



## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Effets sur les membranes subcellulaires de la désipramine, de l'imipramines et de la méthylimipramine

Maldague, Marie-Paule

*Award date:*  
1977

*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.

EFFETS SUR LES MEMBRANES SUBCELLULAIRES  
DE LA DESIPRAMINE, DE L'IMIPRAMINE ET DE  
LA METHYLIMIPRAMINE.

PMB7 / 1977/4

MALDAGUE Marie-Paule

1976-1977

Je voudrais d'abord, exprimer toute ma gratitude à Monsieur le Docteur Wattiaux qui a inspiré ces recherches et qui m'a accordé le privilège de travailler dans son laboratoire.

Ma reconnaissance va aussi à Madame Wattiaux pour son aide inestimable, ses suggestions et tous ses encouragements prodigués au cours de ce travail.

J'ai pu aussi apprécier à maintes reprises les conseils et la constante disponibilité de Monsieur Dubois.

Je remercie également Madame Boutefeu qui a assuré avec beaucoup de dévouement la dactylographie de ce mémoire.

Je remercie tous ceux qui, par des discussions auxquelles ils se sont prêtés ou par leurs remarques m'ont aidée dans la réalisation de ce travail.

## Table des matières

Introduction.

### Chapitre I - Matériel et Méthodes

- 1.1. Préparation de la fraction contenant les structures subcellulaires à étudier.
- 1.2. Aspect général des traitements subis par les membranes et des méthodes de mesures.
- 1.3. Mesures enzymatiques
  - 1.3.1. Enzymes latents des mitochondries
  - 1.3.2. Enzyme latent des lysosomes
  - 1.3.3. Enzyme latent des peroxysomes
- 1.4. Activation des différents granules
  - 1.4.1. Activation thermique des mitochondries
  - 1.4.2. Activation thermique des lysosomes
  - 1.4.3. Activation thermique des peroxysomes
  - 1.4.4. Autres moyens d'activation

Chapitre II - Activation des mitochondries, des lysosomes et  
des peroxysomes par incubation à 37°C.

- 2.1. Mitochondries
  - 2.1.1. Désipramine
  - 2.1.2. Imipramine
  - 2.1.3. Méthylimipramine
- 2.2. Lysosomes
- 2.3. Peroxysomes
- 2.4. Discussion
  - 2.4.1. Mitochondries
  - 2.4.2. Lysosomes
  - 2.4.3. Peroxysomes

Chapitre III - Détérioration des mitochondries par centrifuga-  
tion à haute vitesse et par compression. Effet  
de l'imipramine, la désipramine et la méthylimi-  
pramine.

- 3.1. Centrifugation isopycnique
  - 3.1.1. Détails expérimentaux
  - 3.1.2. Effet de la centrifugation.
- 3.2. Effet de la compression
- 3.3. Discussion

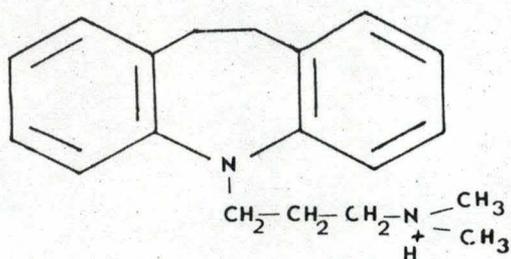
Conclusion

Bibliographie

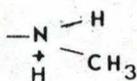
INTRODUCTION

Ce mémoire se propose comme sujet l'étude des effets, sur les membranes subcellulaires, de différentes drogues à savoir l'imipramine, la désipramine et la méthylimipramine.

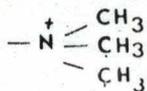
Ces trois drogues font partie du groupe des dibenzoazépines. Ces molécules présentent la structure suivante:



Imipramine



Désipramine



Méthylimipramine

Ces trois substances se distinguent donc les unes des autres par le nombre de méthyles fixés sur le groupement aminé.

