of cationized ferritin into the Golgi complex of cultured mouse peritoneal macrophages. Effect of colchicine and cytochalasin B.

Eur. J. Cell Biol., 23, 95-103.

TILNEY L.G. (1976)

Non filamentous aggregates of actin and their association with membranes.

In: Cell Motility (Goldman R., Pollard T., Rosenbaum J., Eds.), Cold Spring Harbor Conf. Cell Proliferation, 3, pp 513-528.

VERCRUYSSSEN R. (1983)

Etude morphologique de la surcharge en saccharose induite
in vivo dans le foie de rat.

Thèse de doctorat, FNDP, Namur.

VIRTANEN I., LETHO V-P., LEHTONEN E. (1980)

Organization of intermediate filaments in cultured fibro-
blasts upon disruption of microtubules by cold treatment.

Eur. J. Cell Biol., 23, 80-84.

VON FIGURA K., KRESSE H. (1974)

Inhibition of pinocytosis by cytochalasin B.

Eur. J. Biochem., 48, 357-363.

WAGNER R., ROSENBERG M., ESTENSEN R. (1971)

Endocytosis in Chang liver cells. Quantitation by sucrose-³H
uptake and inhibition by cytochalasin B.

J. Cell Biol., 50, 804-817.

WALL D.A. , HUBBARD A.L. (1981)

Galactose-specific recognition system of mammalian liver:
receptor distribution on the hepatocyte cell surface.

J. Cell Biol., 90, 687-696.

WARBURTON M.J., WYNN C.H. (1976)

The effect of intralysosomal sucrose storage on the turnover
of hamster fibroblast lysosomal and Golgi-apparatus enzymes.

Biochem. J., 158, 401-407.

WATTIAUX R. (1966)

Etude expérimentale de la surcharge des lysosomes.

Thèse d'agrégation de l'enseignement supérieur, Université
Catholique de Louvain.

WEIHING R.R. (1976)

Membrane association and polymérisation of actin.

In: Cell Motility (Goldman R., Pollard T., Rosenbaum J., Eds.), Cold Spring Harbor Conf. Cell Proliferation, 3, pp 671-684.

WEIHING R.R. (1978)

In vitro interactions of cytochalasins with contractile proteins.

In: Cytochalasins, Biochemical and Cell Biological Aspects (Tanenbaum S.W., Ed.), Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 46, pp 431-444.

WYLLIE A.H. (1981)

Cell death: a new classification separating apoptosis from necrosis.

In: Cell Death in Biology and Pathology (Bowen I.D., Lockshin R.A., Eds.), Chapman and Hall, London, pp 9-34.

Unité de Cytologie

(1984 - 1985)

ENDOCYTOSE DU SACCHAROSE PAR LE FOIE DE RAT
IN VIVO : ETUDE DE L'EFFET D'UN PRETRAITEMENT
A LA CYTOCHALASINE B

Tome II : ILLUSTRATIONS

MARC PYPAERT

Liste des abréviations utilisées

- CB : canalicule biliaire.
CD : corps dense.
CE : cellule endothéliale.
CS : capillaire sinusoidale.
ED : espace de Disse.
G : dictyosome de l'appareil de Golgi.
Li : gouttelette lipidique.
Ly : lysosome.
N : noyau.
P : peroxyosome.
VA : vacuole d'autophagie.

PLANCHE I

Foie de rats témoins NaCl-DMSO

Figure 1 : Vue de quelques hépatocytes, d'un capillaire sinusoīde et d'une cellule endothé̄liale.

(Gross. 8940 X) (La barre = 1 μ m)

Figure 2 : Détail d'un hépatocyte. Des corps denses et des dictyosomes de l'appareil de Golgi sont situés près d'un canalicule biliaire non dilaté.

(Gross. 14600 X) (La barre = 1 μ m)

Figure 3 : Détail d'un canalicule biliaire.

On distingue une zone étroite dépourvue d'organelles entourant la membrane canaliculaire (pointillés).

(Gross. 33000 X) (La barre = 0,5 μ m)

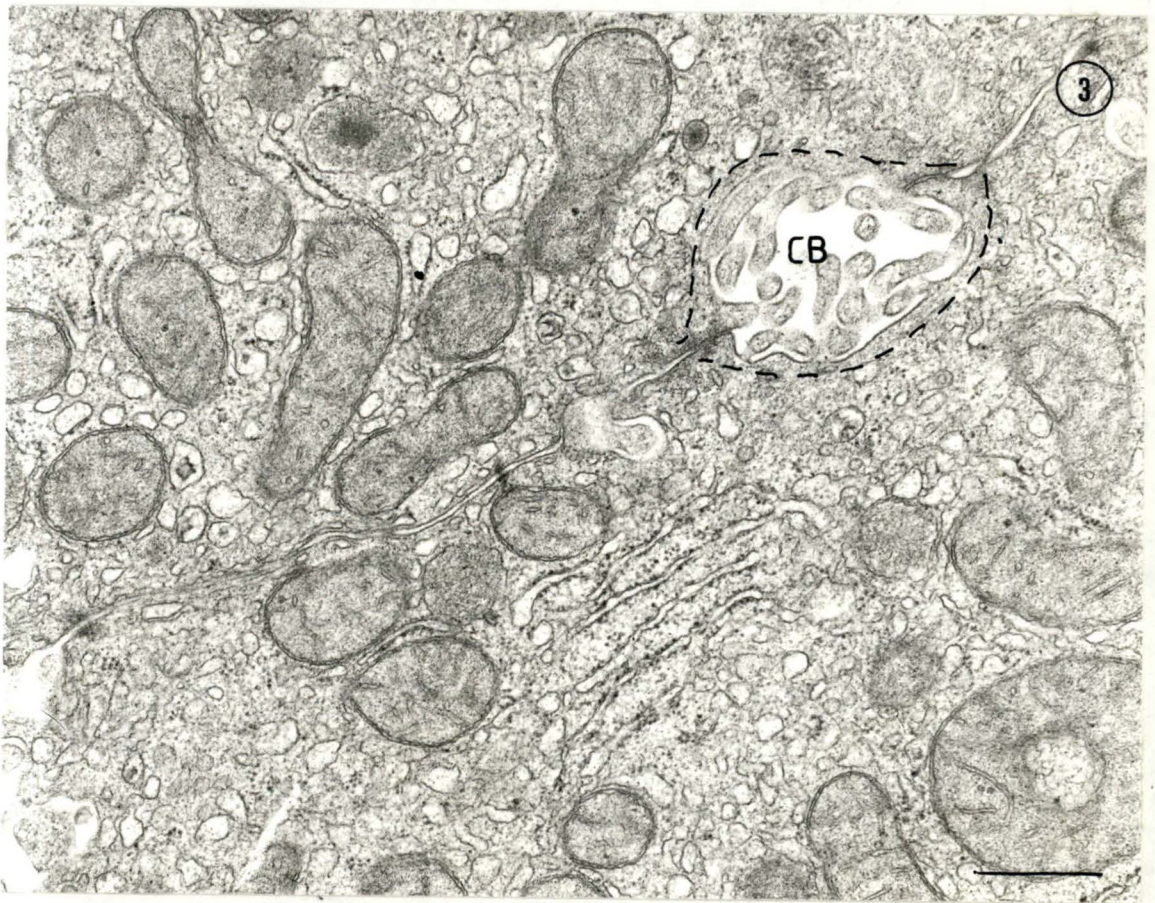
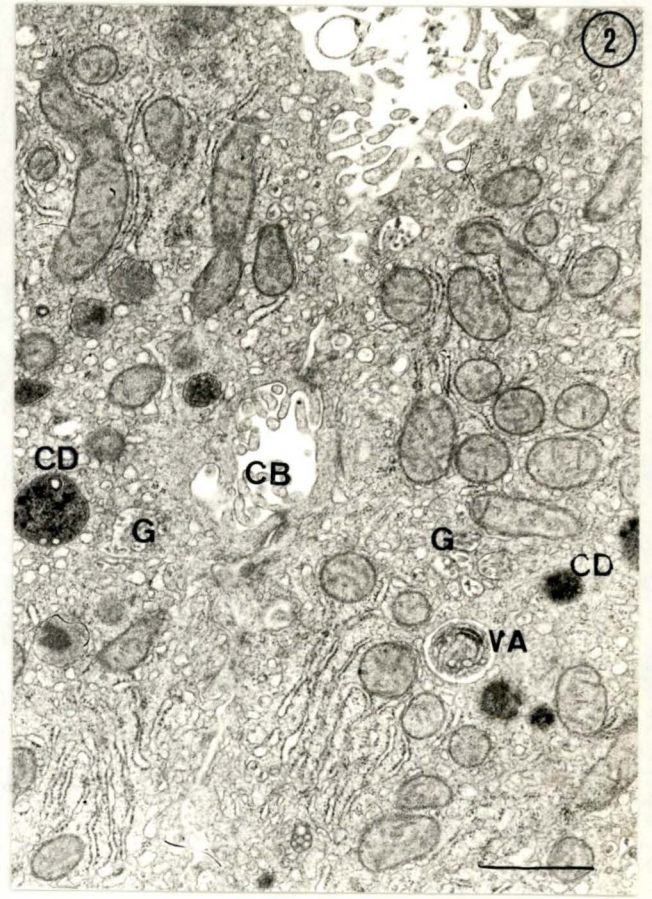


PLANCHE II

Foie de rats témoins NaCl-DMSO

Figure 4 : Nous observons, autour d'un canalicule biliaire, un dictyosome de l'appareil de Golgi, une vacuole d'autophagie, un corps dense et une vésicule contenant des lipoprotéines (tête de flèche).

(Gross. 26280 X) (La barre = 0,5 μ m)

Figure 5 : Vue d'un dictyosome de l'appareil de Golgi dont les citernes contiennent assez bien de VLDL, et à proximité duquel nous observons un corps dense.

(Gross. 33000 X) (La barre = 0,5 μ m)

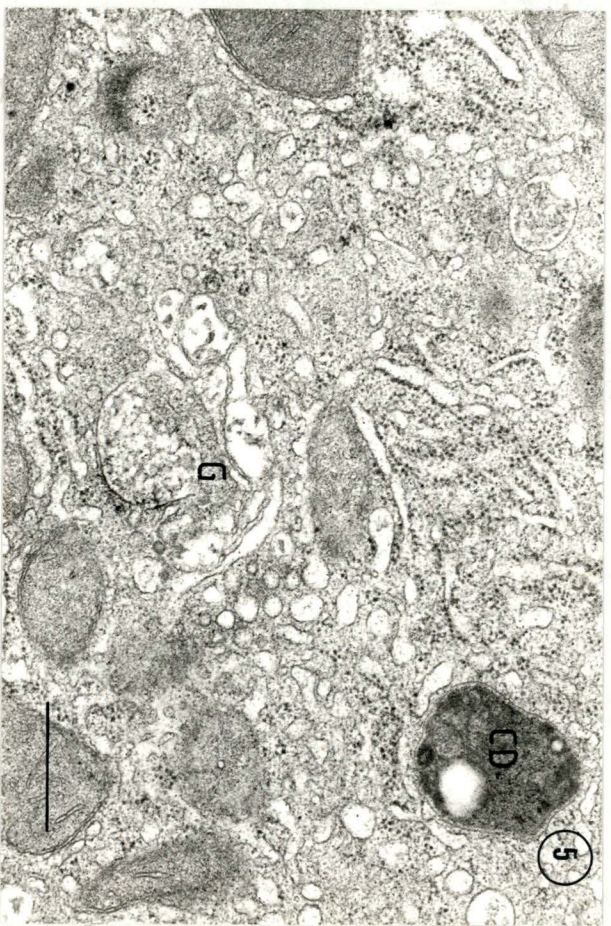
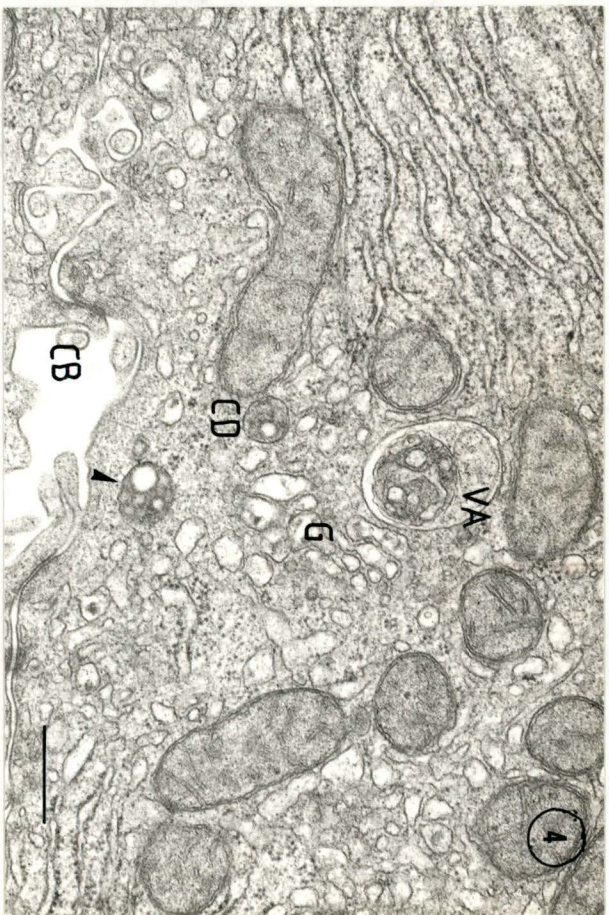


PLANCHE III

Foie de rats cytochalasine (0,038 mg/100g)

Figure 6 : Vue de plusieurs corps denses et d'un dictyosome de l'appareil de Golgi à proximité d'un canalicule biliaire légèrement dilaté. Un des corps denses semble avoir ingéré des lipoprotéines (flèche).

(Gross. 25200 X) (La barre = 1 μ m)

Figure 7 : Les corps denses que nous observons sur cette vue présentent un aspect différent de celui des corps denses de foie témoin. Leur matrice, hétérogène, contient de nombreuses inclusions blanches (triangles vides). Nous distinguons également, à proximité de ces corps denses, deux lysosomes ayant ingéré des lipoprotéines (flèches).

(Gross. 19800 X) (La barre = 1 μ m)

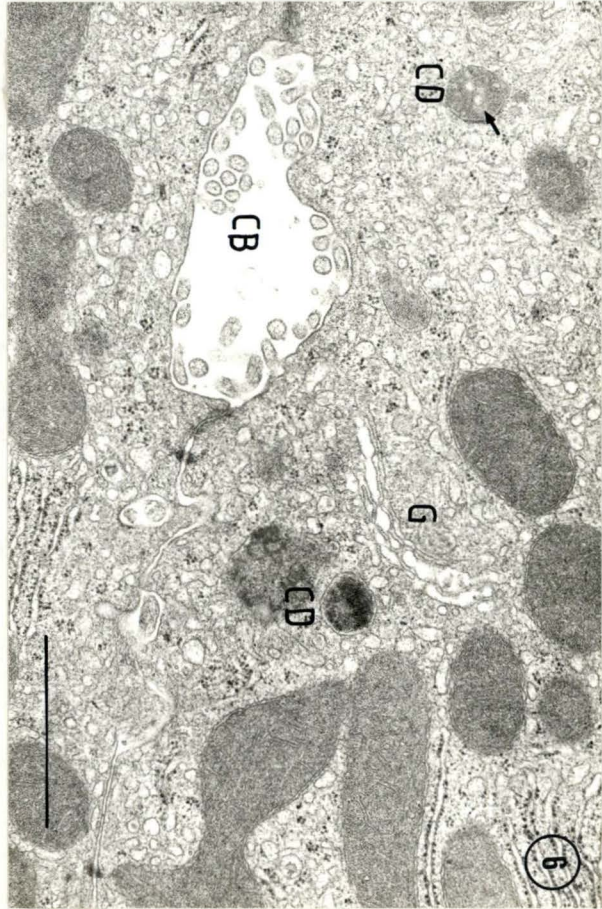


PLANCHE IV

Foie de rats cytochalasine (0,077 mg/100g)

Figure 8 : A ce fort grossissement, nous observons les citer-
nes dilatées d'un dictyosome de l'appareil de Golgi
et les inclusions claires de deux corps denses (tri-
angles vides).

(Gross. 57000 X) (La barre = 0,5 μ m)

Figure 9 : A proximité d'un canalicule biliaire, nous observons
un dictyosome de l'appareil de Golgi et de nombreux
corps denses présentant des inclusions claires (tri-
angles vides). Nous pouvons encore observer des mi-
crofilaments autour du canalicule biliaire (flèches)
ainsi que de nombreux microtubules (têtes de flèches).

(Gross. 43200 X) (La barre = 0,5 μ m)

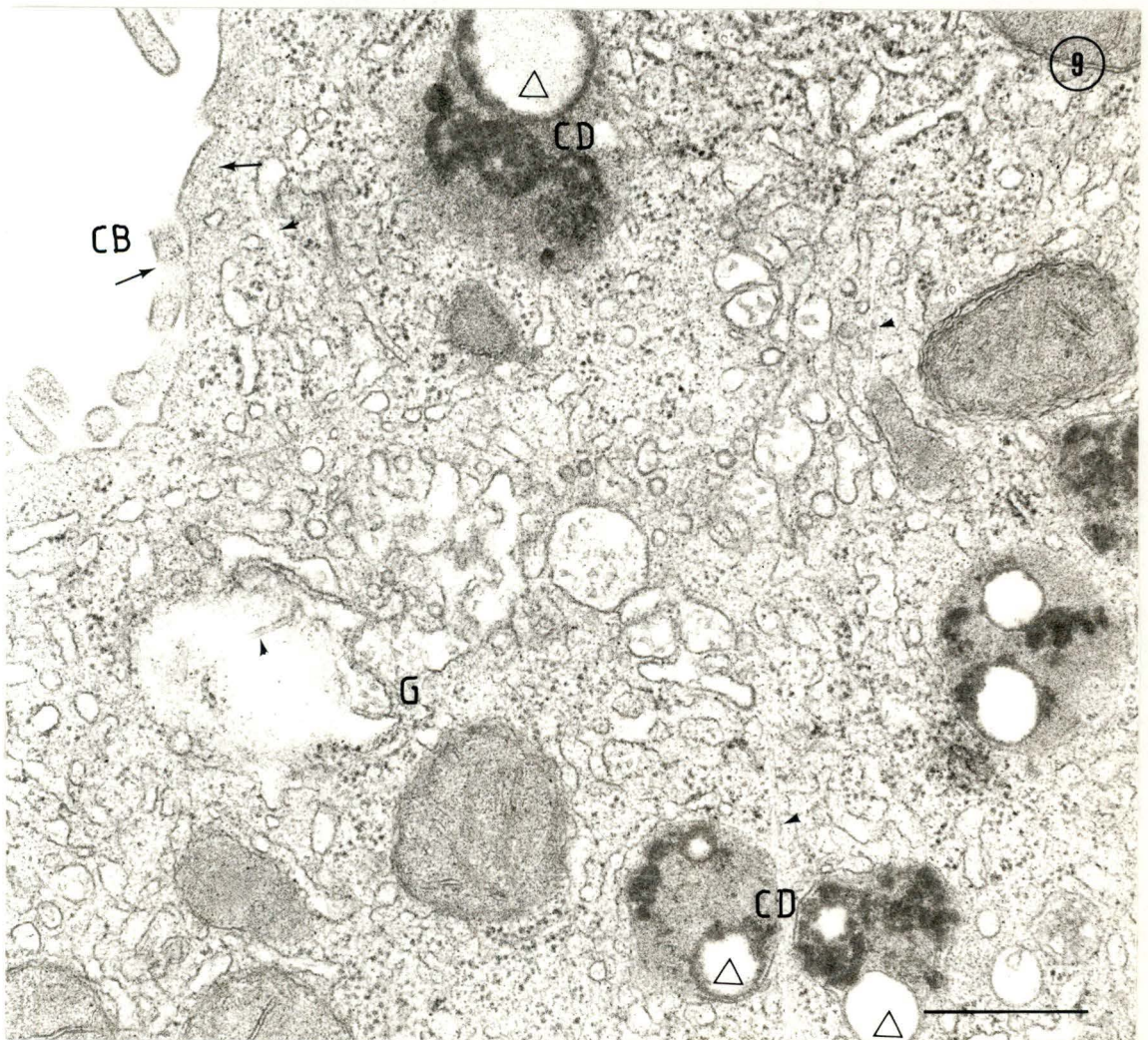
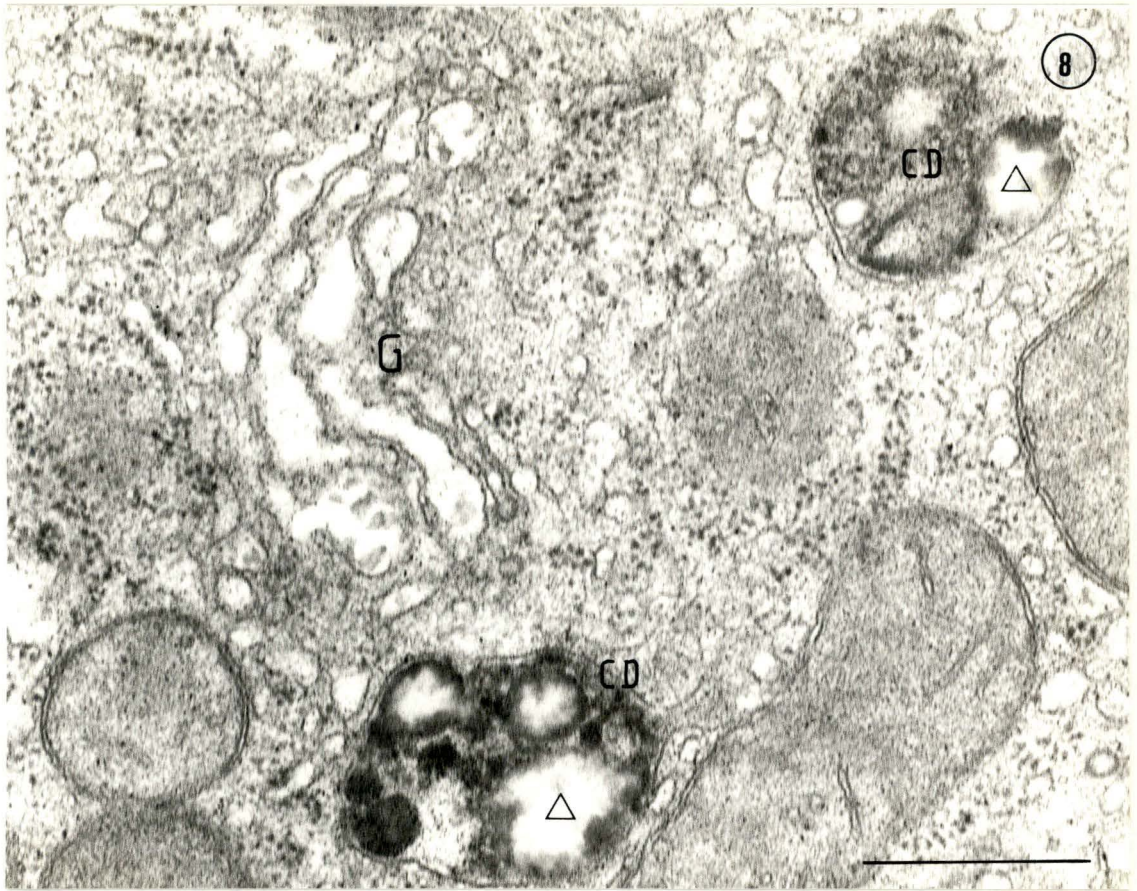


PLANCHE V

Foie de rats cytochalasine (0,15 mg/100g)

Figure 10 : A proximité d'un canalicule biliaire dilaté dont la membrane semble s'être détachée du cytoplasme (flèche), nous pouvons observer un dictyosome dont les citernes, dilatées, paraissent assez dispersées, un corps dense montrant une matrice très hétérogène, et un lysosome ayant ingéré des VLDL (triangle plein).
(Gross. 33000 X) (La barre = 0,5 μ m)

Figure 11 : Près de ce canalicule biliaire, nous observons les saccules dilatés d'un dictyosome ainsi que deux corps denses contenant des inclusions claires. Des microfilaments peuvent être observés sous la membrane canaliculaire et dans les microvillosités de la lumière du canalicule (flèches).
(Gross. 33000 X) (La barre = 0,5 μ m)

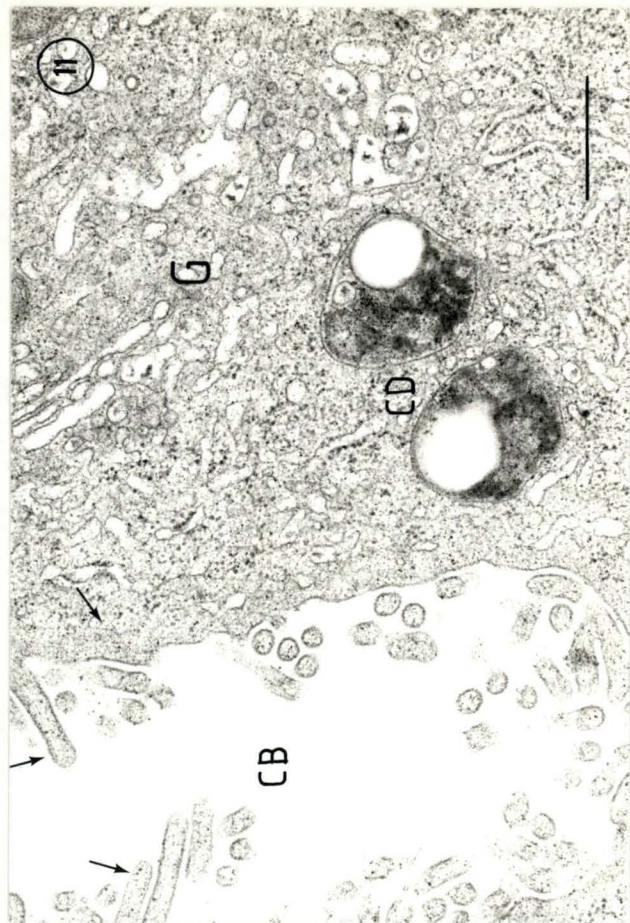


PLANCHE VI

Foie de rats cytochalasine (0,15 mg/100g)

Figure 12 : Vue d'un dictyosome à proximité duquel 3 corps denses présentent les mêmes inclusions que celles décrites précédemment.

(Gross. 33000 X) (La barre = 0,5 μ m)

Figure 13 : Nous observons, à proximité de ce canalicule biliaire dilaté, des corps denses, un dictyosome de l'appareil de Golgi, ainsi que de nombreux microfilaments (flèches) sous la membrane canaliculaire et dans les microvillosités de la lumière du canalicule.

(Gross. 33000 X) (La barre = 0,5 μ m)

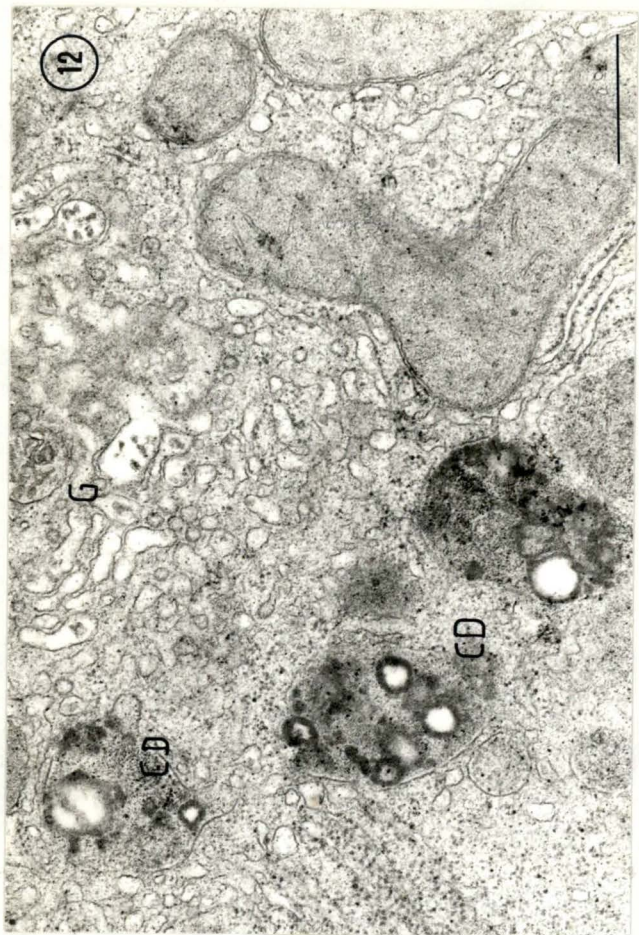


PLANCHE VII

Foie de rats cytochalasine (0,15 mg/100g)

Figure 14 : Cette vue de l'espace de Disse montre, en certains endroits, une réduction du nombre de microvillosités de la membrane plasmique. Sous celle-ci, nous observons la présence de nombreuses petites vésicules contenant une ou plusieurs particules de VLDL (flèches). La tête de flèche indique une structure qui pourrait être un lysosome, et qui semblerait contenir des VLDL.

(Gross. 33000 X) (La barre = 0,5 μ m)

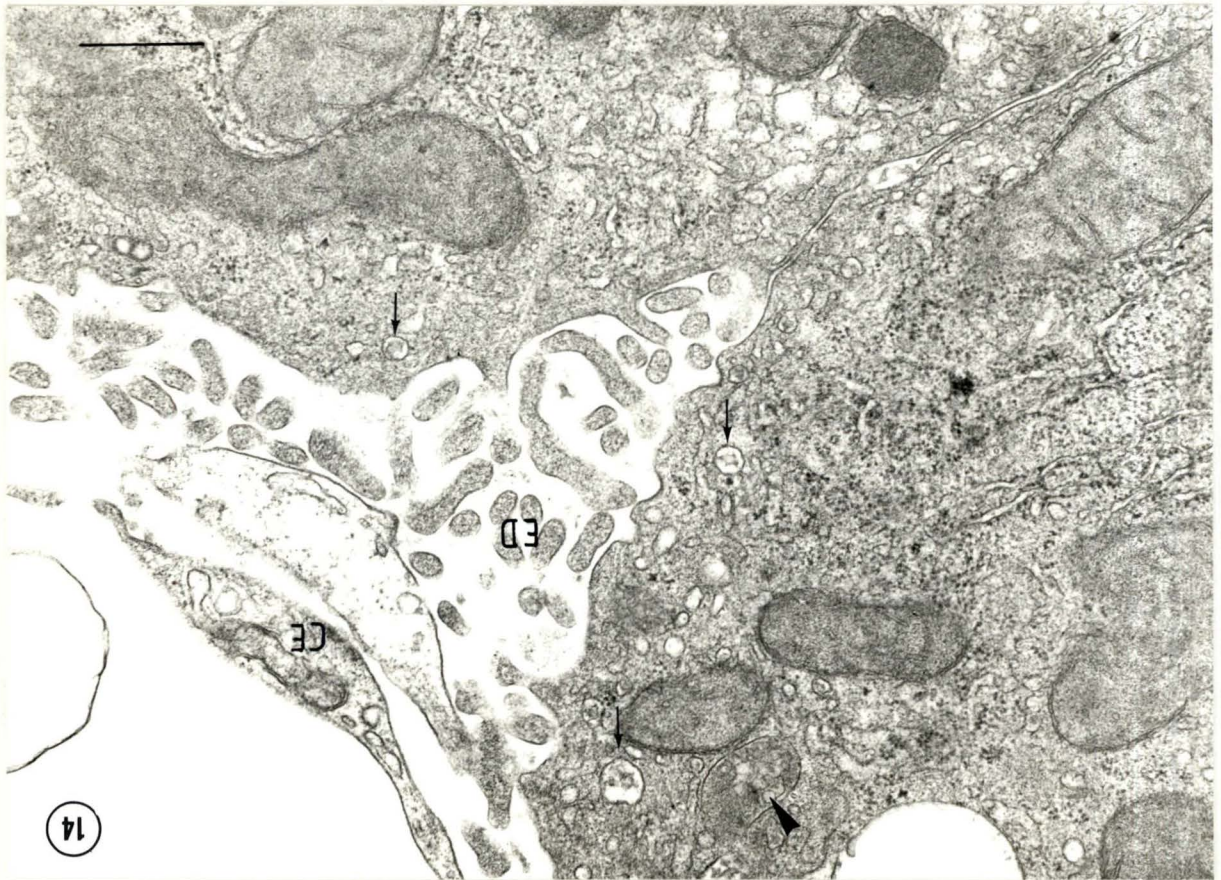


PLANCHE VIII

Foie de rats cytochalasine (0,3 mg/100g)

Figure 15 : Ce canalicule biliaire montre une dilatation très importante, avec disparition de toutes les microvillosités de la lumière.

(Gross. 19800 X) (La barre = 1 μ m)

Figure 16 : Cette vue à fort grossissement montre deux corps denses contenant, dans leur matrice, des inclusions d'aspect clair mais dont la périphérie apparaît plus dense aux électrons que la matrice lysosomiale environnante.

(Gross. 43200 X) (La barre = 0,5 μ m)

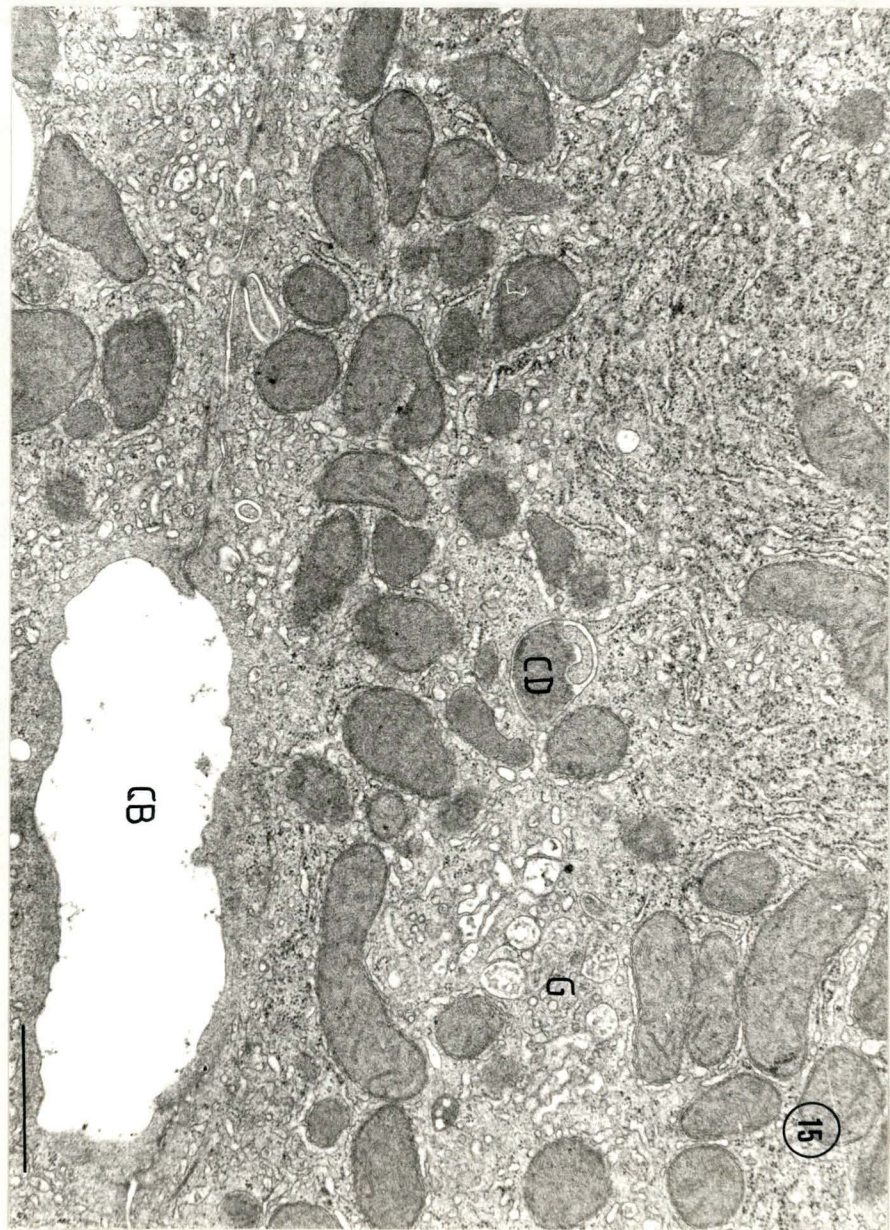
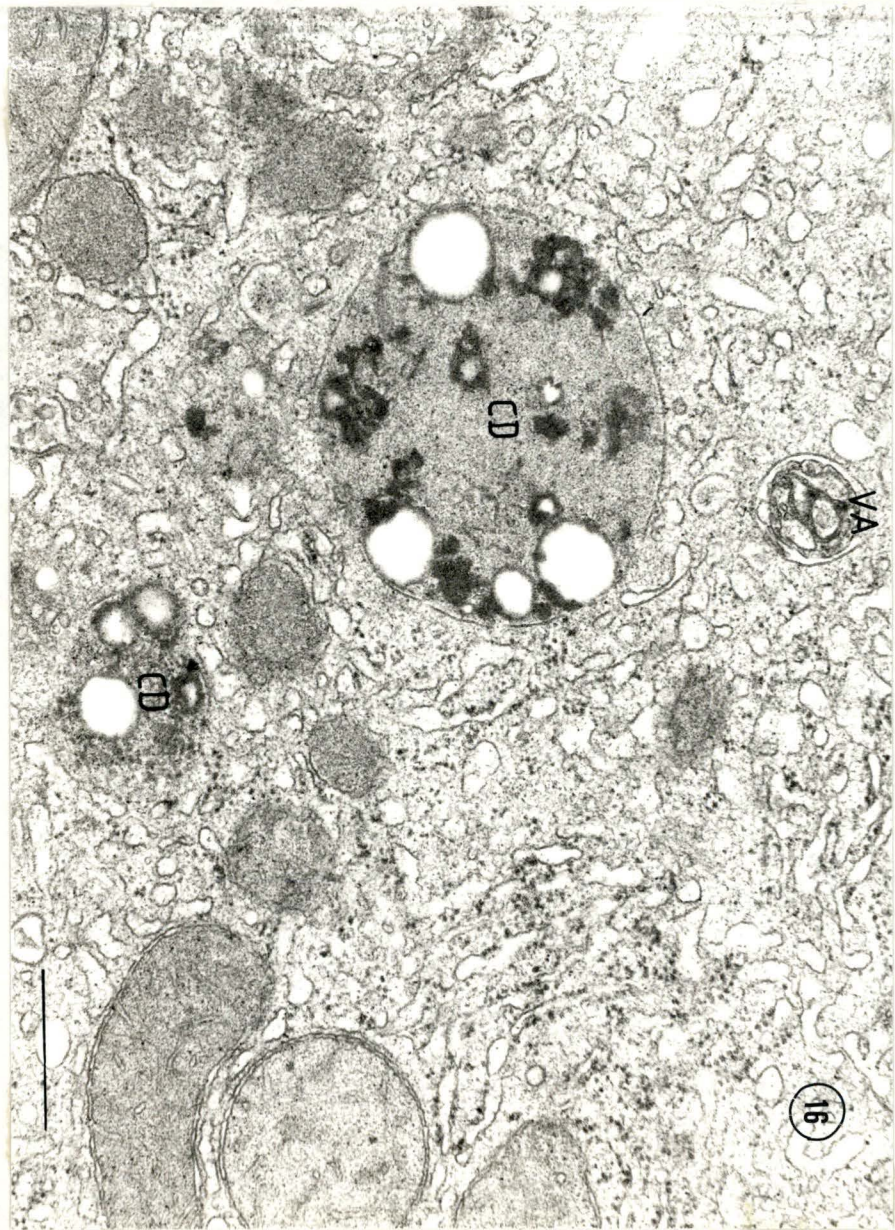


PLANCHE IX

Foie de rats cytochalasine (0,3 mg/100g)

Figure 17 : Vue à fort grossissement d'un dictyosome de l'appareil de Golgi dont certains saccules apparaissent remplis de VLDL (triangles pleins). Les triangles vides indiquent ce que pourraient être des vésicules de sécrétion contenant des VLDL émergeant du dictyosome.

(Gross. 60000 X) (La barre = 0,5 μ m)

Figure 18 : La membrane plasmique au niveau de l'espace de Disse montre, en certains endroits, une absence totale de microvillosités. Sous cette membrane sinusoidale, nous observons, outre des goutelettes lipidiques, la présence de vésicules (lysosomes ?) contenant des VLDL (triangles pleins).

(Gross. 60000 X) (La barre = 0,5 μ m)

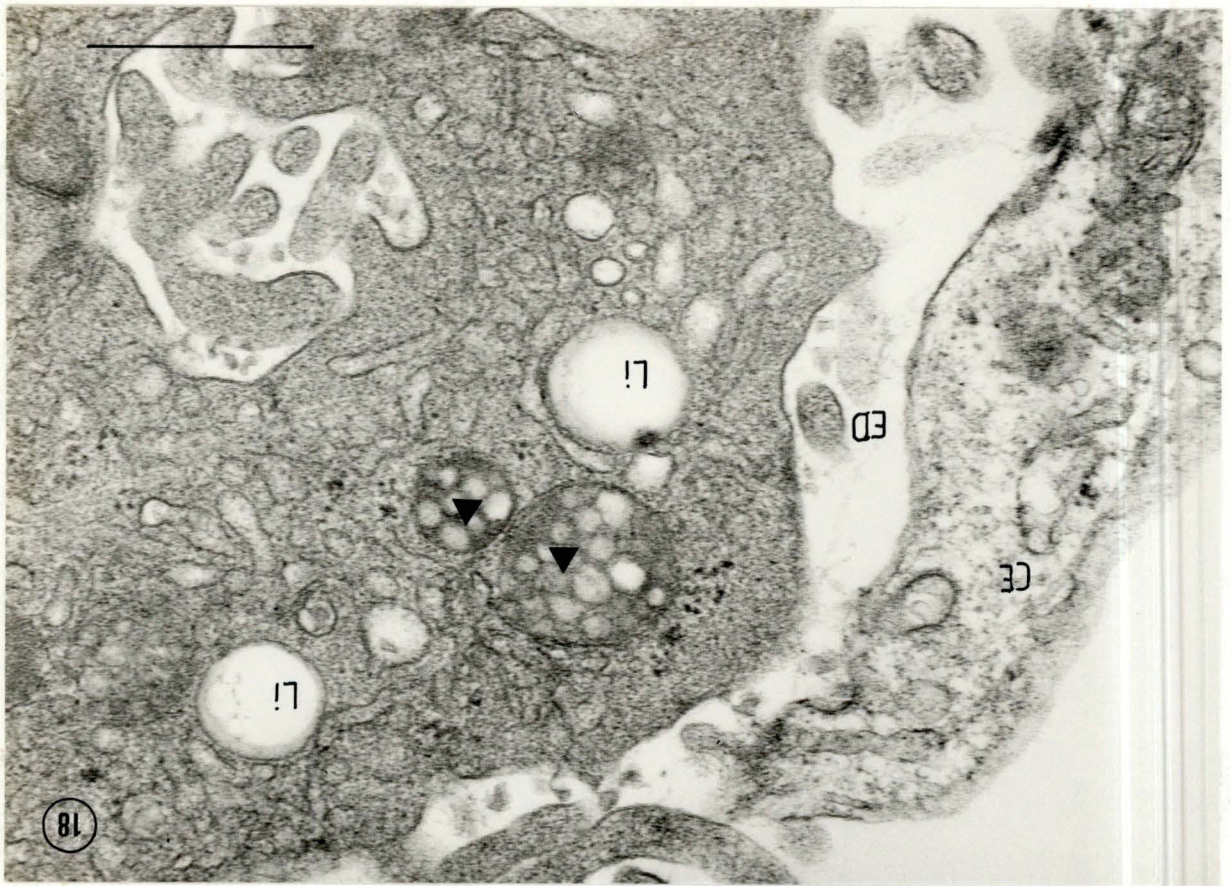


PLANCHE X

Foie de rats NaCl-DMSO + saccharose 2 heures

Figures 19 et 20 : Vues de quelques hépatocytes dans lesquels on remarque la présence de grosses vacuoles induites par le saccharose (triangles vides) contenant fréquemment des éléments cellulaires en voie de digestion (triangles pleins).

Les dictyosomes de l'appareil de Golgi ont tendance à s'écarter des canalicules biliaires et à se disperser dans le cytoplasme. Il est encore possible d'observer des corps denses normaux à proximité des canalicules biliaires.

(Gross. 8940 X) (La barre = 1 μ m)

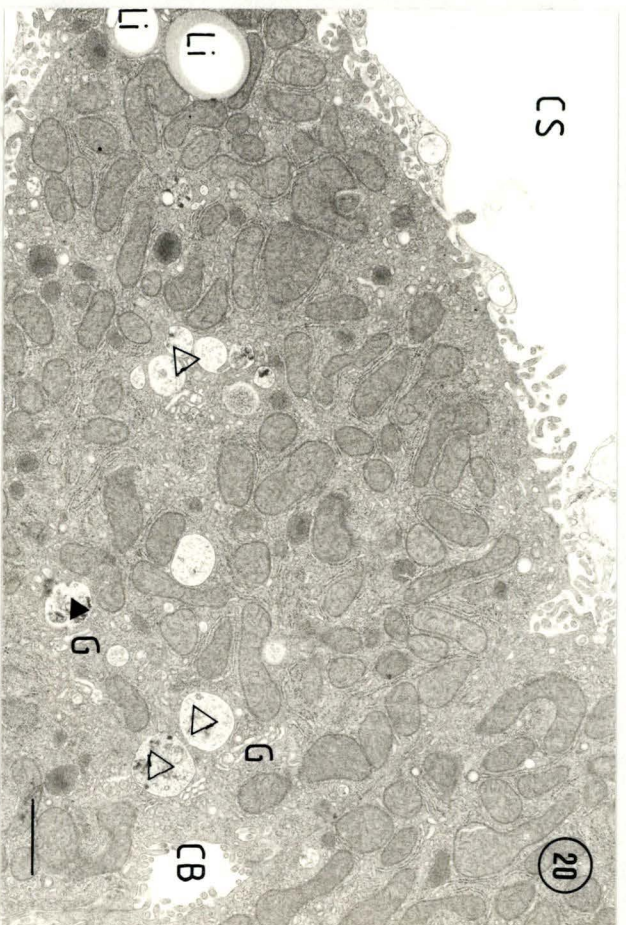
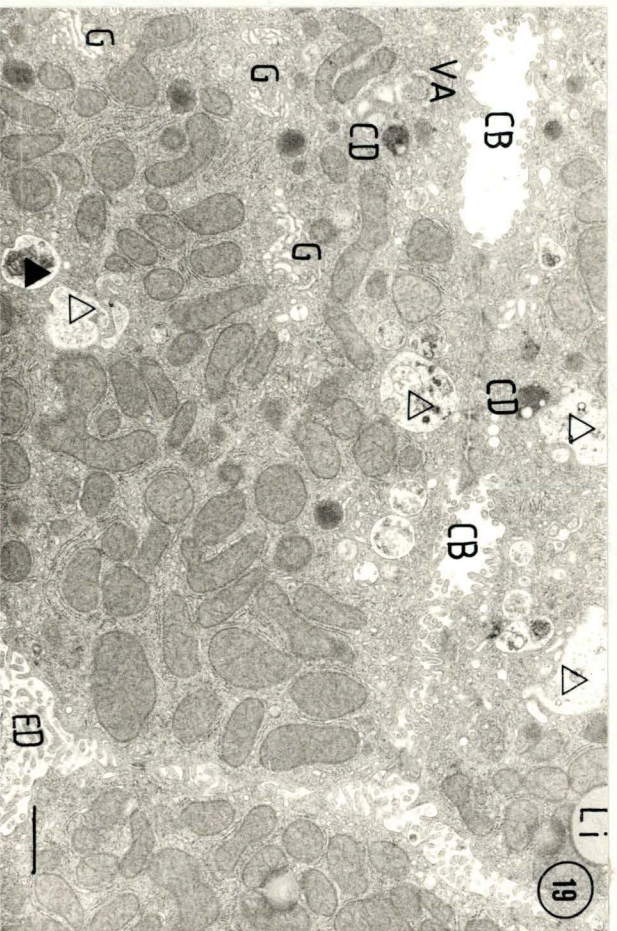


PLANCHE XI

Foie de rats NaCl-DMSO + saccharose 2 heures

Figure 21 : A l'intérieur d'une de ces vacuoles de saccharose (triangles vides), on peut distinguer une mitochondrie en voie de digestion (tête de flèche). Carrés : vacuoles d'autophagie.
(Gross. 33000 X) (La barre = 0,5 μ m)

Figure 22 : Détail de 2 vacuoles de saccharose (triangles vides) en bordure d'un canalicule biliaire. Une de ces vacuoles présente de nombreux résidus membranaires dans sa matrice. Les citernes de l'appareil de Golgi apparaissent claires et dilatées.
La flèche montre la fusion entre une petite vésicule, peut-être un lysosome primaire, avec une vacuole de saccharose.
(Gross. 26280 X) (La barre = 0,5 μ m)

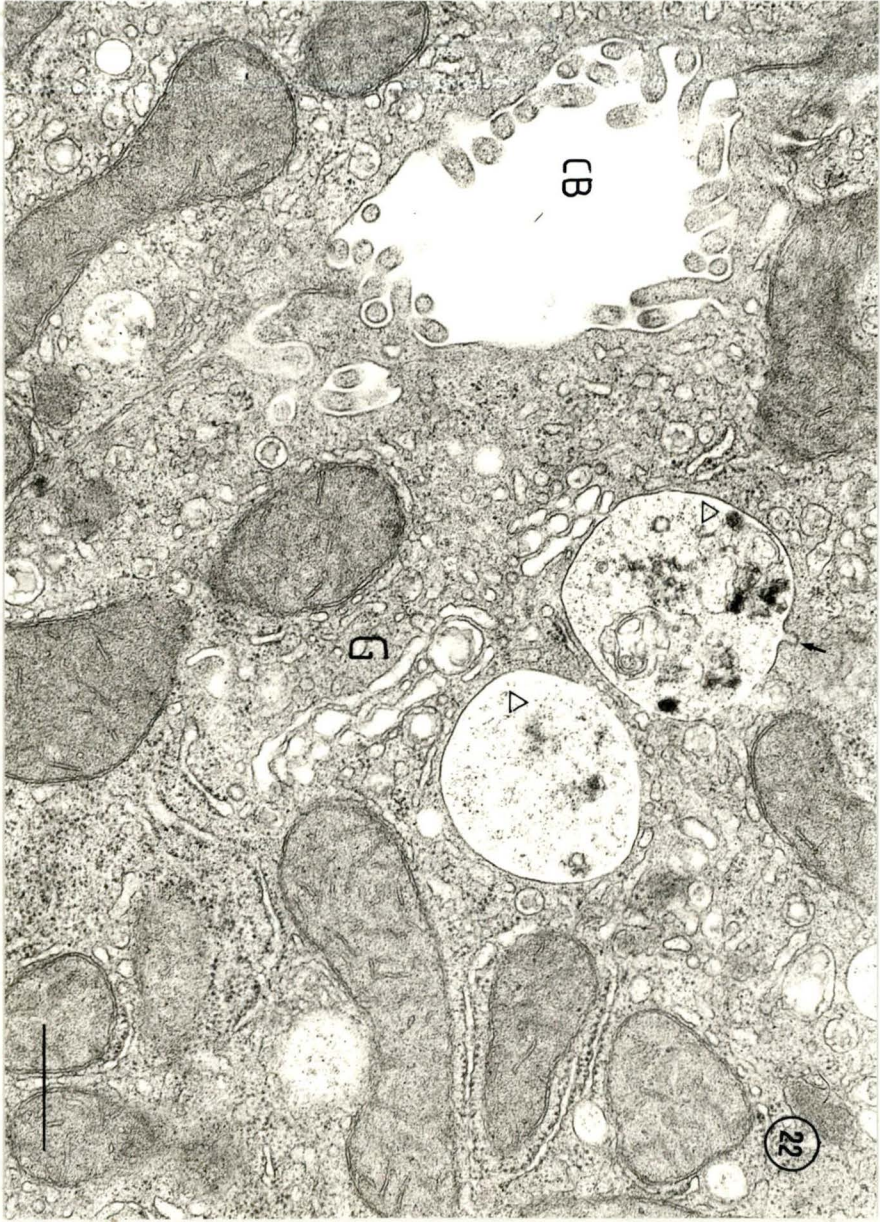


PLANCHE XII

Foie de rats NaCl-DMSO + saccharose 2 heures

Figure 23 : Vue d'une cellule endothéliale présentant un grand nombre de vacuoles claires aux électrons (triangles vides)

(Gross. 19800 X) (La barre = 1 μm)

Figure 24 : Détail d'une vacuole de saccharose montrant assez nettement le halo clair caractéristique des lysosomes (flèches). A proximité de cette vacuole, un dictyosome de l'appareil de Golgi présente des saccules fortement dilatés.