L'imipramine est un antidépressant très utilisé en médecine pour traiter un syndrome psychiatrique grave, la dépression; la désipramine est son métabolite principal (les produits diméthylés subissant une déméthylation dans l'organisme), elle est douée d'activités antidépressantes encore plus marquées. Quant à la méthylimipramine, elle est, à notre connaissance, inactive d'un point de vue pharmacologique.

Dans l'état actuel de nos connaissances, nous savons que l'imipramine est antihémolytique à concentration relativement faible (1); elle protège tout comme la désipramine les membranes mitochondriales contre les effets de la pression hydrostatique (2); de plus, ces deux substances se fixent "in vivo" sur les membranes des mitochondries et du réticulum endoplasmique (3). De tels résultats montrent que des interactions doivent s'établir entre ces composés et les membranes biologiques.

Notre travail est une contribution à l'étude de ces interactions. Nous avons étudié l'effet que ces drogues pouvaient avoir sur des processus conduisant à une augmentation de la perméabilité (comprise dans son sens le plus large) des membranes de différents organites, à savoir les mitochondries, les lysosomes, les peroxysomes.

CHAPITRE I. MATERIEL ET METHODES

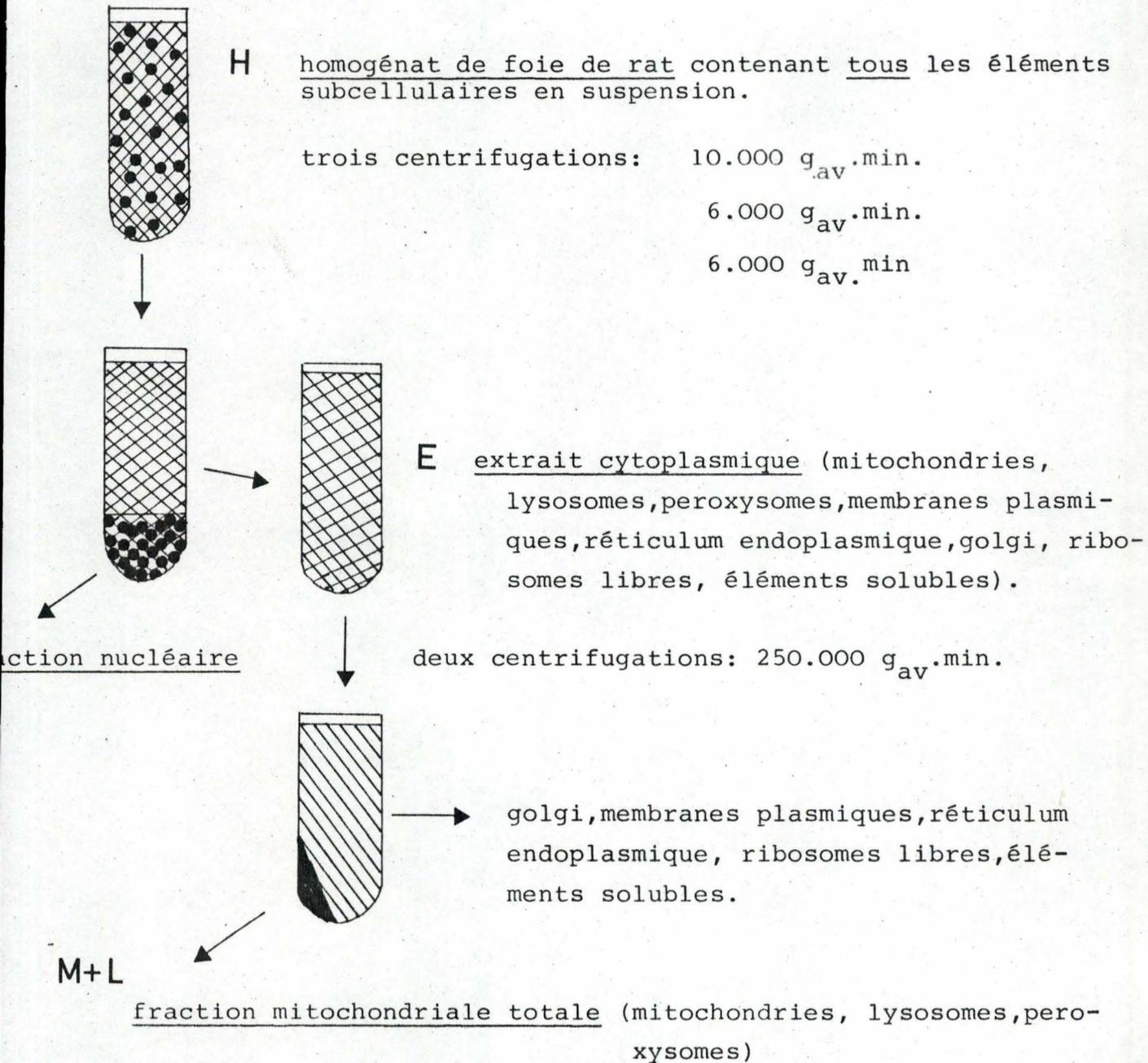
1.1. Préparation de la fraction contenant les structures subcellulaires à étudier.