(Gross. 33000 X) (La barre = 0,5 μm)

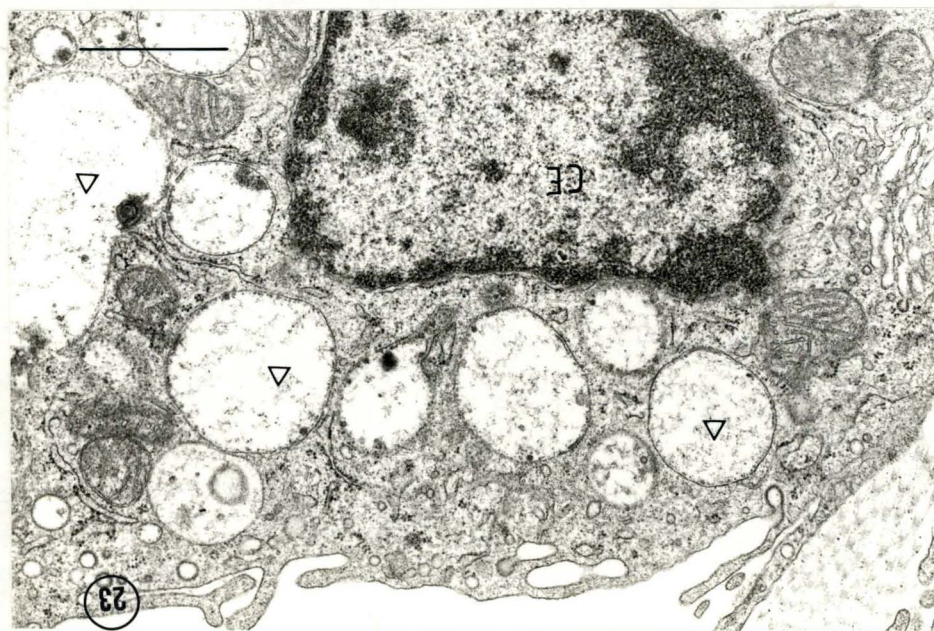
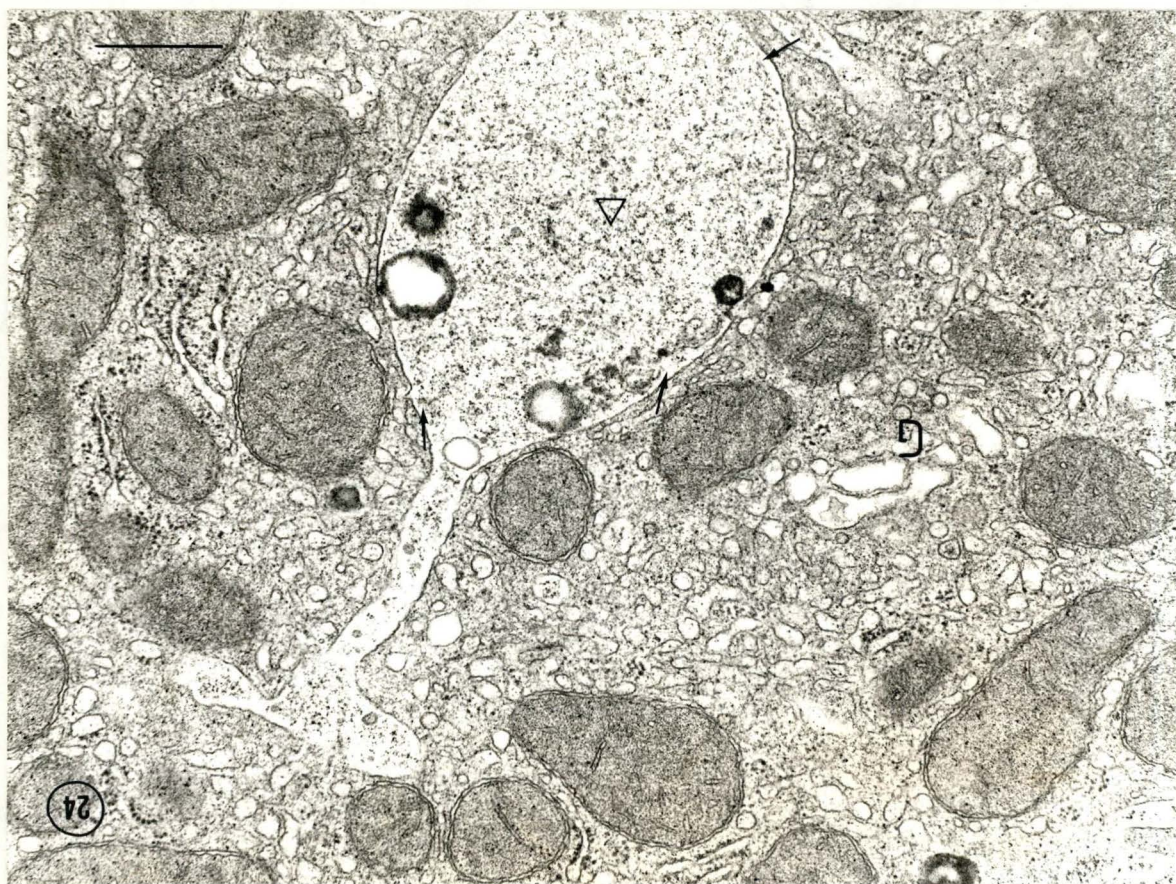


PLANCHE XIII

Foie de rats NaCl-DMSO + saccharose 2 heures

Figure 25 : Sur cette vue de la périphérie d'un hépatocyte, nous observons une accumulation importante de VLDL dans l'espace de Disse (flèches) et dans des vésicules sous la membrane plasmique (têtes de flèches).

Le triangle vide indique une vacuole de saccharose à l'intérieur d'une cellule endothéliale.

(Gross. 33000 X) (La barre = 0,5 μ m)

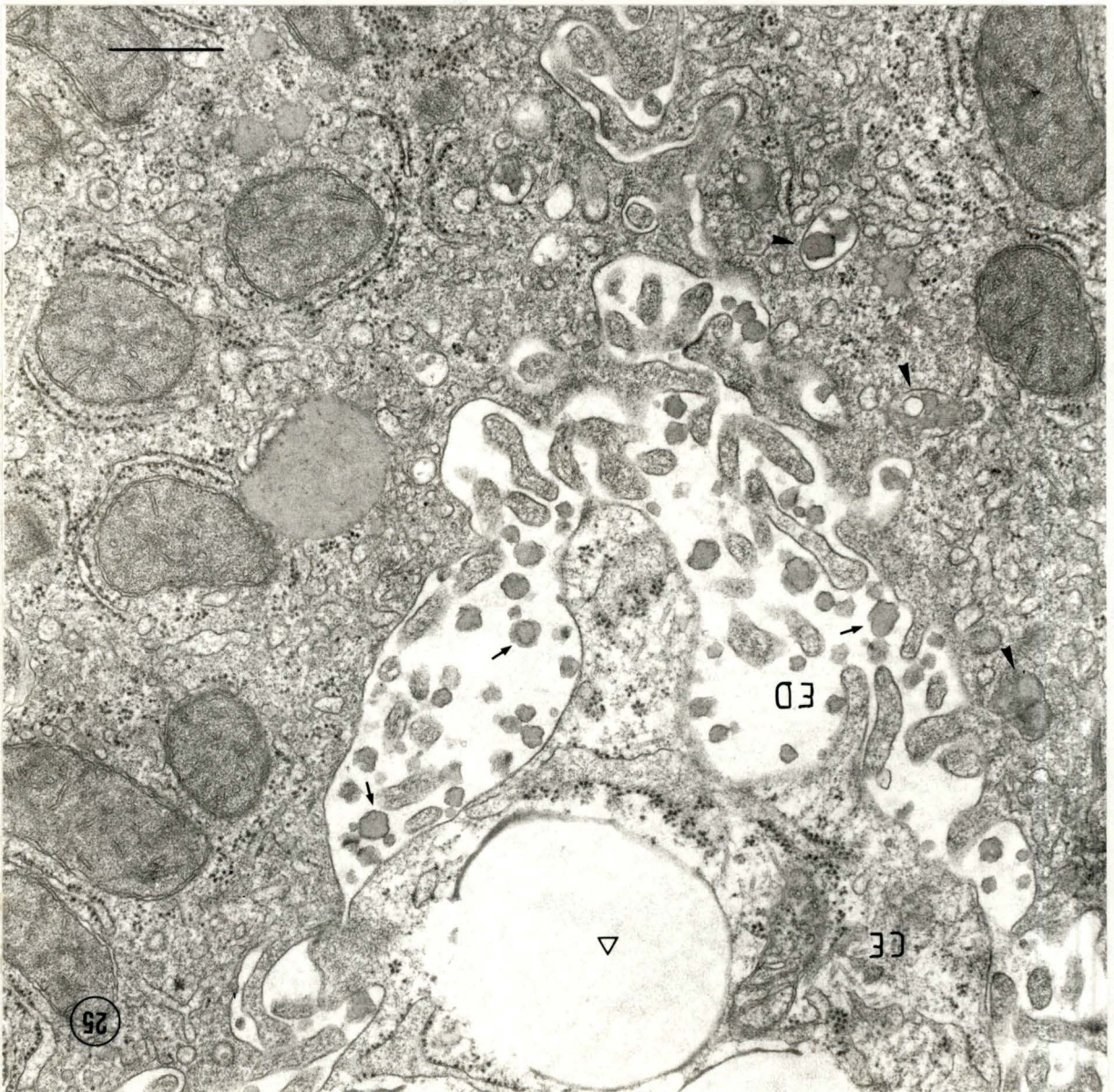


PLANCHE XIV

Foie de rats cytochalasine (0,038 mg/100g) + saccharose 2 heures

Figure 26 : Détail de plusieurs vacuoles claires (triangles vides) et de vacuoles d'autophagie. On observe, à l'intérieur des vacuoles claires, des inclusions semblables à celles que nous observions chez des rats traités uniquement à la cytochalasine (têtes de flèches). Les flèches montrent des microfilaments encore visibles sous la membrane canaliculaire.

(Gross. 33000 X) (La barre = 0,5 μ m)

Figure 27 : Sur cette vue à faible grossissement, nous observons, dispersées dans le cytoplasme, des vacuoles claires (triangles vides) dont certaines contiennent des inclusions d'aspect lipidique (flèches) semblables à celles que nous observons à l'intérieur des quelques corps denses non dilatés visibles sur cette coupe.

Un dictyosome de l'appareil de Golgi montre des saccules fort dilatés.

(Gross. 12000 X) (La barre = 1 μ m)

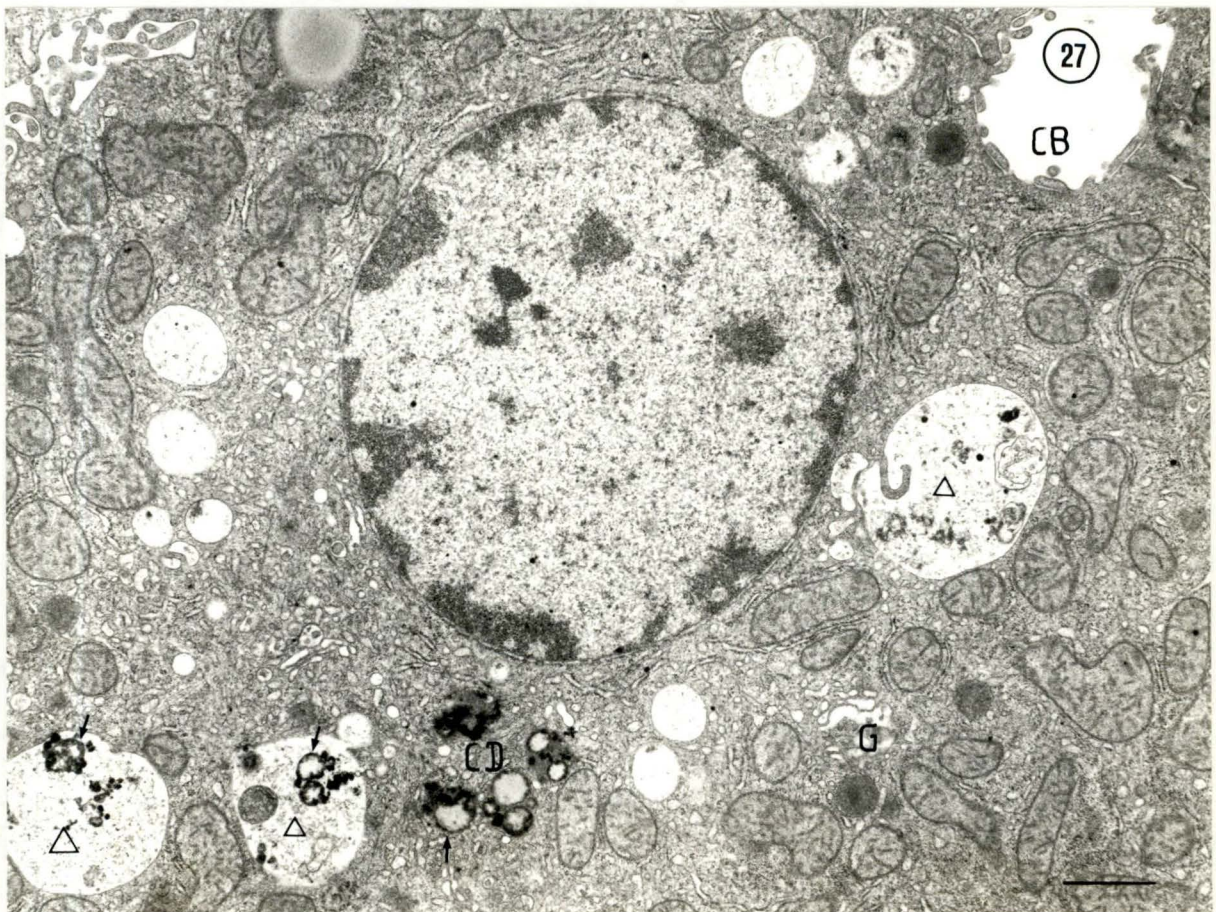
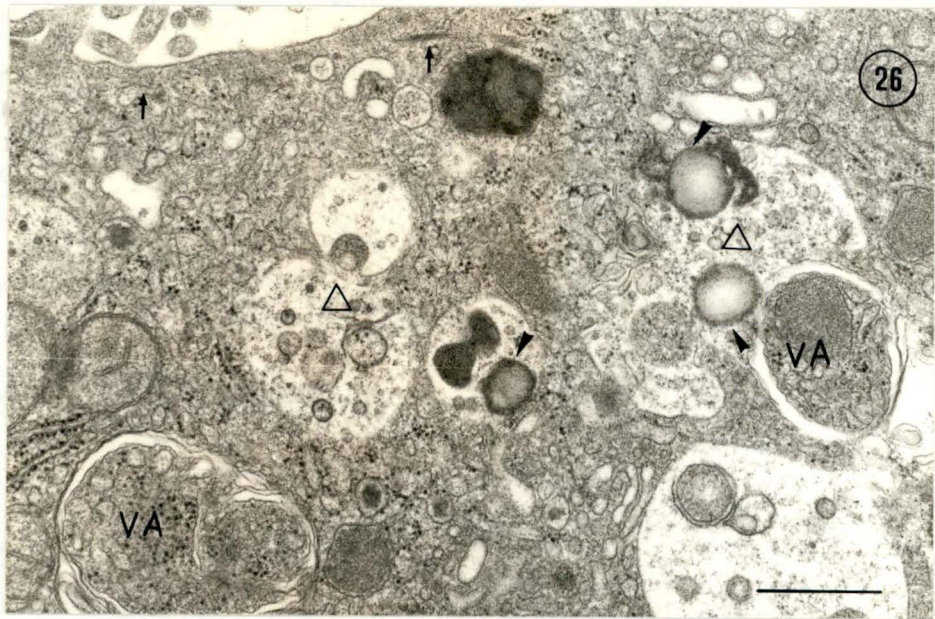


PLANCHE XV

Foie de rats cytochalasine (0,077 mg/100g) + saccharose 2 heures

Figure 28 : Vue à faible grossissement de quelques hépatocytes. Les canalicules biliaires apparaissent fort dilatés. Les vacuoles de saccharose (triangles vides) sont peu abondantes. Elles montrent parfois des fusions entre elles (tête de flèche).
(Gross. 7800 X) (La barre = 1 μ m)

Figure 29 : Les vacuoles de saccharose (triangles vides) et d'autophagie (triangles pleins) sont relativement abondantes dans le cytoplasme de ces hépatocytes, mais de taille assez petite. La flèche indique un corps dense non dilaté.

(Gross. 7800 X) (La barre = 1 μ m)

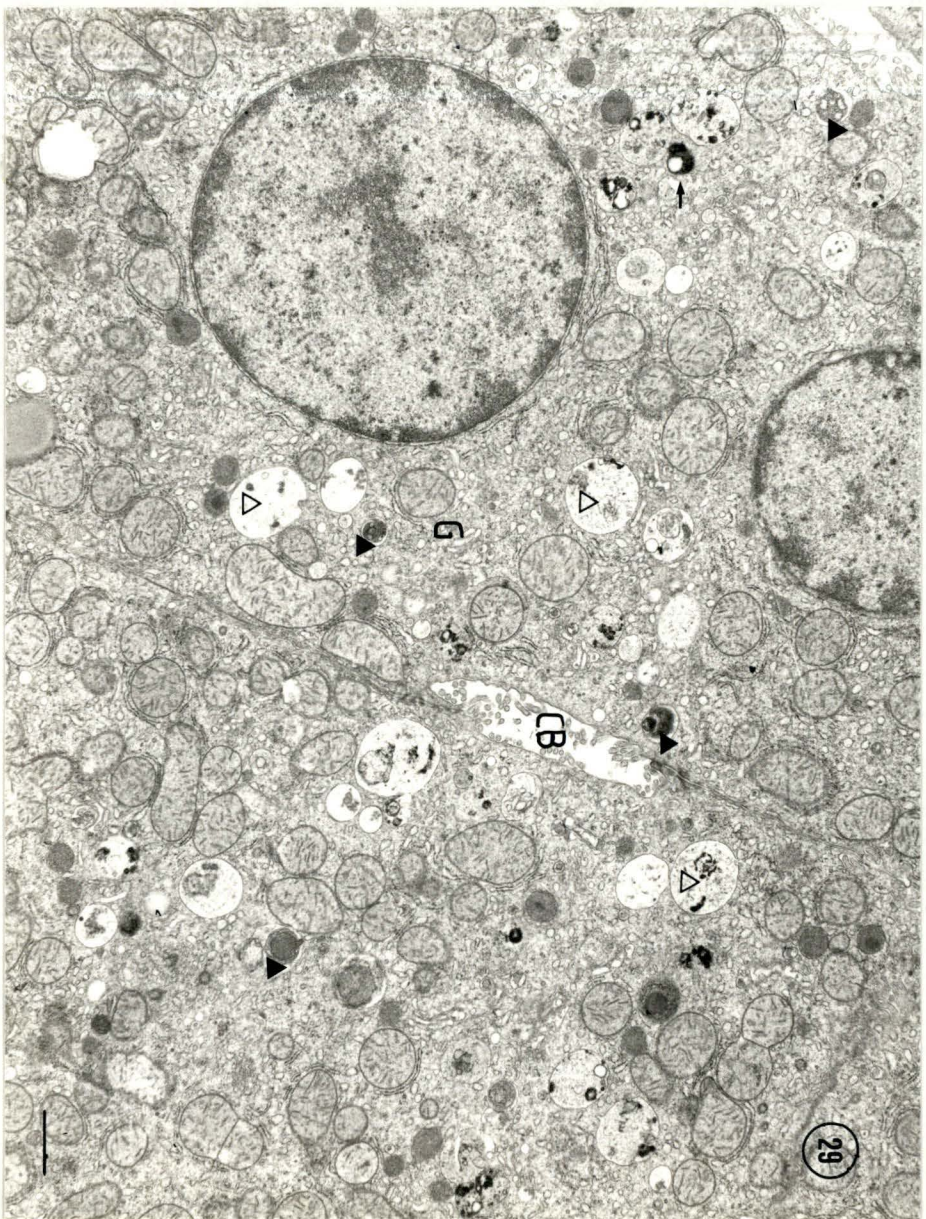
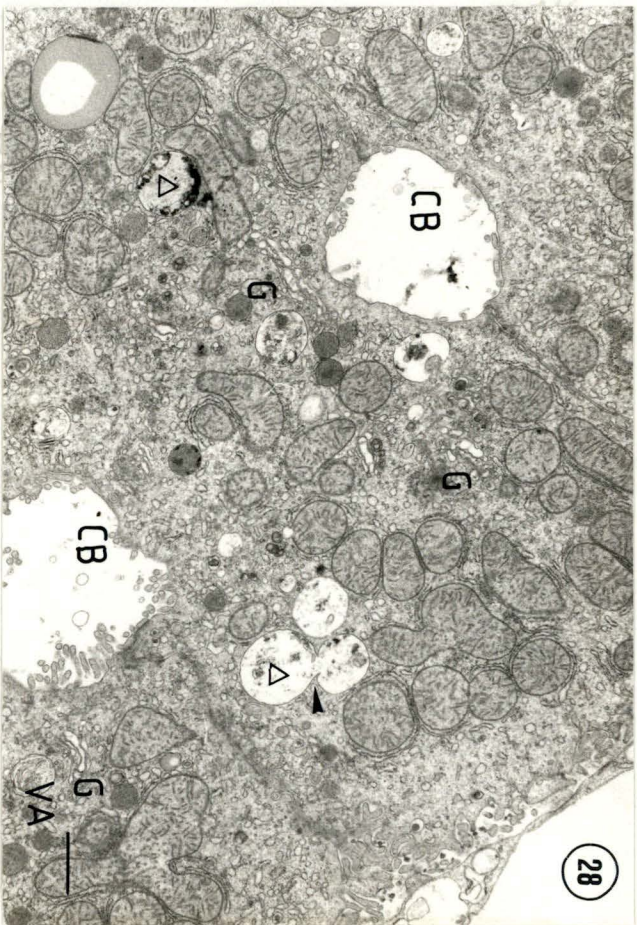


PLANCHE XVI

Foie de rats cytochalasine (0,077 mg/100g) + saccharose 2 heures

Figure 30 : Aux abords de ce canalicule biliaire, nous observons, outre une vacuole de saccharose (triangle vide), plusieurs corps denses présentant, dans leur matrice, des inclusions d'aspect clair aux électrons (flèches).

(Gross. 15600 X) (La barre = 1 μ m)

Figure 31 : Détail de vacuoles de saccharose (triangles vides) dont la matrice contient souvent des résidus d'organelles. La flèche montre un lysosome peu dilaté. Un dictyosome de l'appareil de Golgi, très réduit, n'est composé que de trois saccules visibles. Le triangle plein : vacuole d'autophagie.

(Gross. 25200 X) (La barre = 1 μ m)

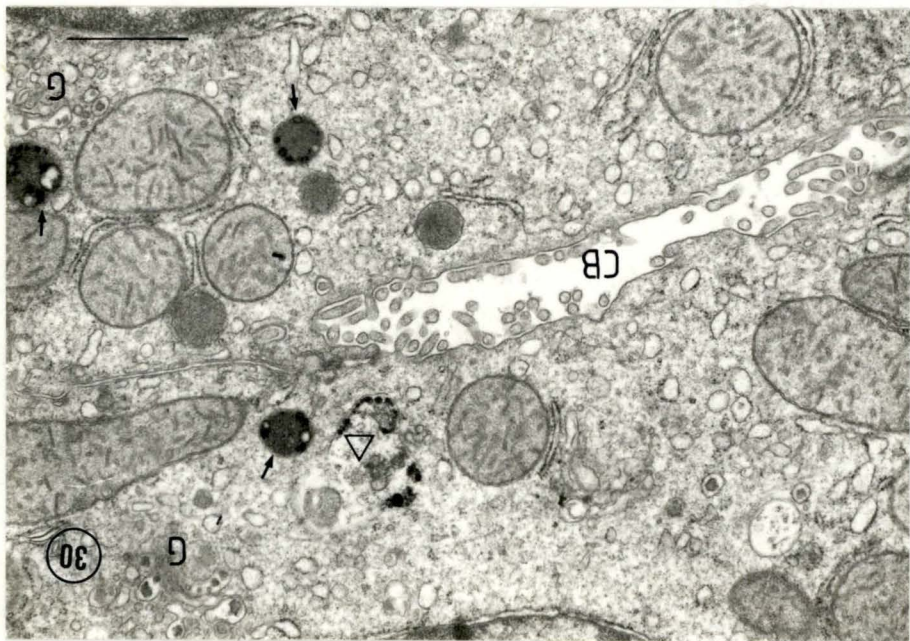
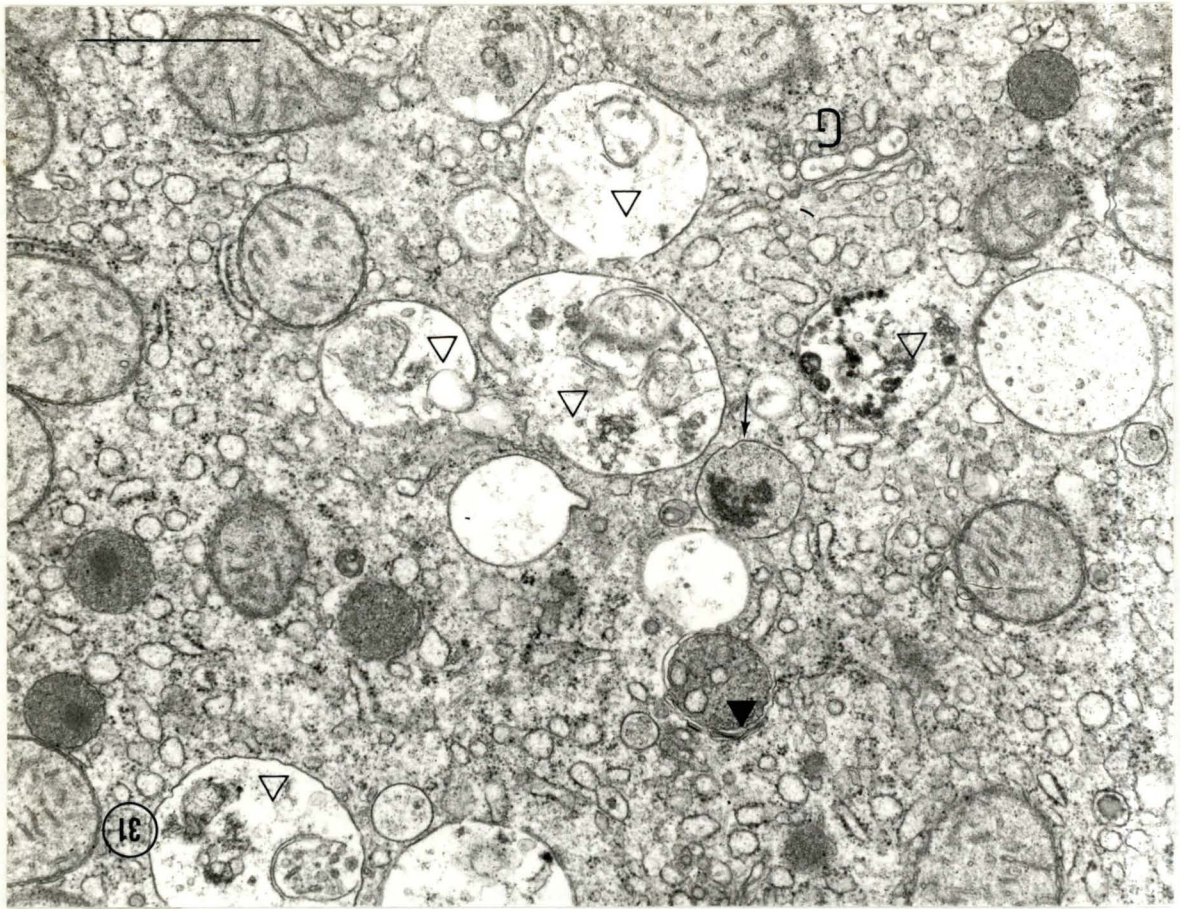


PLANCHE XVII

Foie de rats cytochalasine (0,077 mg/100g) + saccharose 2 heures

Figure 32 : Détail d'un dictyosome de l'appareil de Golgi dont les saccules, très réduits et fragmentés en vésicules, contiennent des particules de VLDL (flèches).
(Gross. 43200 X) (La barre = 0,5 μ m)

Figure 33 : Cette vue à fort grossissement montre, à proximité d'un canalicule biliaire, un microtubule (tête de flèche) et des microfilaments d'aspect normal (flèche).
(Gross. 96 000 X) (La barre = 0,1 μ m)

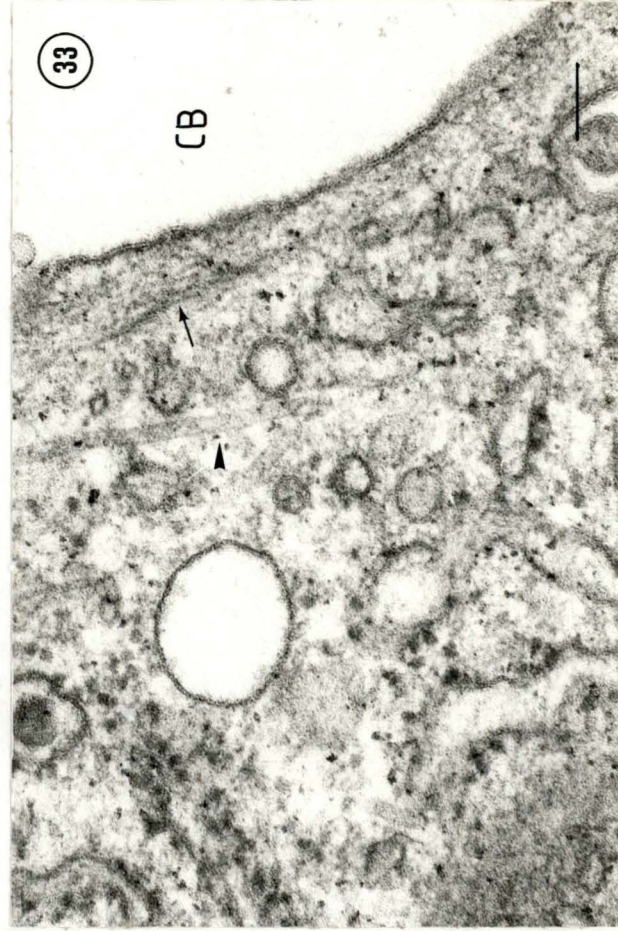
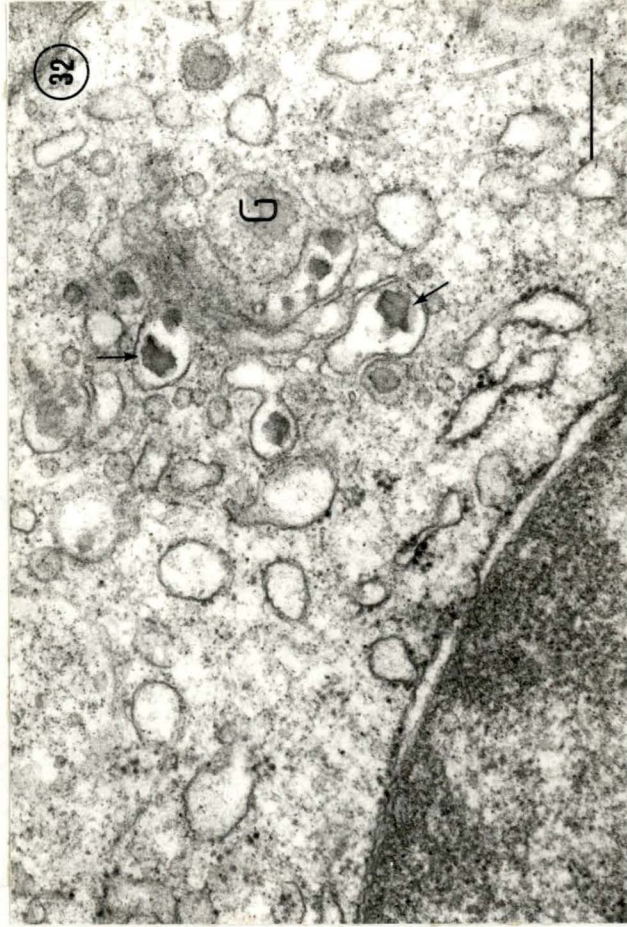


PLANCHE XVIII

Foie de rats cytochalasine (0,15 mg/100g) + saccharose 2 heures

Figure 34 : Nous observons, à proximité d'un canalicule biliaire dilaté, quelques corps denses (flèches) contenant des inclusions claires de taille parfois importante, un corps dense déjà légèrement dilaté (tête de flèche) et plusieurs vacuoles de saccharose (triangles vides).
(Gross. 19800 X) (La barre = 1 μ m)

20mm
↓
50x
1000mm

Handwritten signature and date: 20/10/68

Figure 35 : Vue de plusieurs vacuoles de saccharose (triangles vides) dont l'une d'elles semble en train d'internaliser une partie du cytoplasme et des organites (flèches), d'un dictyosome et d'une vacuole d'autophagie (triangle plein).
Nous pouvons remarquer la présence, dans l'une des vacuoles de saccharose, d'inclusions semblables à celles observées dans les corps denses des rats traités à la cytochalasine sans injection ultérieure de saccharose (têtes de flèches).
(Gross. 33000 X) (La barre = 0,5 μ m)

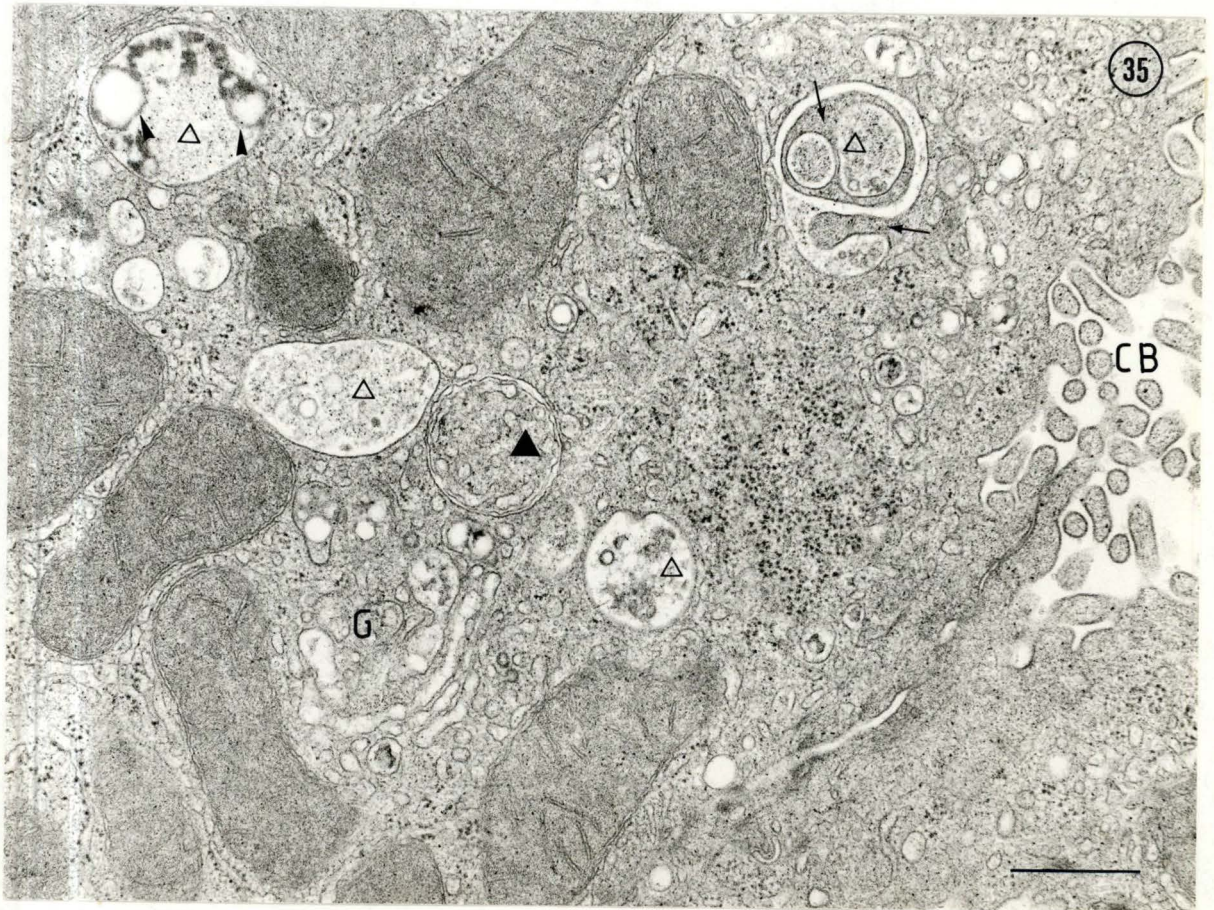
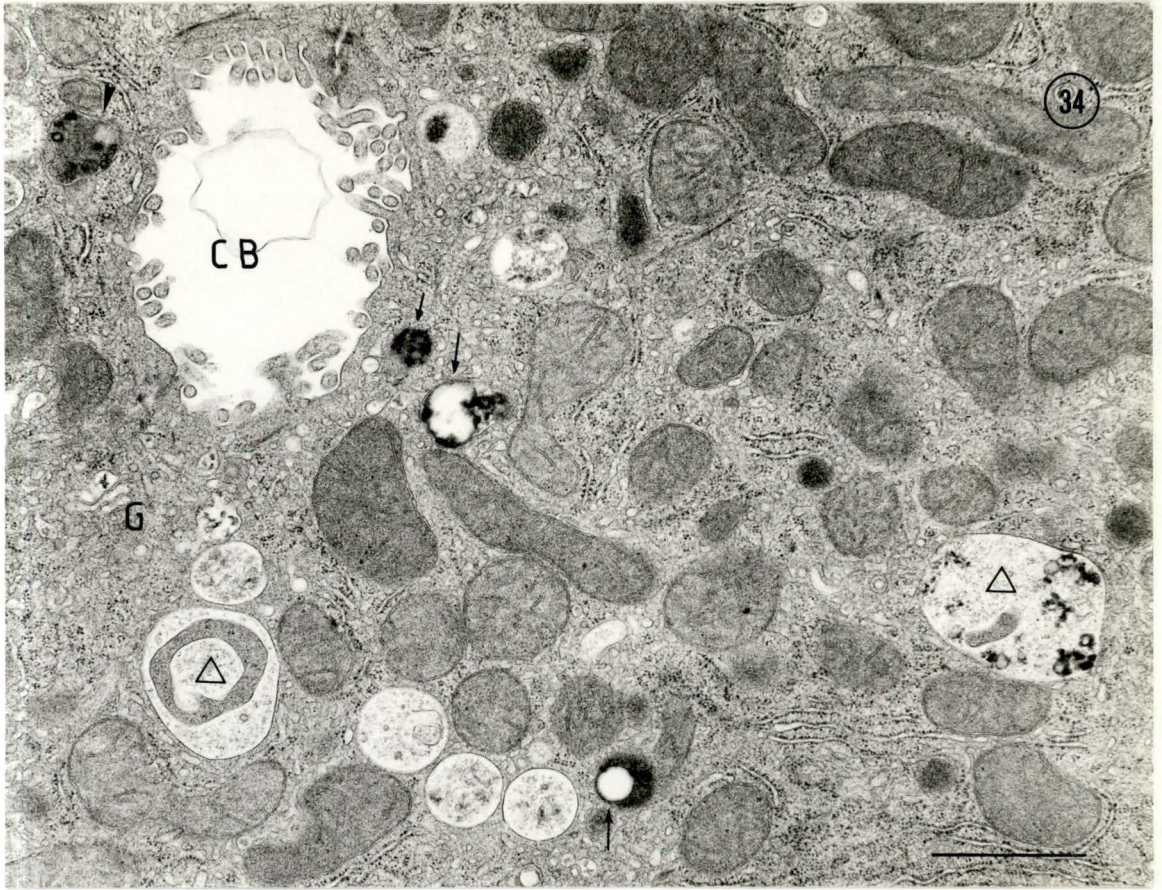


PLANCHE XIX

Foie de rats cytochalasine (0,15 mg/100g) + saccharose 2 heures

Figure 36 : Vue du bord d'un hépatocyte où l'on observe des vésicules contenant des VLDL (flèches) et un lysosome ayant ingéré des VLDL (tête de flèche).

E : érythrocyte.

(Gross. 33000 X) (La barre = 0,5 μ m)

Figure 37 : Aux abords d'un canalicule biliaire dilaté, trois corps denses montrent ce qui pourrait être 3 étapes de la dilatation des corps denses et de leur transformation en vacuole de saccharose.

(Gross. 33000 X) (La barre = 0,5 μ m)

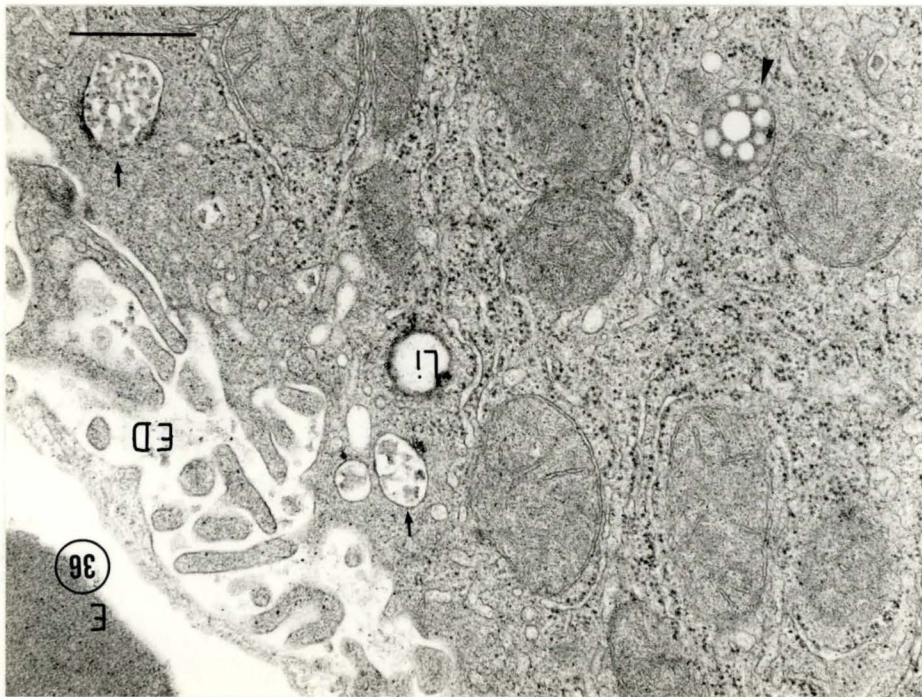


PLANCHE XX

Foie de rats cytochalasine (0,3 mg/100g) + saccharose 2 heures

Figure 38 : Vue à faible grossissement montrant plusieurs canalicules biliaires dilatés entourés de vacuoles claires de saccharose (triangles vides) et de corps denses non dilatés (flèches). Une vacuole claire semble avoir ingéré une mitochondrie (tête de flèche).

(Gross. 7800 X) (La barre = 1 μ m)

Figure 39 : Cette vue à plus fort grossissement montre un canalicule biliaire très dilaté dont la membrane n'émet presque plus de microvillosités dans la lumière. A proximité de ce canalicule, nous observons des vacuoles d'autophagie (triangles pleins) et des vacuoles de saccharose (triangles vides). Une de ces dernières présente, dans sa matrice, des inclusions semblables à celles observées dans les corps denses des hépatocytes de rats traités uniquement à la cytochalasine (flèche).

(Gross. 19800) (La barre = 1 μ m)

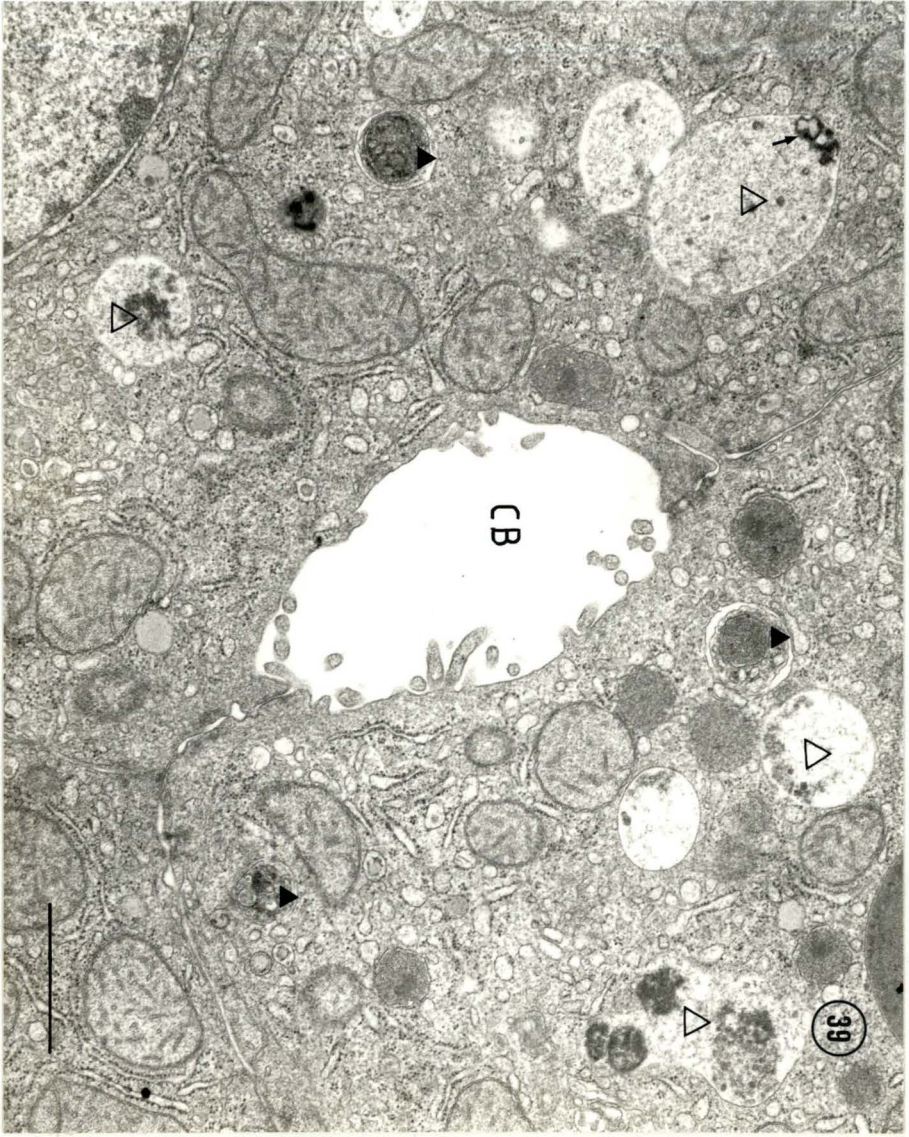
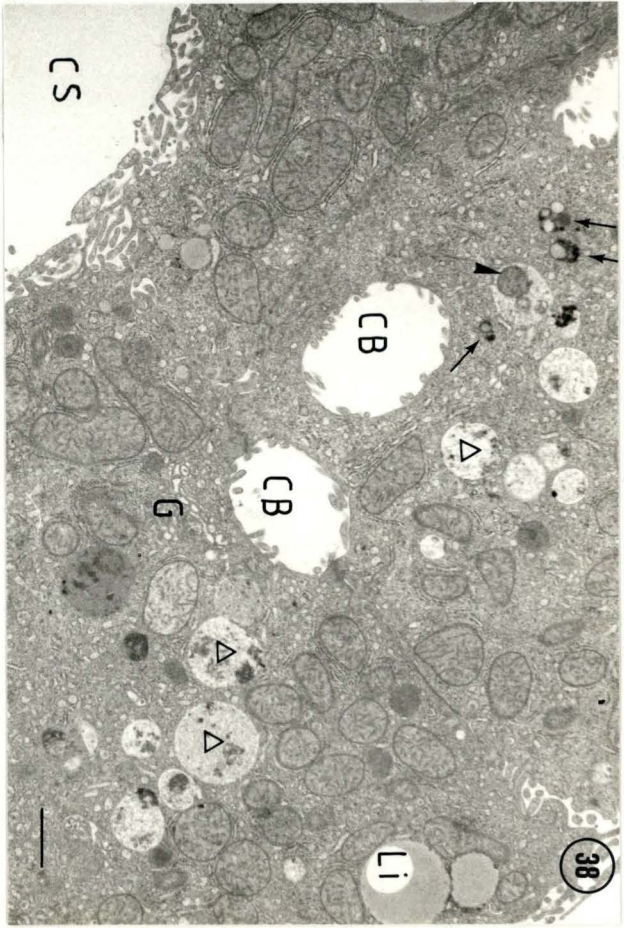


PLANCHE XXI

Foie de rats cytochalasine (0,3 mg/100g) + saccharose 2 heures

Figure 40 : Nous observons, à proximité de vacuoles claires (triangles vides), quelques corps denses (têtes de flèches) présentant des inclusions claires d'aspect lipidique que l'on retrouve également au niveau d'une vacuole claire de saccharose (flèche).

(Gross. 19800 X) (La barre = 1 μ m)

Figure 41 : Vue à fort grossissement d'un dictyosome de l'appareil de Golgi dont les saccules apparaissent clairs et dilatés. Nous observons plusieurs microtubules à proximité de ce dictyosome (têtes de flèches).

(Gross. 60000 X) (La barre = 0,5 μ m)

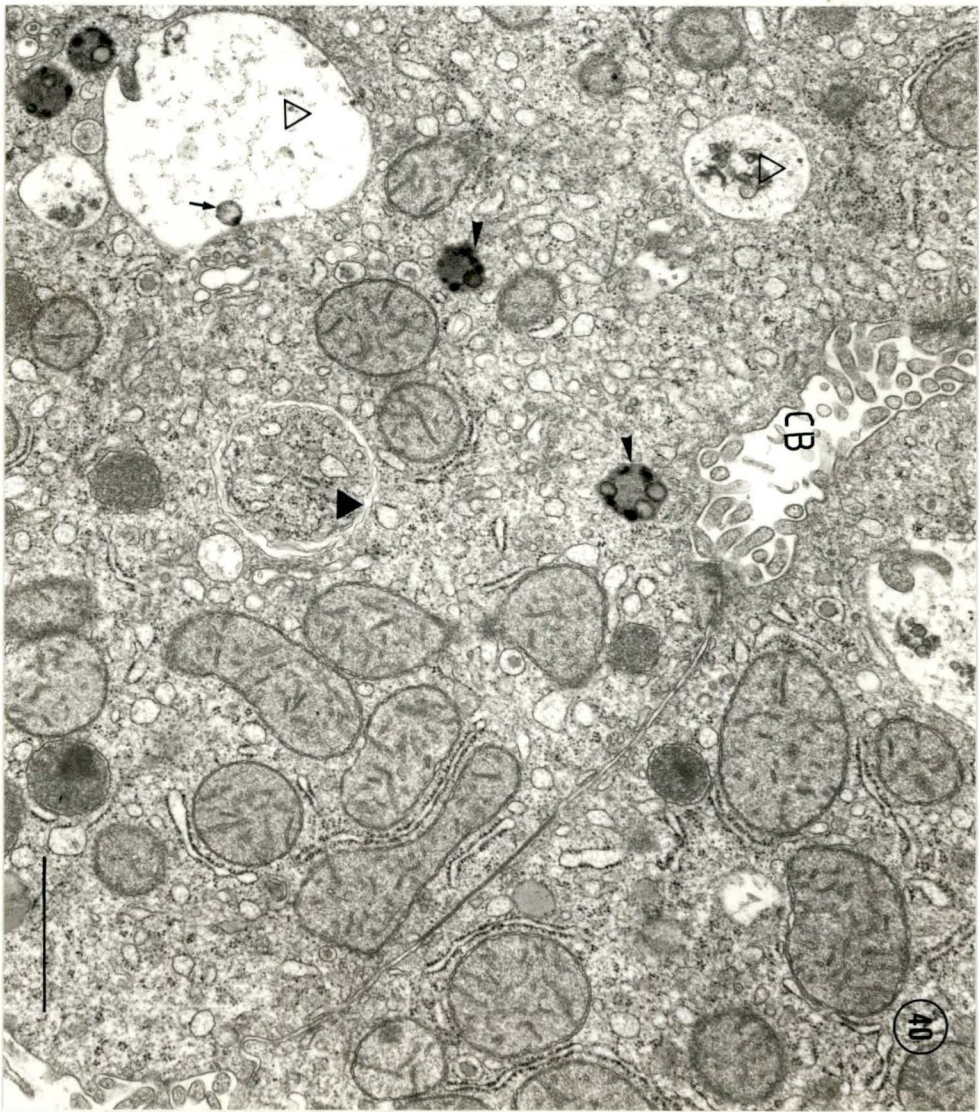


PLANCHE XXII

Foie de rat NaCl-DMSO + saccharose 30 minutes

Figure 42 : Vue à faible grossissement d'un hépatocyte où l'on peut voir, à proximité d'un canalicule biliaire d'aspect normal, des vacuoles de saccharose de petite taille (triangles vides) et de nombreuses vacuoles d'autophagie (triangles pleins).