Toutes nos expériences ont été réalisées sur des fractions mitochondriales totales (M + L) suivant de Duve et al (4) provenant du foie de rat. Il faut noter que cette fraction contient 70 à 80% des mitochondries de l'organe et 50 à 60% des lysosomes et des peroxyosomes. La figure 1 schématise comment s'effectue la préparation d'une telle fraction.

1.2. Aspect général des traitements subis par les membranes, et des méthodes de mesures.

Le but principal de nos expériences est de recher-

Fig. 1. fractionnement d'un homogénat de foie de rat par centrifugations différentielles.



$g_{av}$ .min. est une unité composite qui correspond à  $\int_t^0 g_{av} dt$  où  $t$  est le temps de centrifugation;  $g_{av}$  est le champ moyen existant à une distance radiale  $R_{av} = \frac{1}{2} (R_{max} + R_{min})$  (de Duve et Berthet, 1953) (25)

cher l'effet de certaines substances pharmacologiques sur les membranes d'organites subcellulaires. Pour apprécier l'état des membranes, nous avons procédé à une méthodologie que l'on pourrait résumer comme suit:

a) dans un premier temps, nous soumettons la fraction mitochondriale totale à différents traitements susceptibles de détériorer les membranes. Ces traitements sont de trois types:

- 1) incubation à 37°C pendant des temps croissants.
- 2) centrifugation isopycnique à haute vitesse
- 3) compression dans une presse hydraulique.

Ils sont réalisés soit en présence de la substance à tester, soit en absence (témoin). Ces trois drogues sont utilisées à différentes concentrations, celles-ci pouvant aussi varier d'un test à l'autre.

b) dans un second temps, nous mesurons l'activité libre et totale d'enzymes spécifiques des organites à étudier. Nous allons préciser la signification de ces mesures.

Lorsqu'un enzyme est présent dans une structure subcellulaire, la membrane peut l'empêcher d'avoir accès à un substrat présent dans le milieu extérieur. Ceci montre bien l'importance que peut prendre la membrane d'un organite subcellulaire. L'activité enzymatique ne se manifestera que si

la membrane est "perméabilisée" de sorte que l'enzyme et le substrat puissent se rencontrer. Un tel enzyme est appelé latent (structure linked latency); son activité va dépendre de l'état de la membrane de l'organite qui le contient. Elle sera d'autant plus élevée que le nombre de granules dont la membrane est détériorée, est grand. L'effet d'un traitement sur la membrane d'une particule peut donc être estimé en mesurant l'activité d'enzymes latents présents dans cette particule.

Pour de tels enzymes, on distingue deux types d'activité: l'activité libre et l'activité totale. Si on mesure l'activité enzymatique de granules incubés pendant un temps très court, on observera une activité très faible: l'activité libre. Elle est donc mesurée dans des conditions capables de maintenir l'état de la membrane, perturbée éventuellement par le traitement dont on veut déterminer l'effet. Lorsque les granules sont soumis à un traitement altérant la membrane, alors l'activité enzymatique est très élevée: c'est l'activité totale; l'enzyme est totalement accessible à son substrat; on la mesure sur des granules dont on a sciemment détérioré la membrane, par exemple par l'addition d'un détergent. L'activité libre est d'habitude exprimée en pourcent de l'activité totale. La figure 2 schématise la méthodologie basée sur ces deux types de mesures enzymatiques.