(Gross. 12000 X) (La barre = 1 μ m)

Figure 43 : Cette vue d'un hépatocyte montre des vacuoles d'autophagie (triangles pleins) en nombre très important, situées à proximité de quelques vacuoles de saccharose (triangles vides) et de dictyosomes de l'appareil de Golgi.

(Gross. 19800 X) (La barre = 1 μ m)

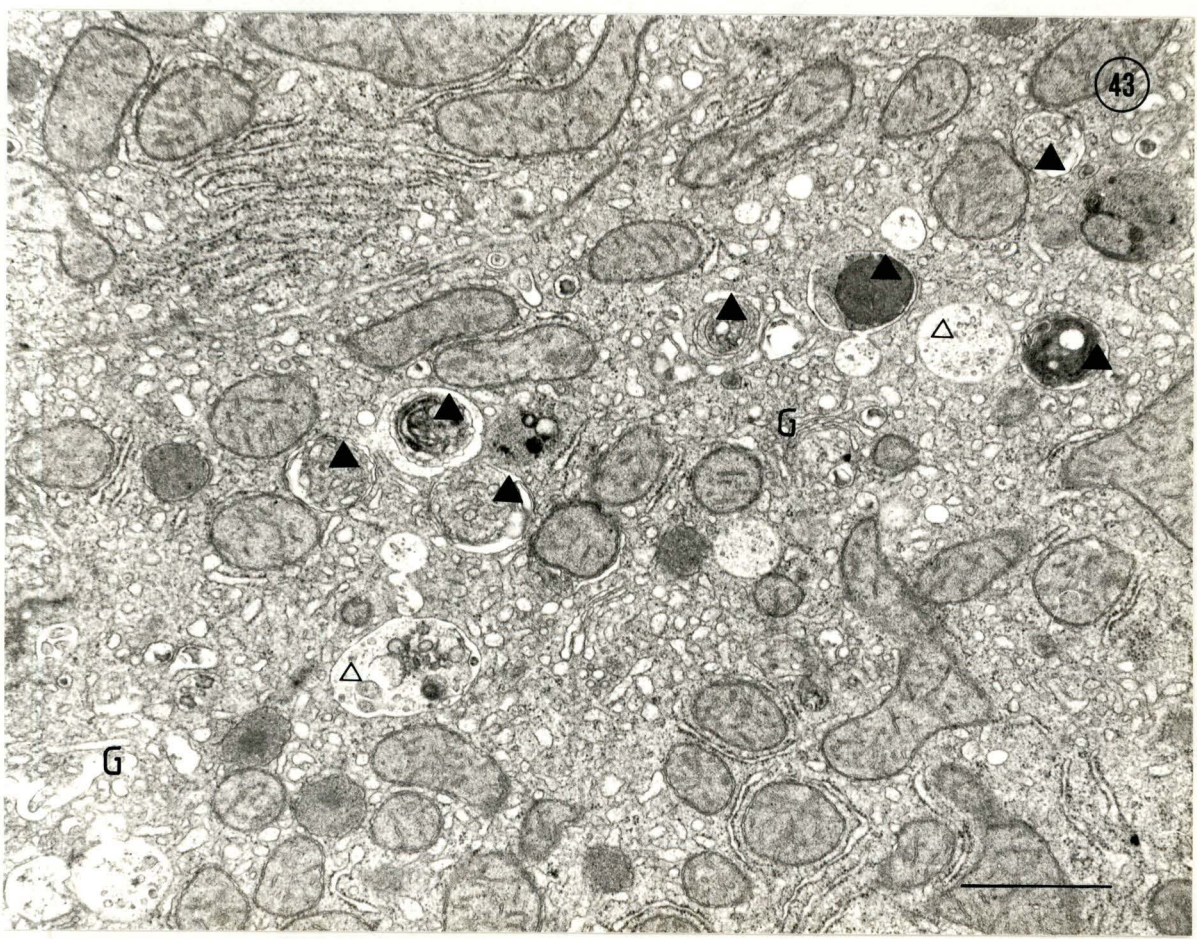
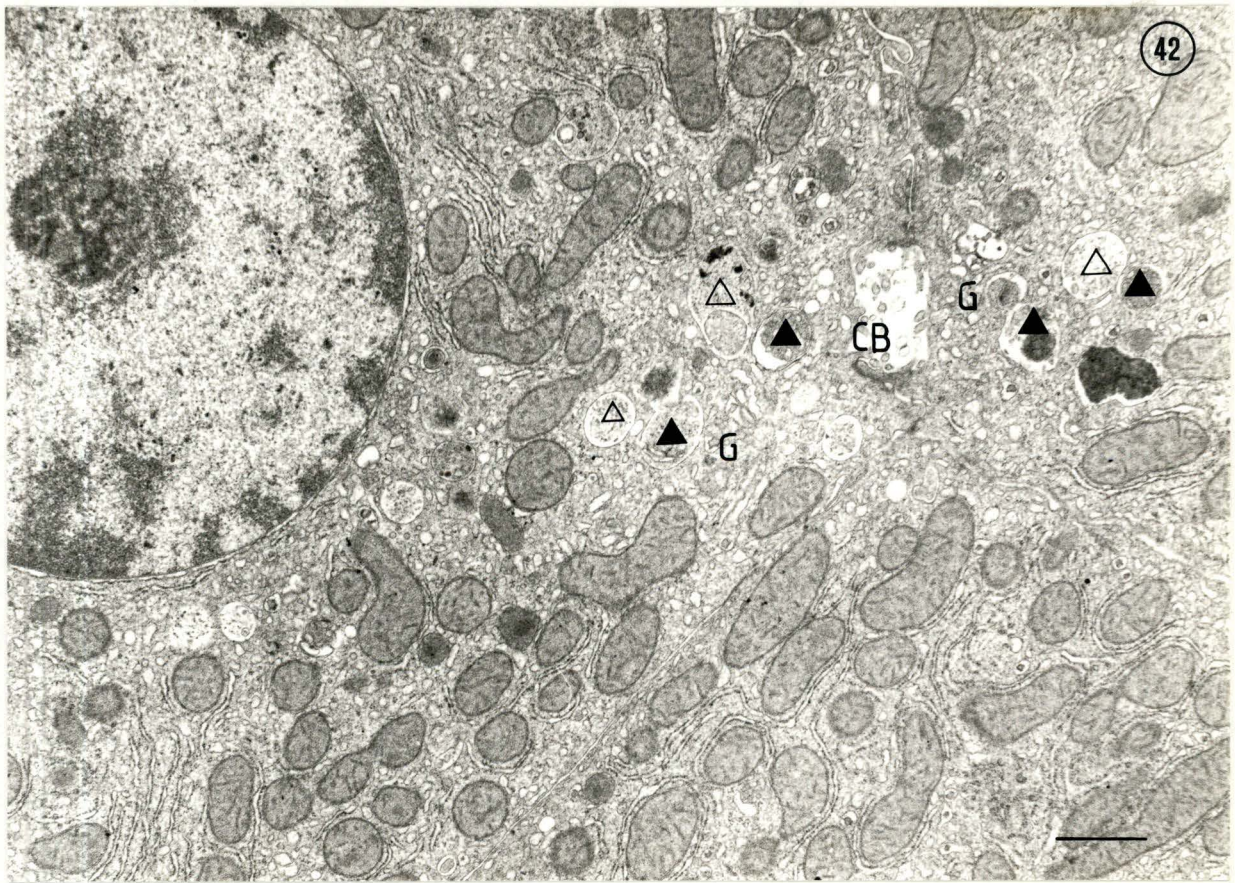


PLANCHE XXIII

Foie de rat NaCl-DMSO + saccharose 30 minutes

Figure 44 : Vue d'un hépatocyte montrant, à proximité d'un canalicule biliaire, un dictyosome bien développé. L'on ne distingue que quelques vacuoles de saccharose d'aspect moins clair que les vacuoles observées après 2 heures de traitement au saccharose (triangles vides).

Triangle plein : vacuole d'autophagie.

(Gross. 25200 X) (La barre = 1 μ m)

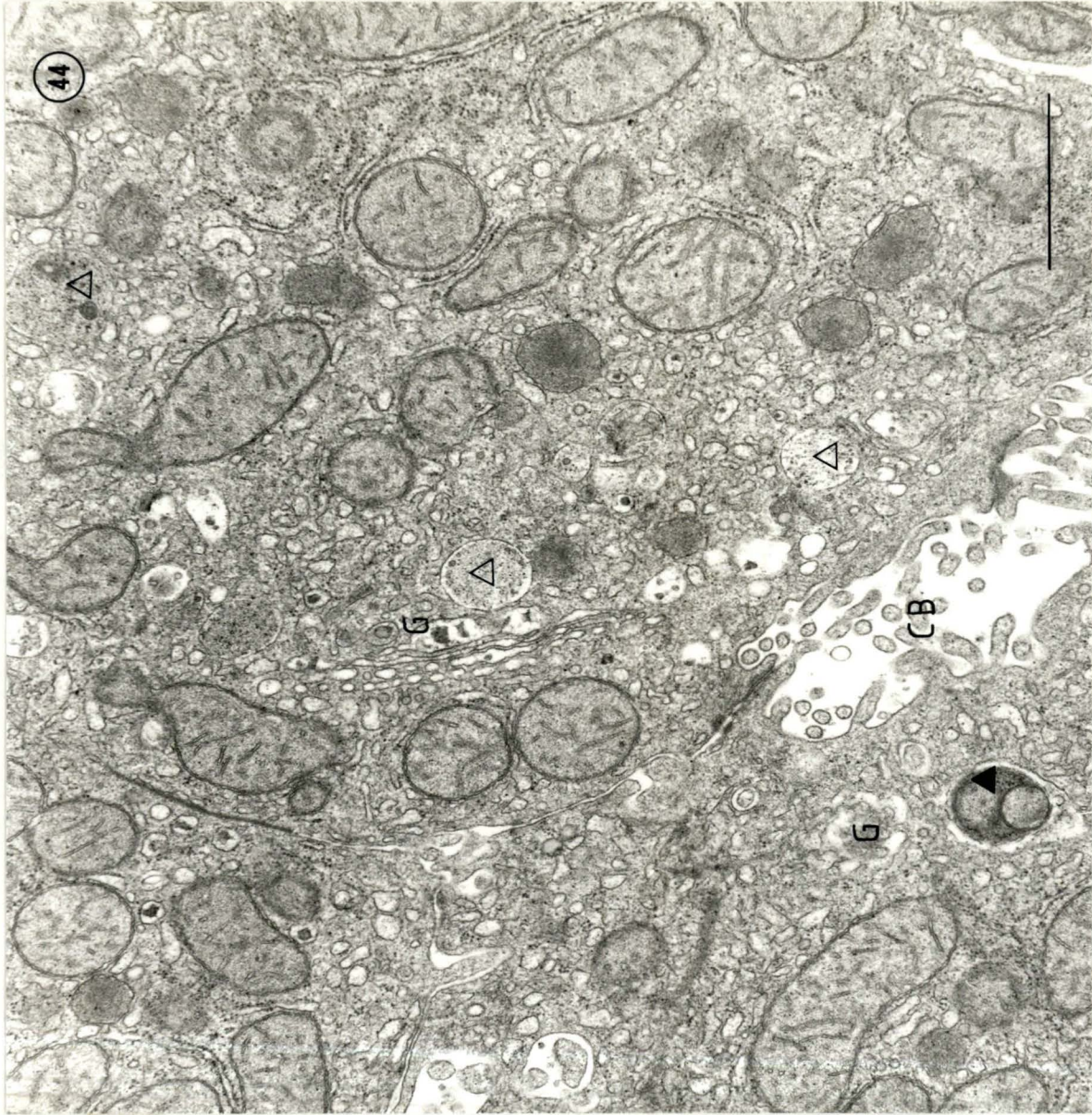


PLANCHE XXIV

Foie de rat NaCl-DMSO + saccharose 1 heure

Figures 45 et 46 : Après 1 heure de traitement au saccharose, nous n'observons encore que très peu de vacuoles claires (triangles vides). Celles-ci contiennent fréquemment des mitochondries en voie de digestion (têtes de flèches) ou des portions du cytoplasme environnant (flèches).

(Gross. 19800 X) (La barre = 1 μ m)

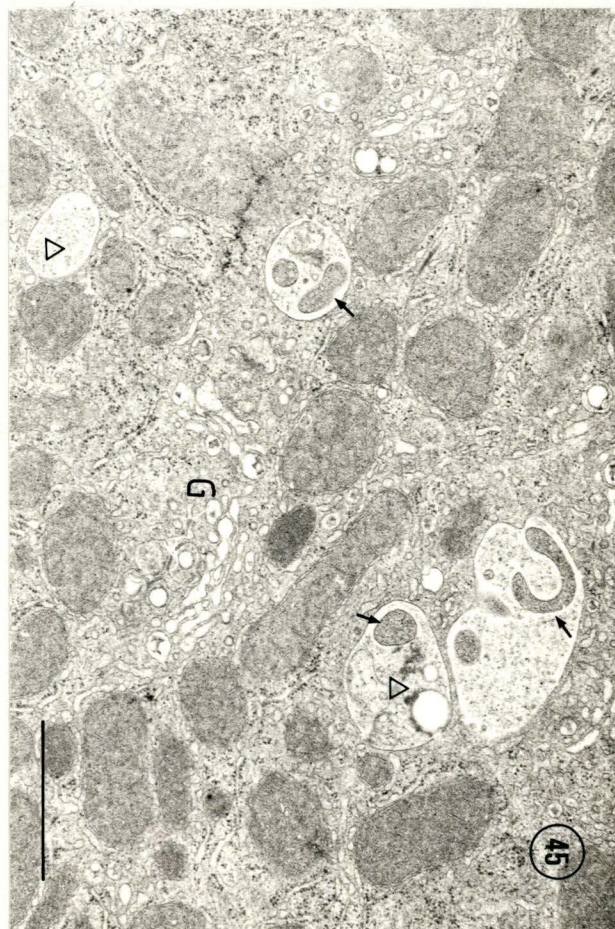
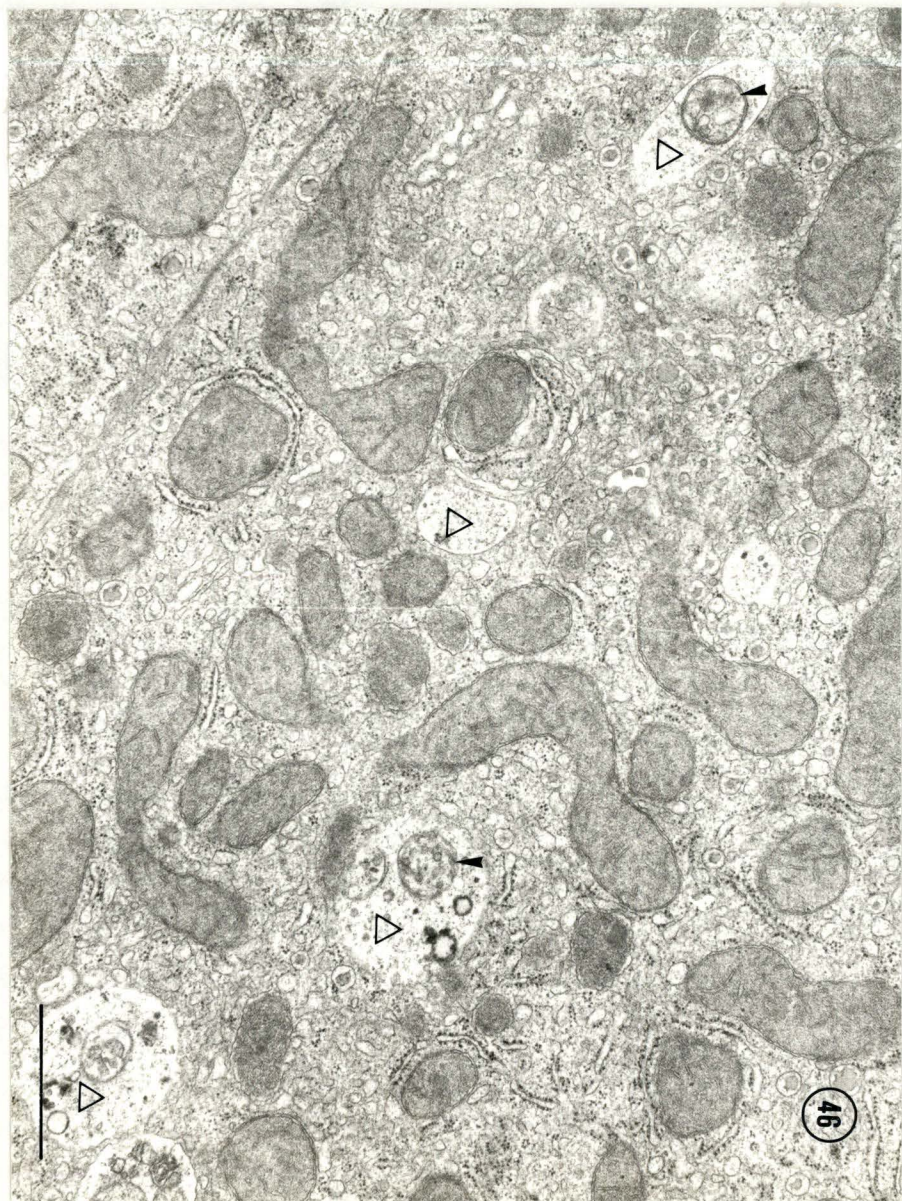


PLANCHE XXV

Foie de rats NaCl-DMSO + saccharose 3 heures

Figure 47 : Les vacuoles de saccharose (triangles vides) sont très nombreuses et de très grandes taille. Accompagnées des dictyosomes, elles ont quitté leur position périlibillaire pour se disperser dans le cytoplasme et à proximité du noyau. La flèche indique une fusion entre deux grandes vacuoles claires.

(Gross. 7800 X) (La barre = 1 μm)

Figure 48 : Détail de plusieurs vacuoles de saccharose (triangles vides). Une de ces vacuoles semble en train d'internaliser une vacuole d'autophagie constituée d'un enroulement de réticulum endoplasmique (tête de flèche).

(Gross. 33000 X) (La barre = 0,5 μm)

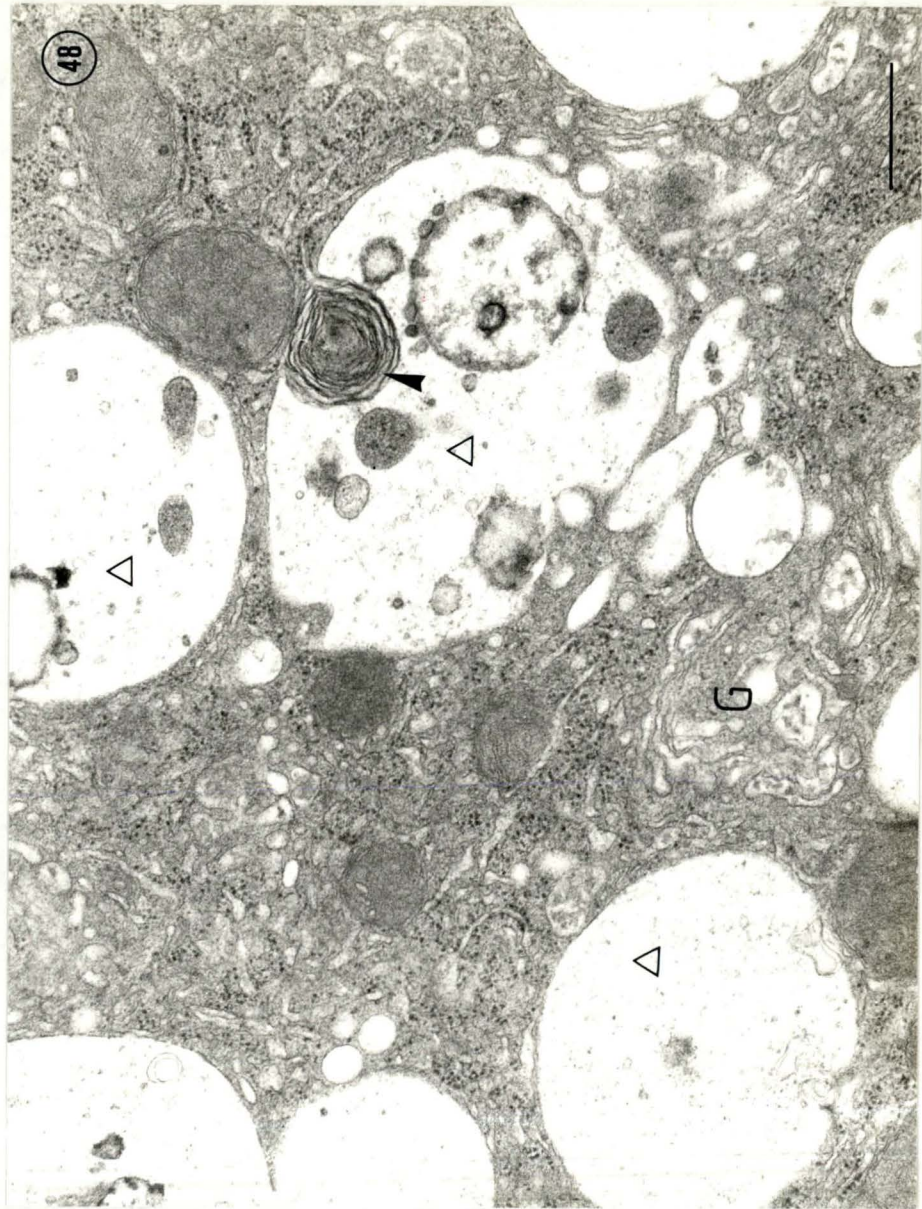
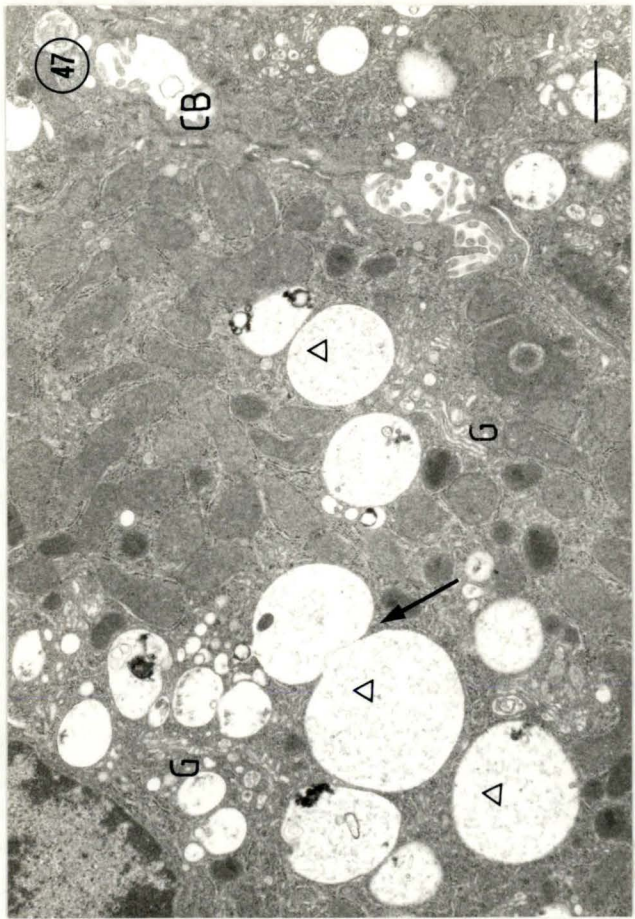


PLANCHE XXVI

Foie de rat cytochalasine (0,038 mg/100g) + saccharose 30 minutes

Figure 49 : A proximité d'un canalicule biliaire légèrement dilaté s'observent un grand nombre de corps denses présentant des inclusions semblables à celles observées dans les corps denses de tous les rats prétraités à la cytochalasine (flèches). Les vacuoles de saccharose (triangles vides), de même que les vacuoles d'autophagie (triangles pleins), sont peu nombreuses sur cette vue.

(Gross. 25200 X) (La barre = 1 μ m)

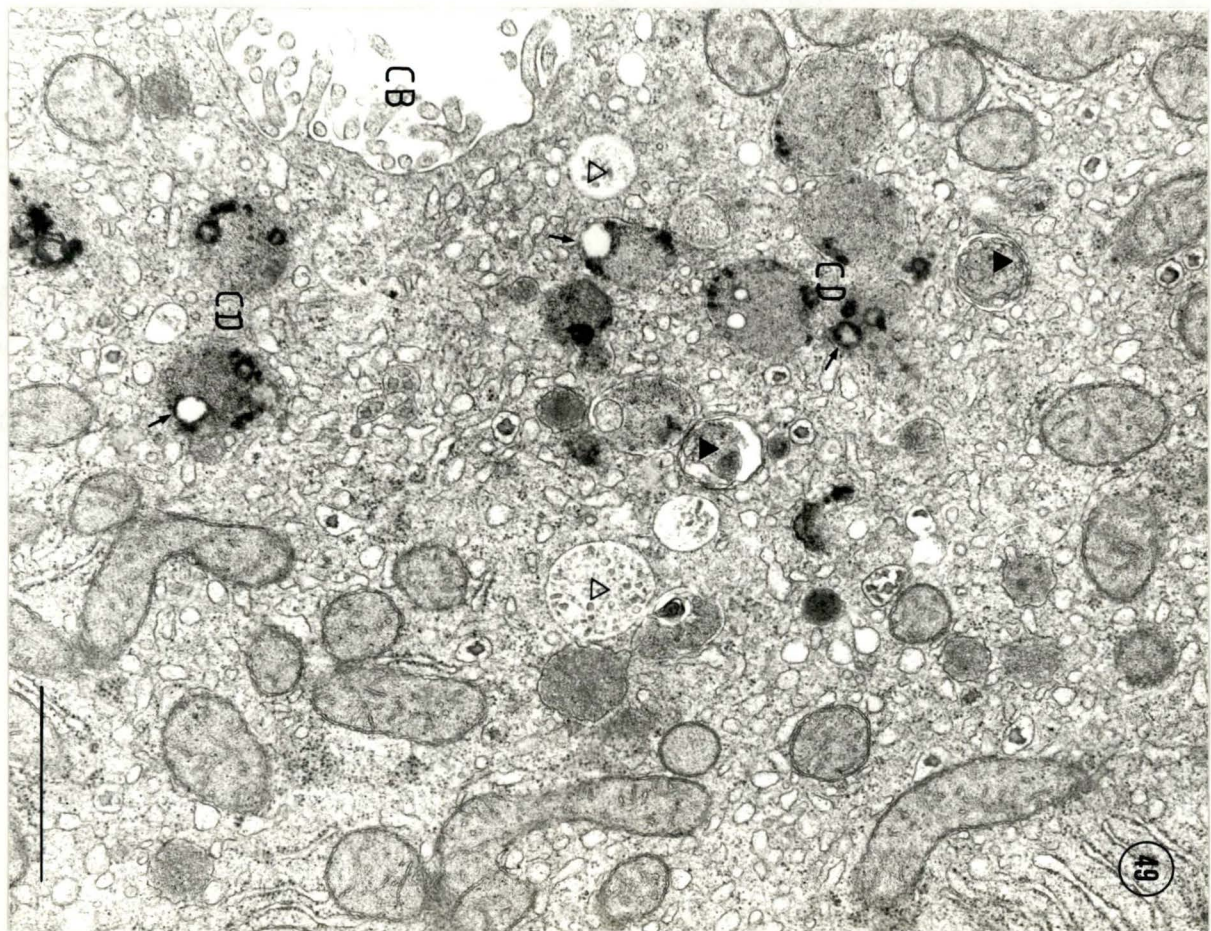


PLANCHE XXVII

Foie de rat cytochalasine (0,038 mg/100g) + saccharose 1 heure

Figures 50 et 51 : A proximité de canalicules biliaires très dilatés, nous observons un grand nombre de corps denses contenant des inclusions claires de taille parfois très importante (flèches). Les vacuoles de saccharose (triangles vides) sont peu nombreuses et d'assez petite taille. (Gross. 19800 X) (La barre = 1 μ m)

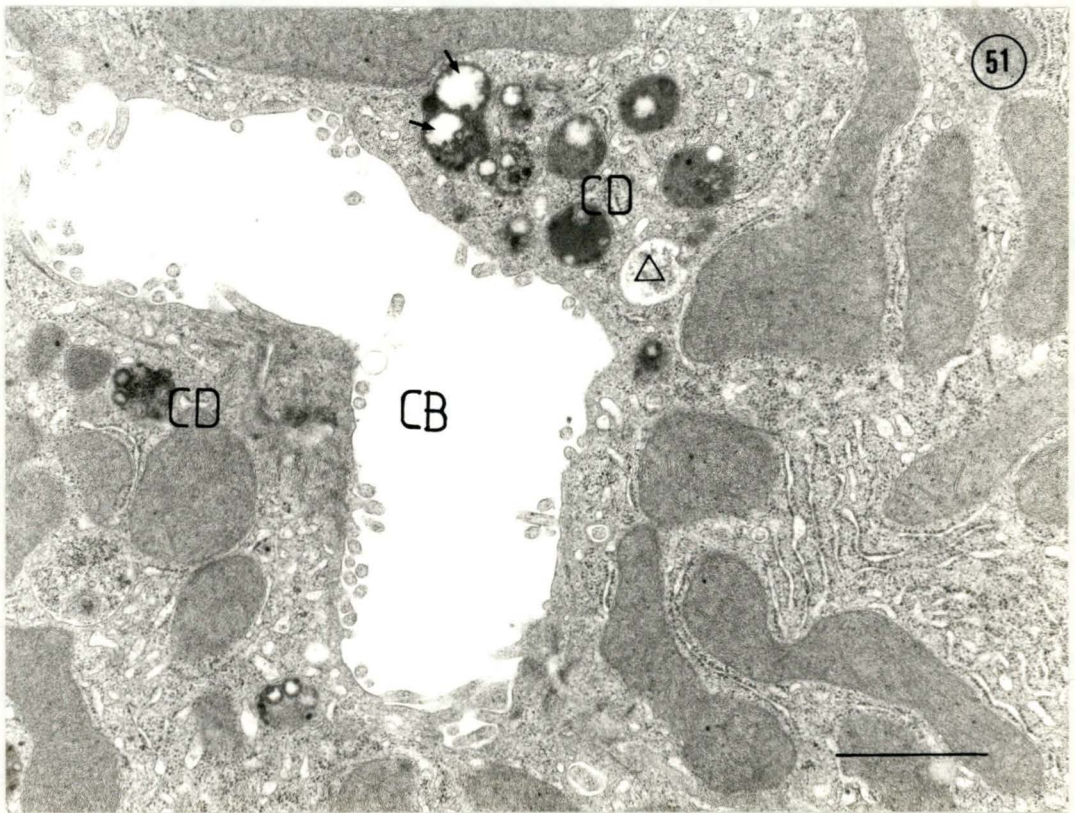
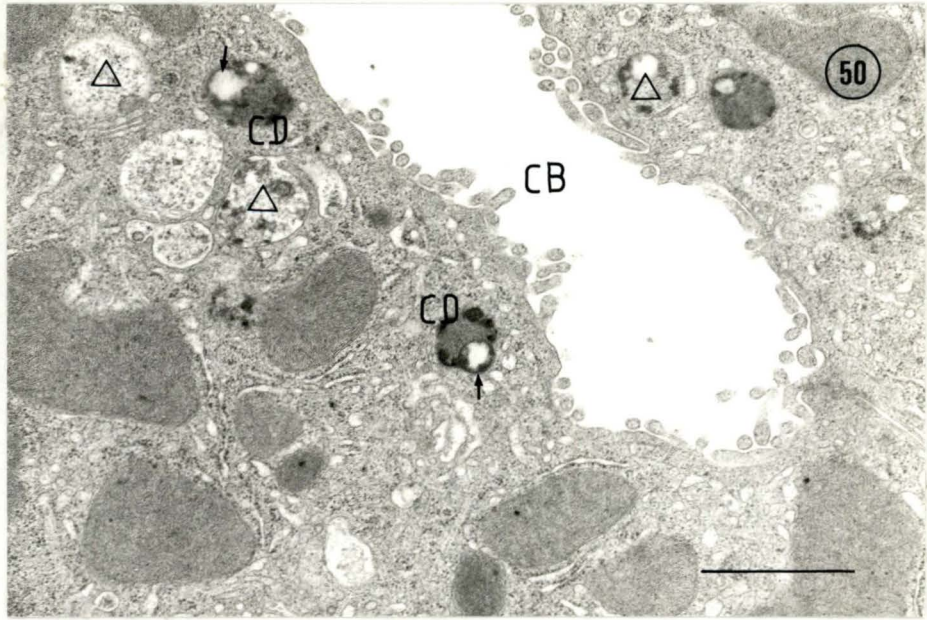


PLANCHE XXVIII

Foie de rats cytochalasine (0,038 mg/100g) + saccharose 3 heures

Figure 52 : Les vacuoles de saccharose sont nombreuses et de grande taille (triangles vides). Elles ont quitté leur position péribiliare et sont dispersées dans le cytoplasme. Le canalicule biliaire est fortement dilaté, sa lumière ne contenant presque plus de microvillosités. L'autophagie est assez abondante (triangles pleins).

(Gross. 12000 X) (La barre = 1 μ m)

Figure 53 : Détail de vacuoles de saccharose (triangles vides). Les deux flèches indiquent des fusions entre des vacuoles de saccharose et des vacuoles d'autophagie (triangles pleins).

(Gross. 25200 X) (La barre = 1 μ m)

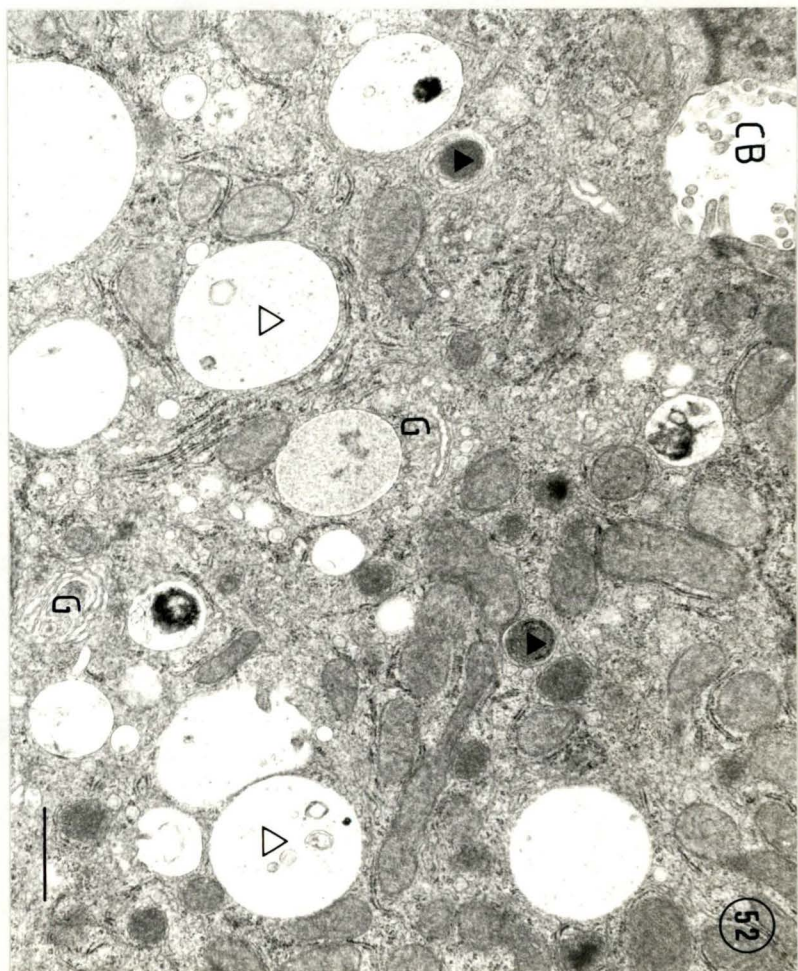


PLANCHE XXIX

Foie de rats cytochalasine (0,038 mg/100g) + saccharose 3 heures

Figure 54 : Sur cette vue à fort grossissement, nous pouvons observer, à proximité d'un noyau, plusieurs vacuoles de saccharose (triangles vides) de grande taille), accompagnées de dictyosomes de l'appareil de Golgi et d'une vacuole d'autophagie (triangle plein).
(Gross. 33000 X) (La barre = 0,5 μm)

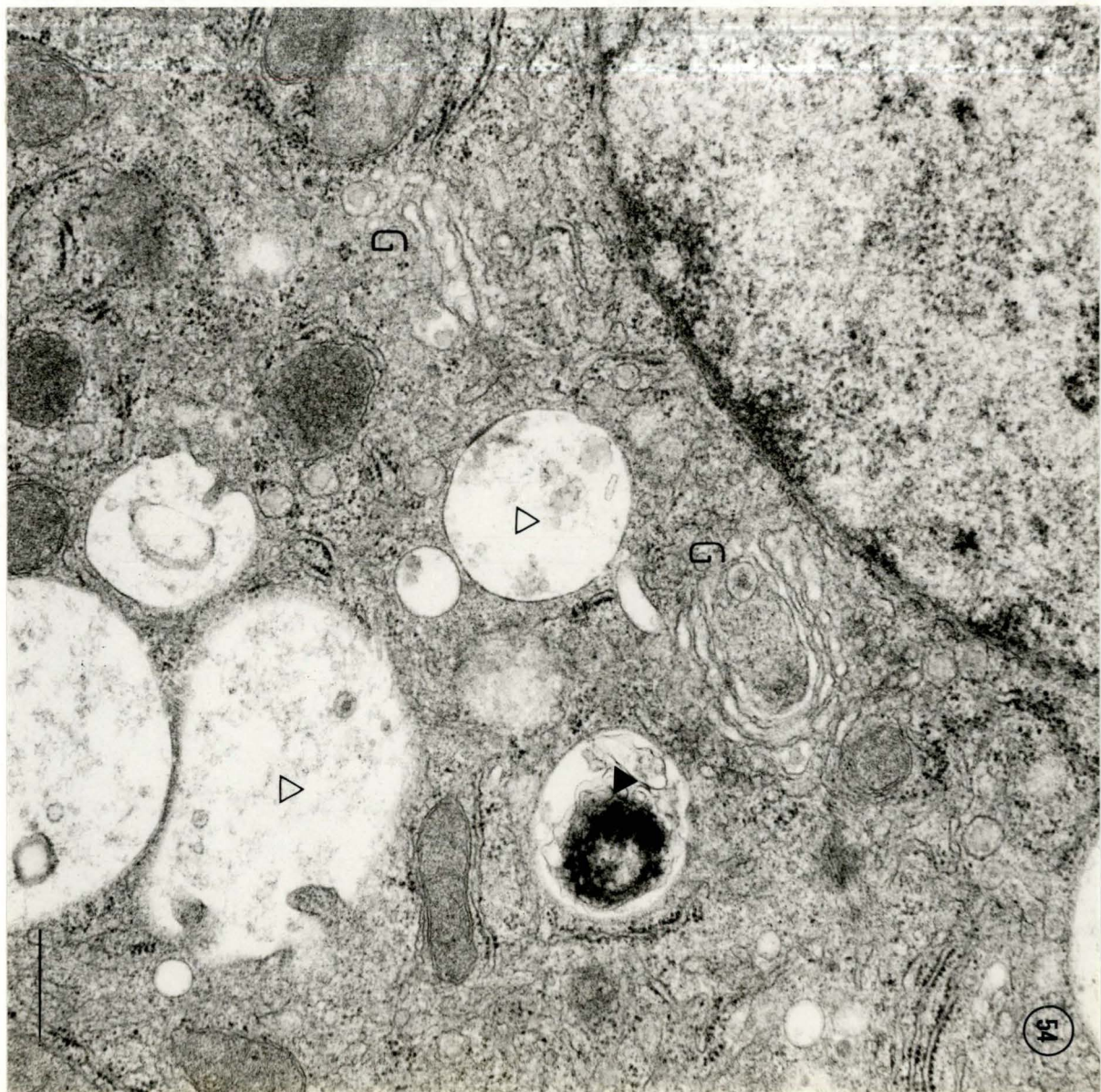


PLANCHE XXX

Marquage cytochimique de la phosphatase acide

Figure 55 : Rat témoin NaCl-DMSO

Quelques corps denses marqués par la réaction de Gomori bordent un canalicule biliaire d'aspect normal.

(Gross. 19800 X) (La barre = 1 μm)

Figure 56 : Rat cytochalasine (0,038 mg/100g)

Le marquage de ces corps denses apparaît moins intense que celui observé chez le rat témoin. Les inclusions claires que contiennent ces corps denses ne présentent pas de précipité de phosphate de plomb (têtes de flèches).

(Gross. 33000 X) (La barre = 0,5 μm)

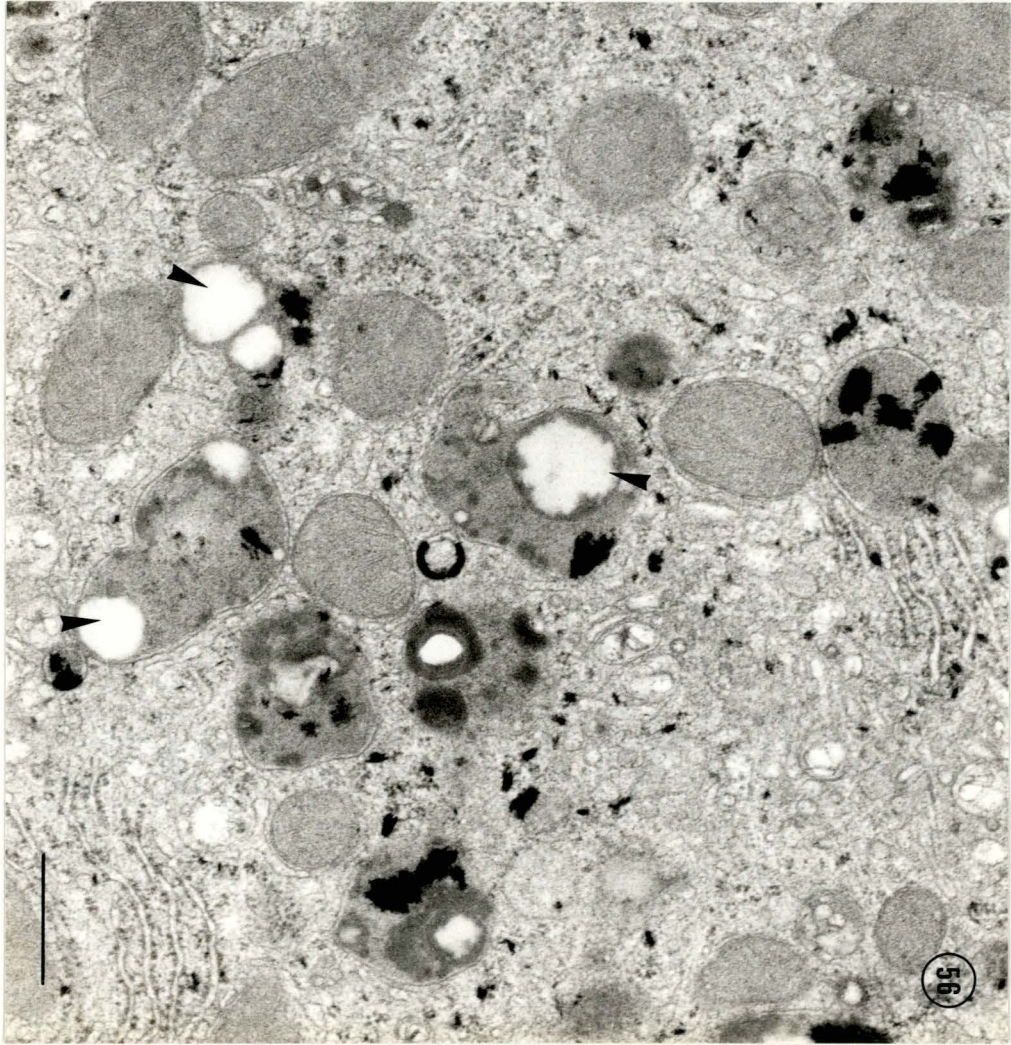


PLANCHE XXXI

Marquage cytochimique de la phosphatase acide

Figure 57 : Rat NaCl-DMSO + saccharose 2 heures

Le marquage, situé principalement au niveau des vacuoles de saccharose (triangles vides), apparaît encore peu intense.

(Gross. 14250 X) (La barre = 1 μ m)

Figure 58 : Rat NaCl-DMSO + saccharose 3 heures

Les vacuoles de saccharose (triangle vide) présentent un marquage plus intense qu'après 2 heures de traitement au saccharose, et contiennent beaucoup plus de figures myéliniques (têtes de flèches).

(Gross. 12000 X) (La barre = 1 μ m)

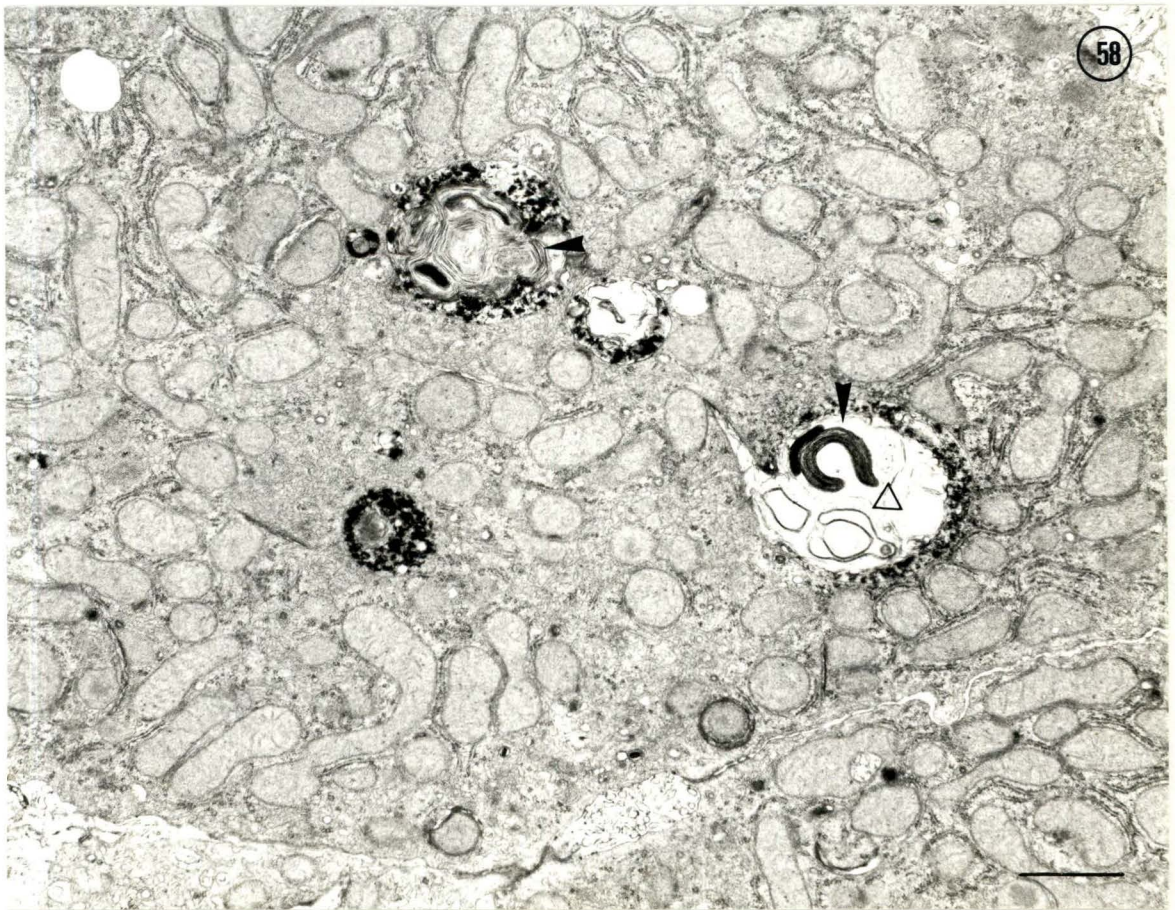
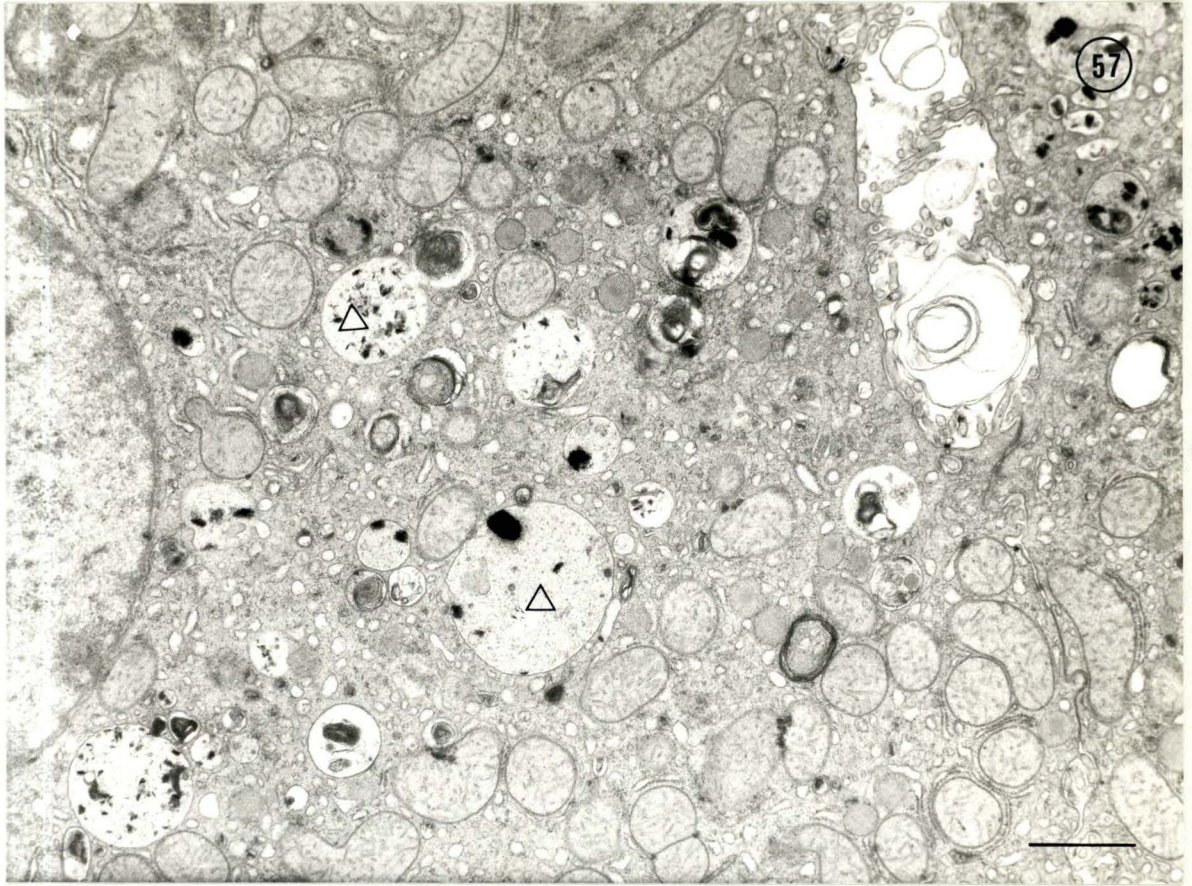


PLANCHE XXXII

Marquage cytochimique de la phosphatase acide

Figure 59 : Rat cytochalasine (0,038 mg/100g) + saccharose 2 heures

Le marquage se retrouve au niveau des vacuoles de saccharose (triangles vides), mais également au niveau de corps denses non dilatés (têtes de flèches) bordant un canaliculaire fortement dilaté.

(Gross. 7800 X) (La barre = 1 μ m)

Figure 60 : Rat cytochalasine (0,038 mg/100g) + saccharose 3 heures

Les seules structures marquées sont les vacuoles de saccharose (triangle vide). Celles-ci contiennent plus de structures myéliniques qu'après 2 heures de traitement au saccharose (têtes de flèches).

(Gross. 15600 X) (La barre = 1 μ m)

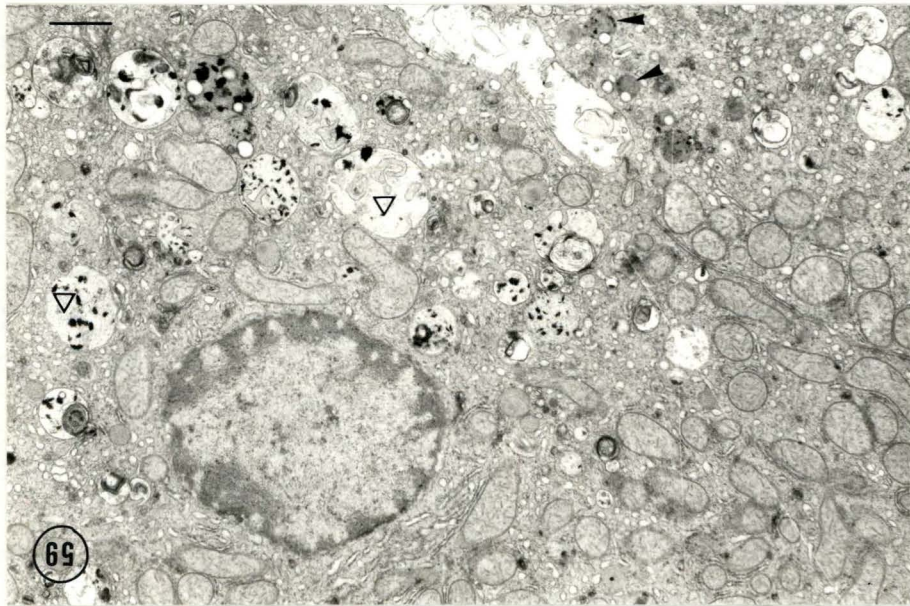
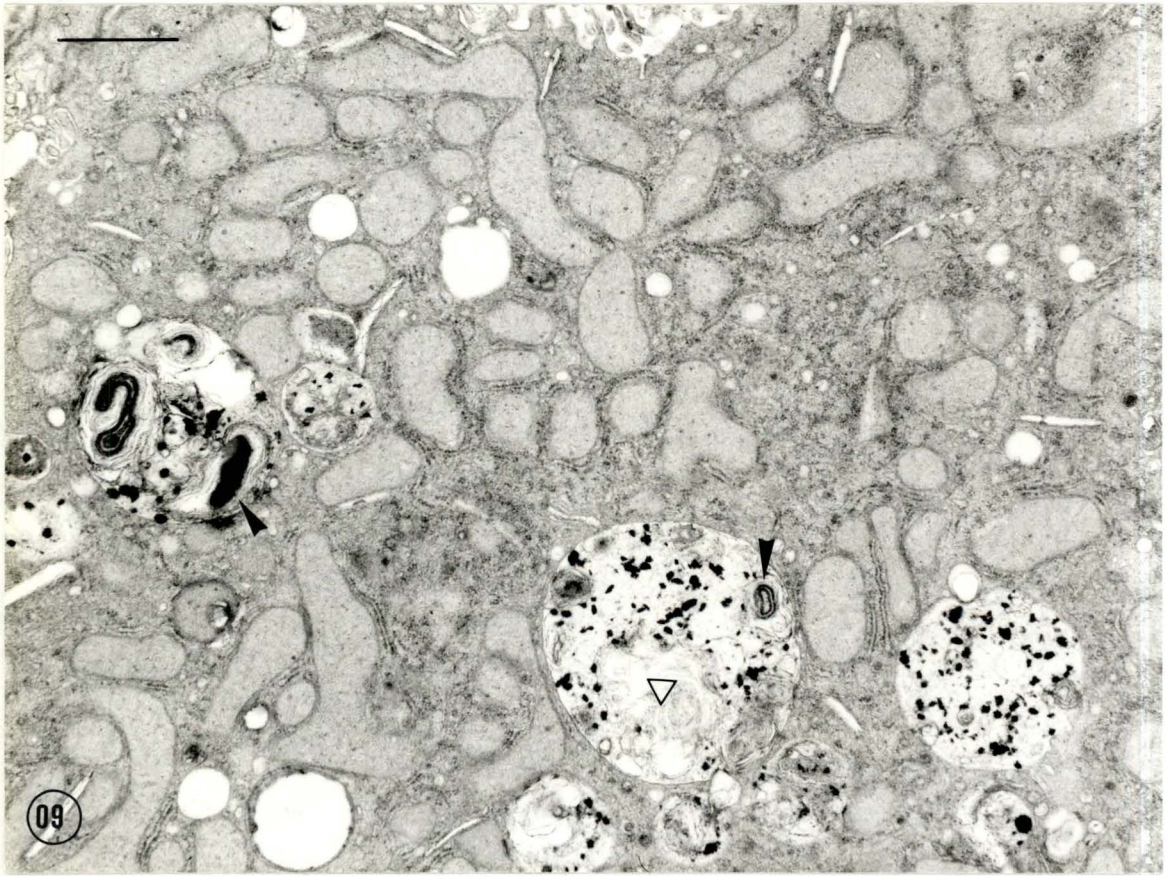


PLANCHE XXXIII

Foies perfusés témoins

Figure 61 : Nous observons, en périphérie de ces hépatocytes, un grand nombre de vacuoles claires (têtes de flèches), de taille moyenne, qui présentent un aspect fortement différent des gouttelettes lipidiques. Certaines mitochondries sont légèrement dilatées, mais le réticulum endoplasmique rugueux, lui, semble intact. Le canalicule biliaire indiqué par la flèche est presque invisible à ce grossissement.

(Gross. 7800 X) (La barre = 1 μ m)

Figure 62 : Nous retrouvons, pour cet hépatocyte, les mêmes caractéristiques que celles mentionnées à la figure 61. Notons cependant que nous pouvons distinguer, dans ce cas-ci, un dictyosome à proximité du noyau.

La chromatine nucléaire semble s'être condensée en périphérie du noyau et autour du nucléole.

(Gross. 7800 X) (La barre = 1 μ m)

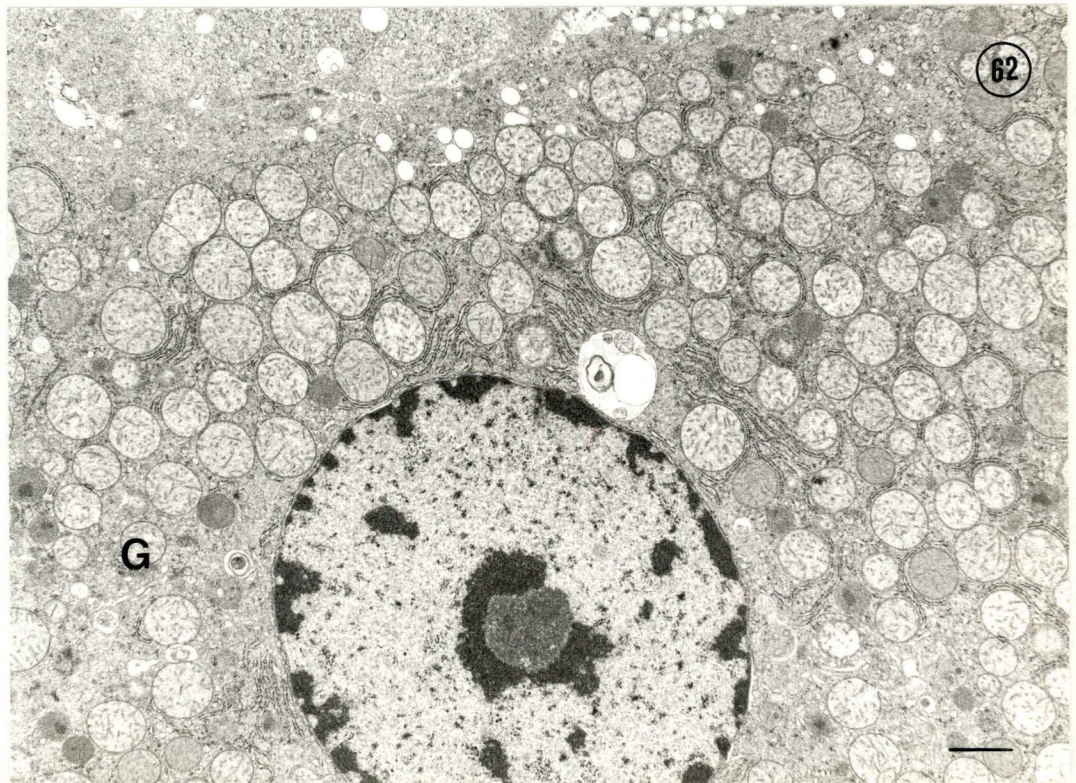
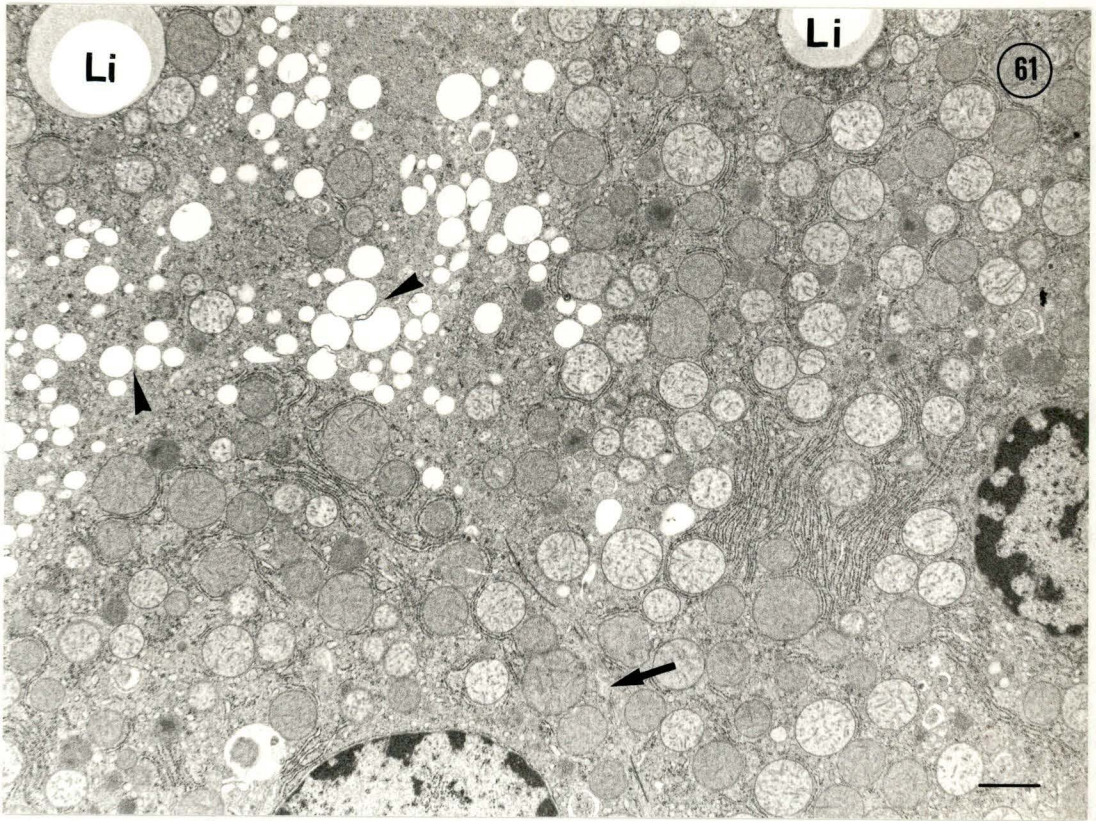


PLANCHE XXXIV

Foies perfusés témoins

Figure 63 : Autour d'un canalicule biliaire fortement altéré (flèche), nous observons de nombreux peroxyosomes et un corps dense contenant des inclusions d'aspect lipidique (tête de flèche). Le réticulum endoplasmique rugueux, dilaté, semble s'être fragmenté en de nombreuses petites vésicules sur la membrane desquelles nous observons fréquemment des ribosomes.
(Gross. 19800 X) (La barre = 1 μ m)

Figure 64 : Nous observons à nouveau, sur cette vue, la dilatation du réticulum endoplasmique et sa fragmentation en vésicules (tête de flèche). La citerne périnucléaire apparaît également dilatée (flèches).
(Gross. 19800 X) (La barre = 1 μ m)

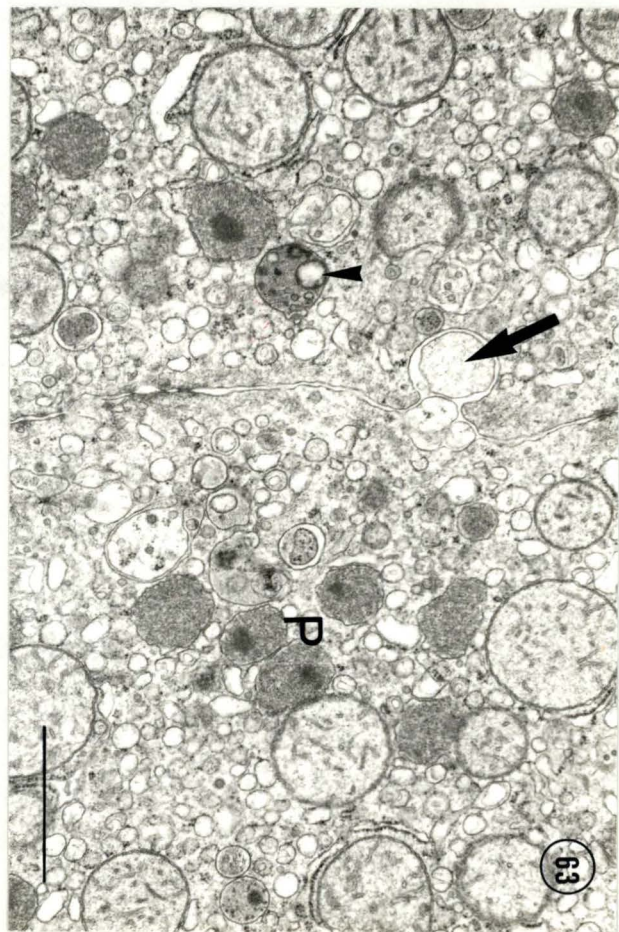
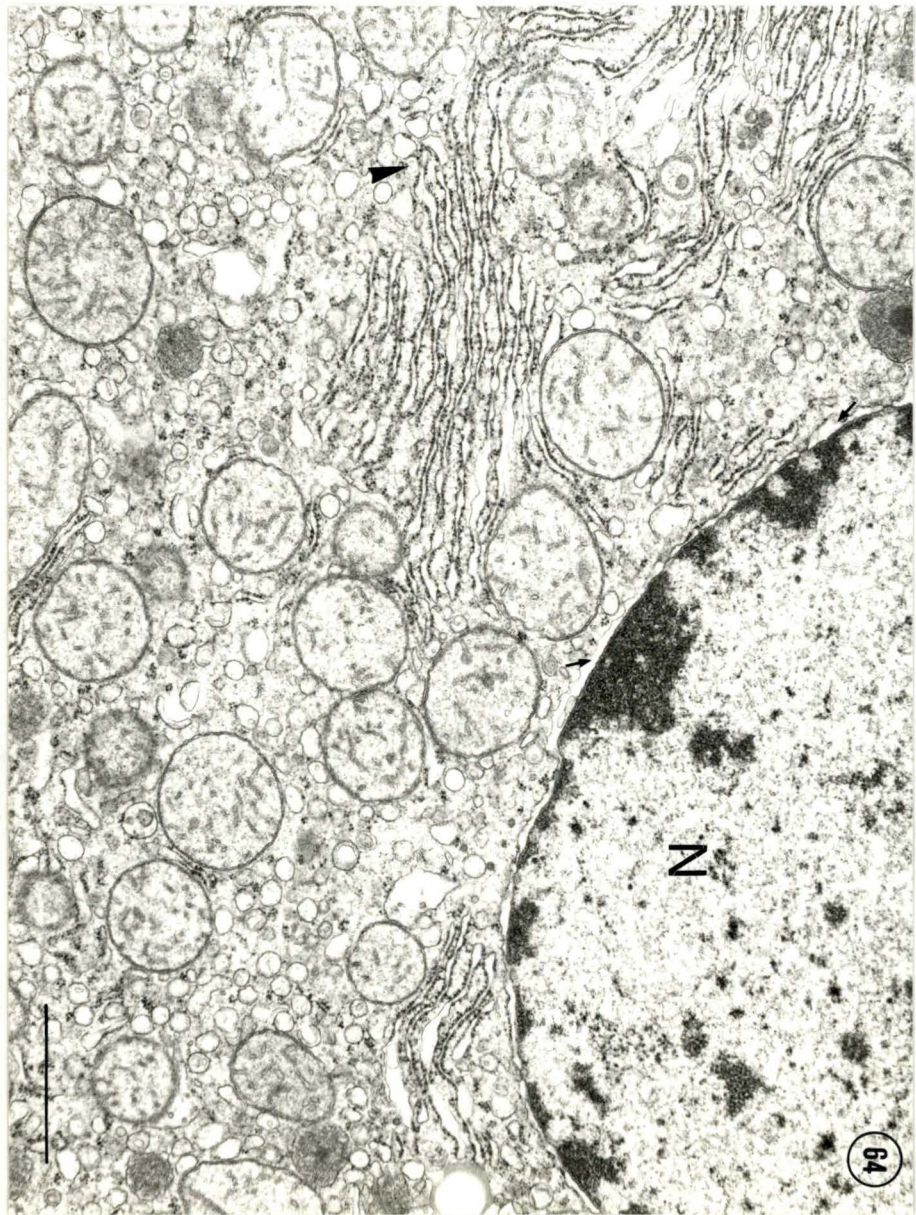


PLANCHE XXXV

Foies perfusés traités au saccharose 0,12 M pendant 2 heures

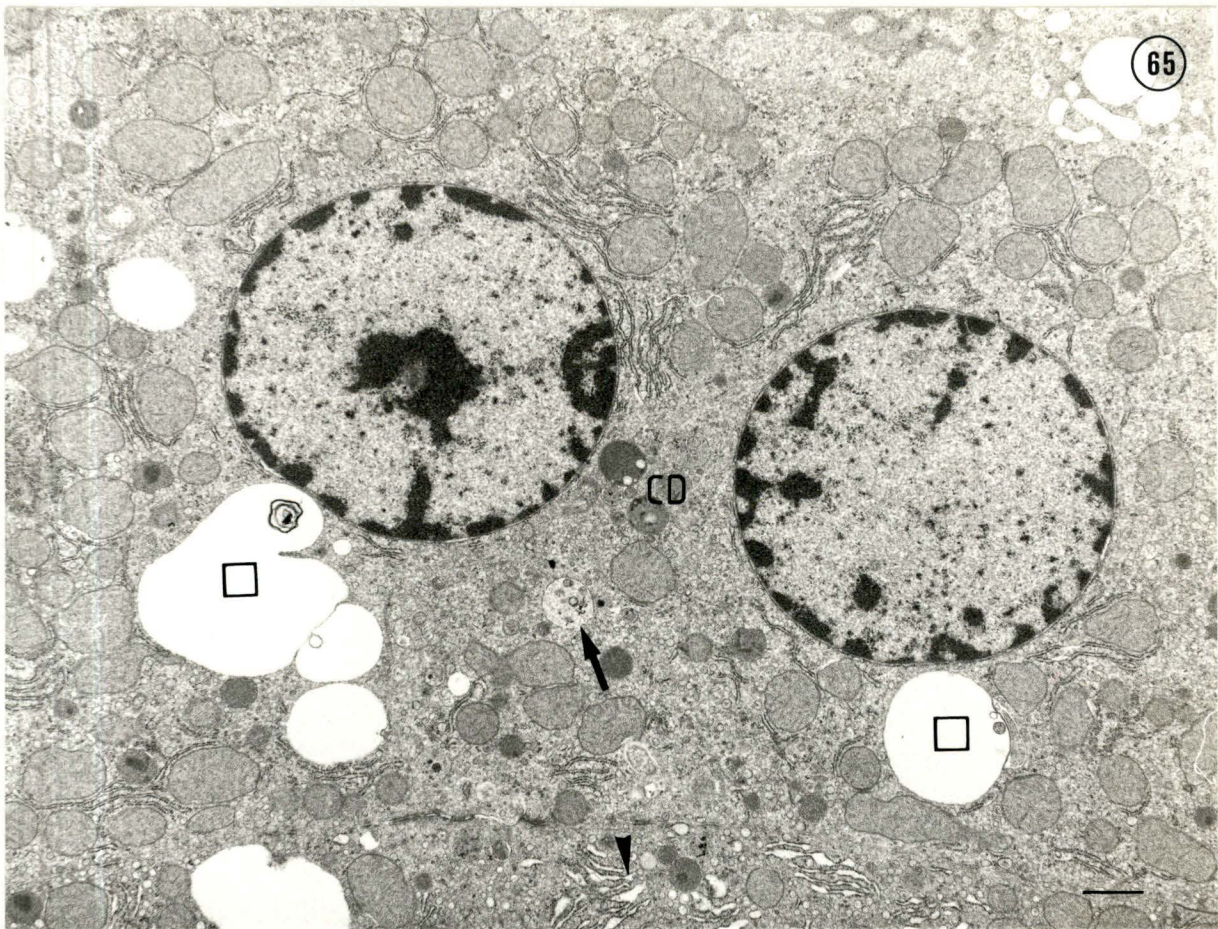
Figure 65 : Sur cette vue à faible grossissement, nous observons, à proximité des noyaux, de grandes vacuoles (carrés vides) différentes des vacuoles de saccharose que nous avons décrites *in vivo*. Outre ces vacuoles, nous observons quelques corps denses présentant une matrice plus claire que les corps denses habituels. La flèche indique un lysosome qui présente un aspect fort semblable à celui des vacuoles de saccharose. Alors que le réticulum endoplasmique de ces hépatocytes apparaît non dilaté, remarquons qu'un hépatocyte voisin, au contraire, présente un réticulum fortement dilaté (tête de flèche).

(Gross. 7800 X) (La barre = 1 μ m)

Figure 66 : Cette vue à fort grossissement montre, à proximité d'un dictyosome de l'appareil de Golgi fortement modifié, plusieurs lysosomes d'aspect très clair (têtes de flèches). Les flèches indiquent des vésicules à la membrane desquelles sont attachés des ribosomes.

(Gross. 33000 X) (La barre = 0,5 μ m)

65



66

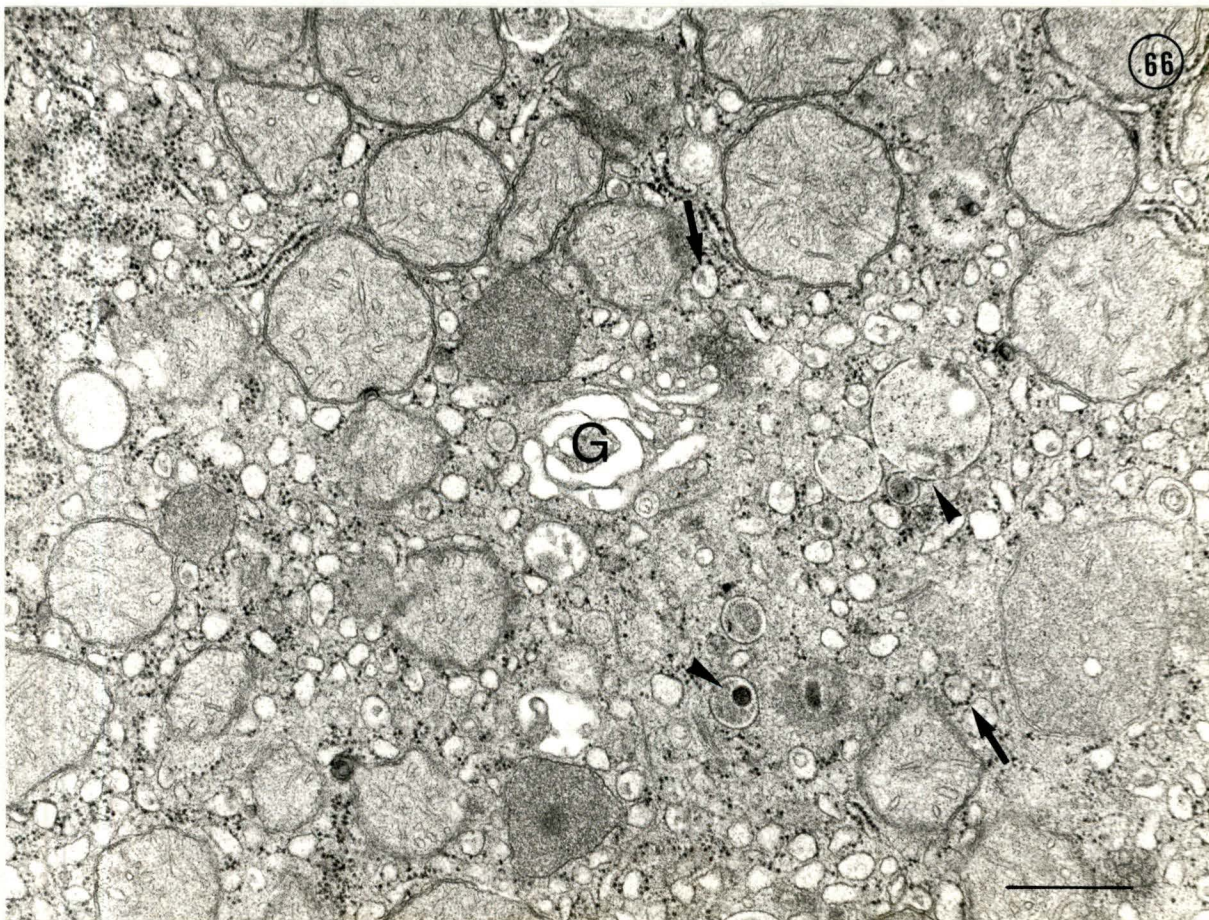


PLANCHE XXXVI

Foies perfusés traités au saccharose 0,12 M pendant 2 heures

Figure 67 : A proximité d'un canalicule biliaire d'aspect normal, nous observons un corps dense, une vacuole d'autophagie (triangle plein), un dictyosome fortement modifié, ainsi que des vacuoles claires (carrés pleins) d'aspect assez différent des vacuoles de saccharose que nous avons observé dans les hépatocytes in vivo. Le réticulum endoplasmique rugueux, dilaté, semble à nouveau s'être fragmenté.

Nous pouvons observer également, sur cette vue, plusieurs microtubules intacts (têtes de flèches).

(Gross. 25200 X) (La barre = 1 μ m)

Figure 68 : Détail de la figure 65 où nous observons, à proximité d'un noyau, plusieurs lysosomes dont certains contiennent des inclusions d'aspect lipidique (têtes de flèches). Un de ces lysosomes, plus clair que les autres, montre des interruptions de sa membrane limitante (flèches).

(Gross. 25200 X) (La barre = 1 μ m)

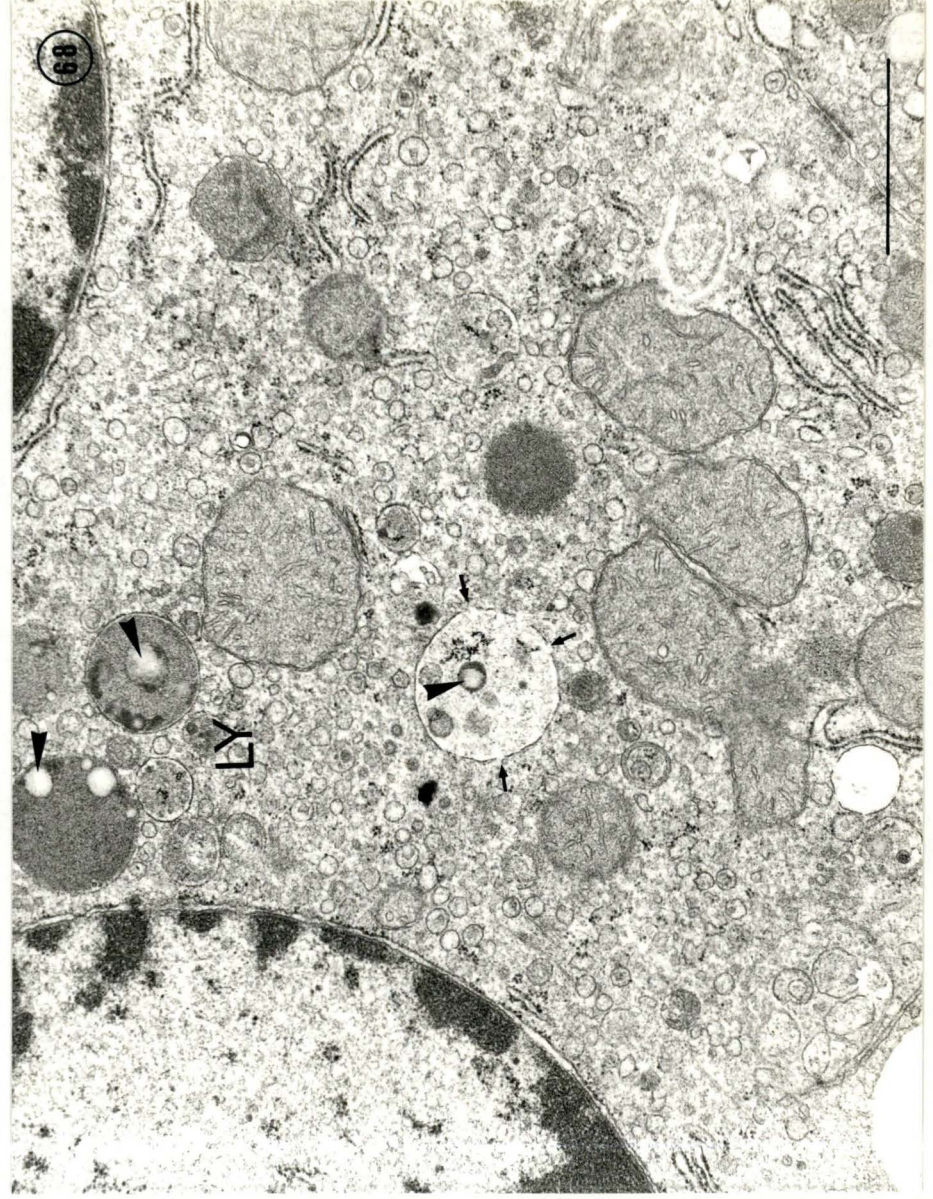
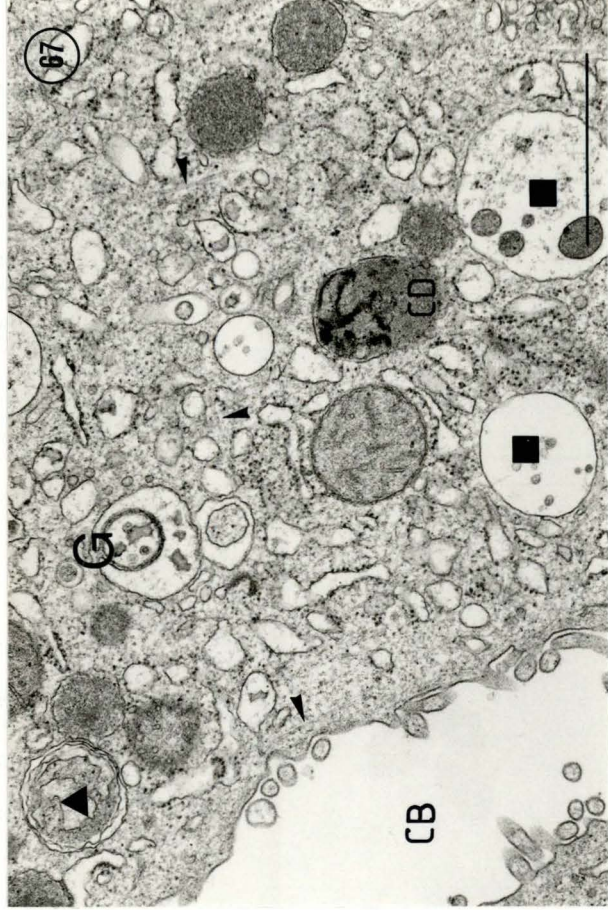


PLANCHE XXXVII

Foie perfusé traité au saccharose 0,08 M pendant 2 heures

Figure 69 : Aux abords d'un noyau, nous observons plusieurs corps denses contenant des inclusions lipidiques (têtes de flèches) dont nous distinguons très bien ici le halo caractéristique. Le réticulum endoplasmique rugueux est fortement dilaté (flèches), ainsi d'ailleurs que la citerne périnucléaire.

(Gross. 33000 X) (La barre = 0,5 μm)

Figure 70 : En bordure d'un canalicule biliaire d'aspect normal, nous remarquons un corps dense, un peroxydase, une structure qui pourrait être un dictyosome de l'appareil de Golgi (triangle plein), et du réticulum endoplasmique rugueux fortement dilaté, de même que la citerne périnucléaire (flèches). Les mitochondries présentent, ici, un aspect tout à fait normal.

(Gross. 33000 X) (La barre = 0,5 μm)

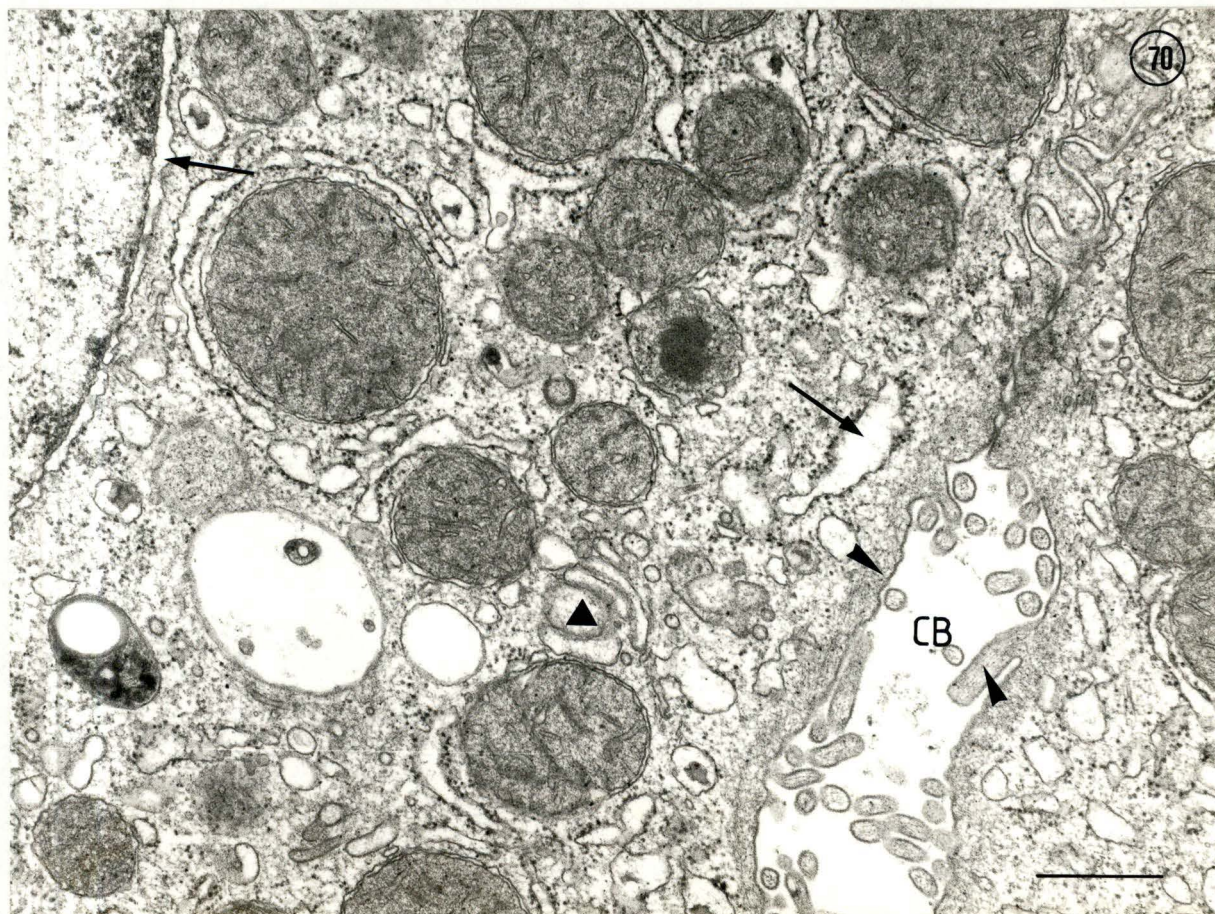


PLANCHE XXXVIII

Marquage cytochimique de la phosphatase acide

Foie perfusé traité pendant 2 heures au saccharose 0,08 M

Figures 71 et 72 : Les seules structures positives au marquage sont les corps denses que nous avons décrits à la figure 69.

(Gross. 33000 X) (Les barres = 0,5 μ m)

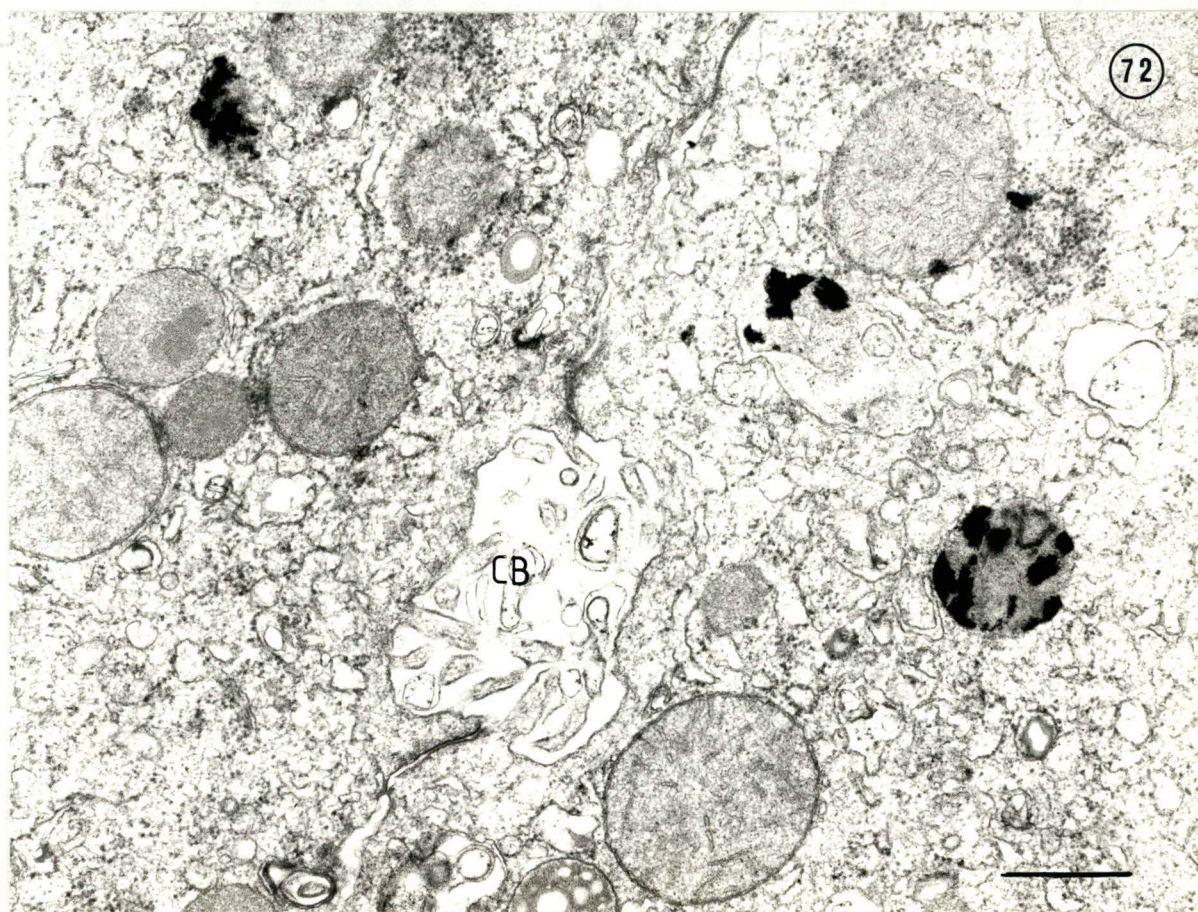
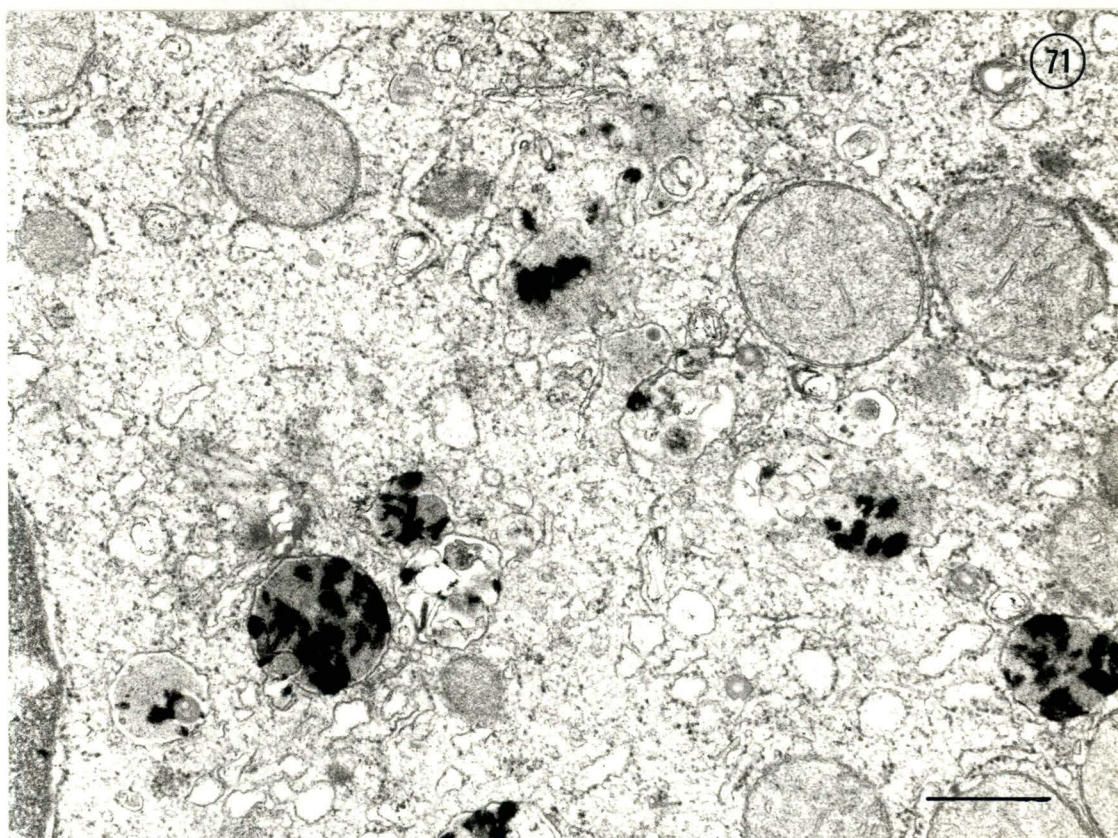


PLANCHE XXXIX

Foie perfusé avec une solution saline tamponnée et traité pendant
2 heures avec du saccharose 0,12 M

Figures 73 et 74 : Ces hépatocytes présentent, au centre de leur cytoplasme, un grand nombre de vacuoles dont certaines ressemblent à celles induites par le traitement au saccharose in vivo (triangles vides). Nous observons, dans certaines de ces vacuoles, ainsi que dans quelques corps denses non dilatés, des inclusions lipidiques (têtes de flèches). Les vacuoles d'autophagie sont très nombreuses (triangles pleins). Des dictyosomes de l'appareil de Golgi, bien développés, sont dispersés parmi ces vacuoles. Les mitochondries, ainsi que le réticulum endoplasmique, apparaissent non dilatés.

(Gross. 19800 X) (Les barres = 1 μ m)

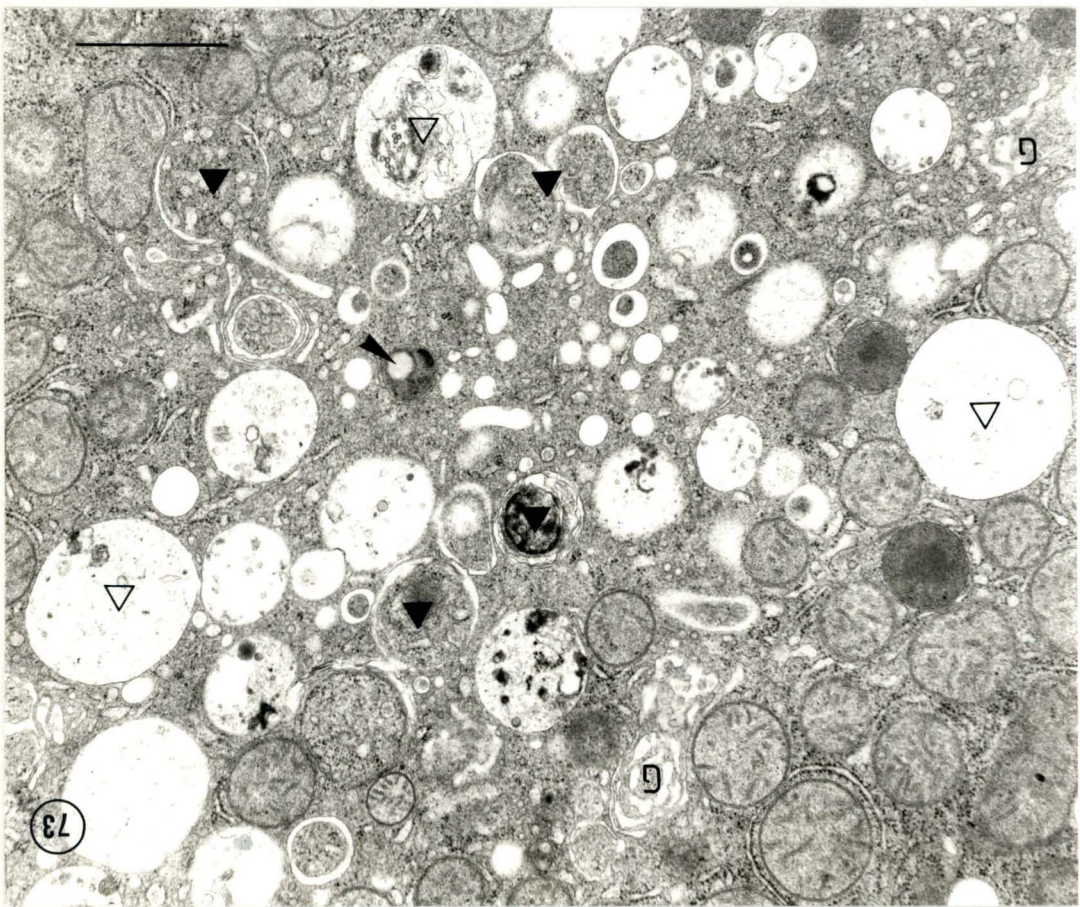
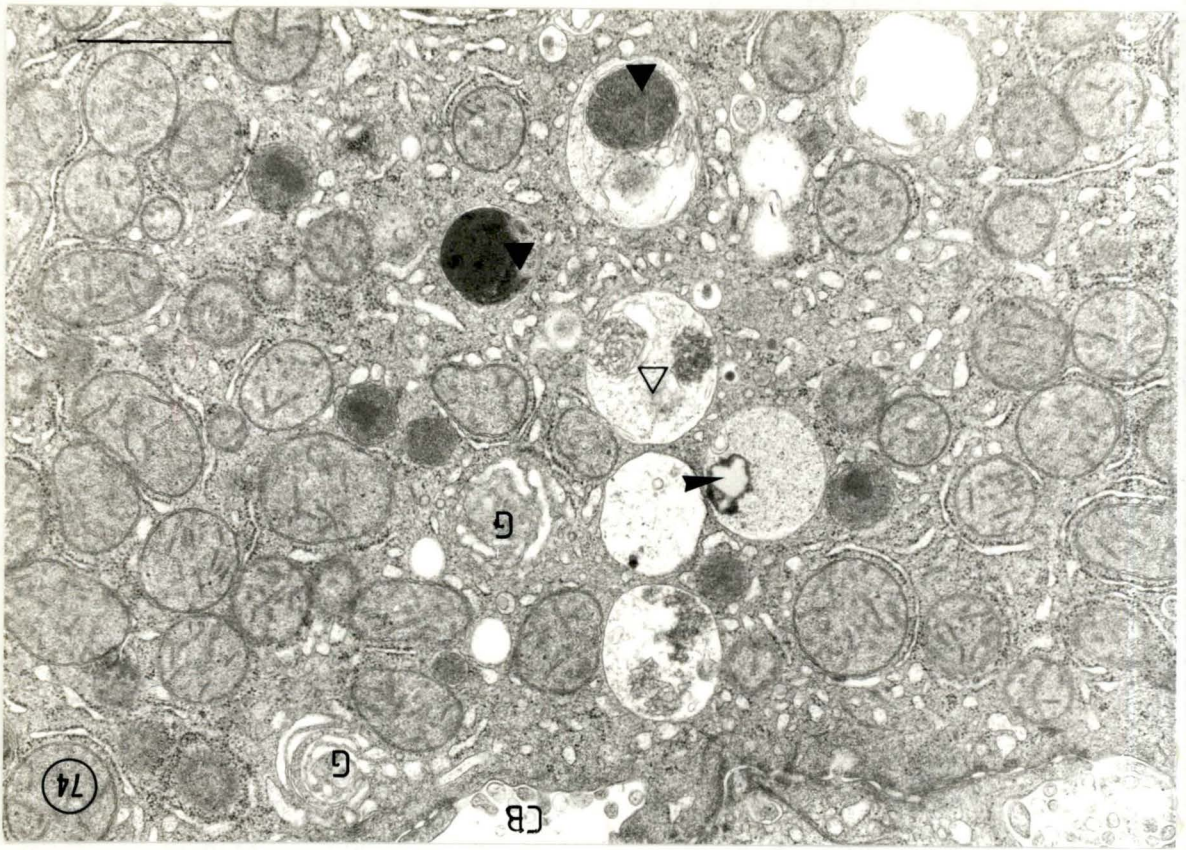


PLANCHE XL

Marquage cytochimique de la phosphatase acide

Foie perfusé avec une solution saline tamponnée et traité pendant
2 heures avec du saccharose 0,12 M

Figure 75 : A ce grossissement, seules les vacuoles claires
apparaissent marquées.

(Gross. 7800 X) (La barre = 1 μm)

Figure 76 : Un corps dense et plusieurs vacuoles claires sont
positives au marquage. Certaines de ces vacuoles
contiennent des organelles en voie de digestion
et ressemblent aux vacuoles de saccharose que nous
avons observées in vivo.

(Gross. 33000 X) (La barre = 0,5 μm)