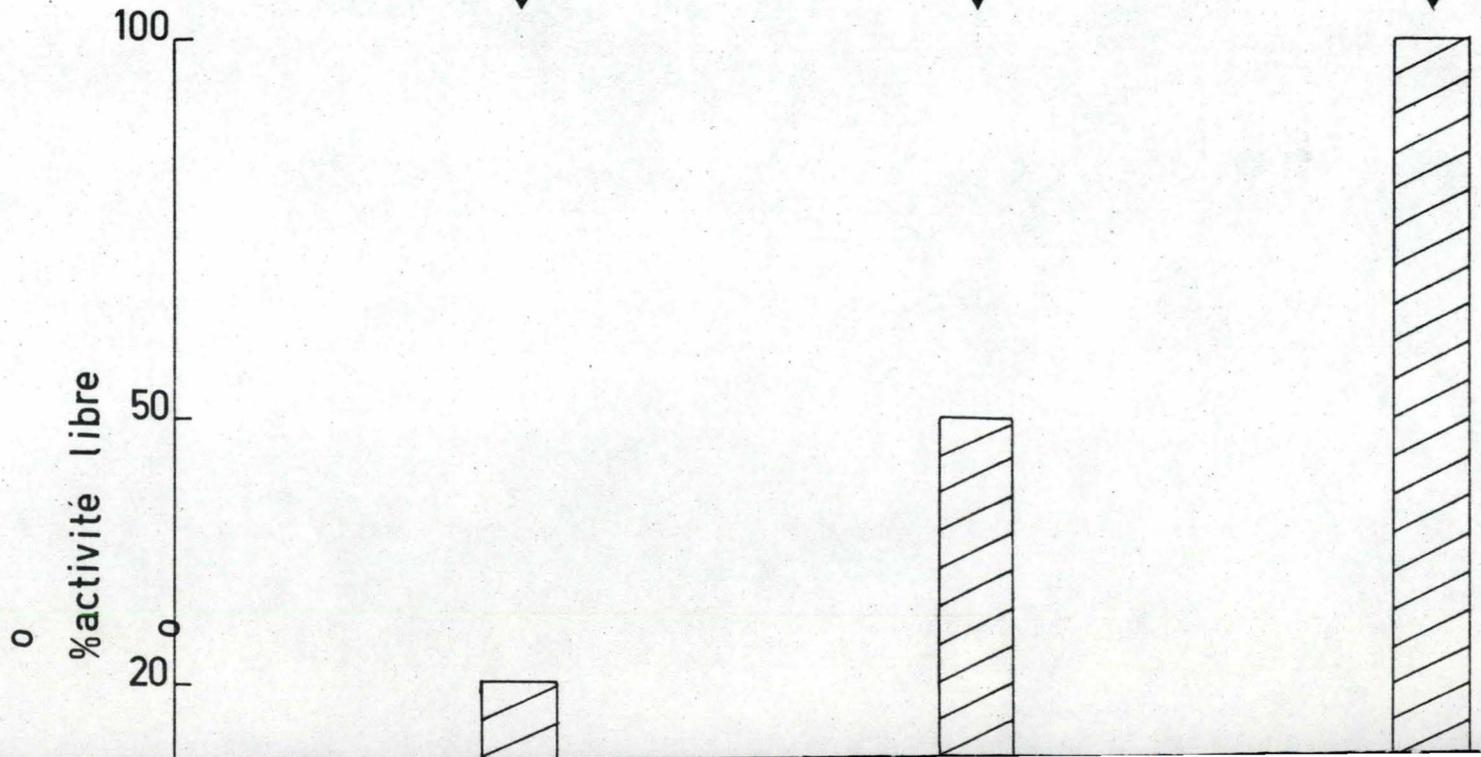
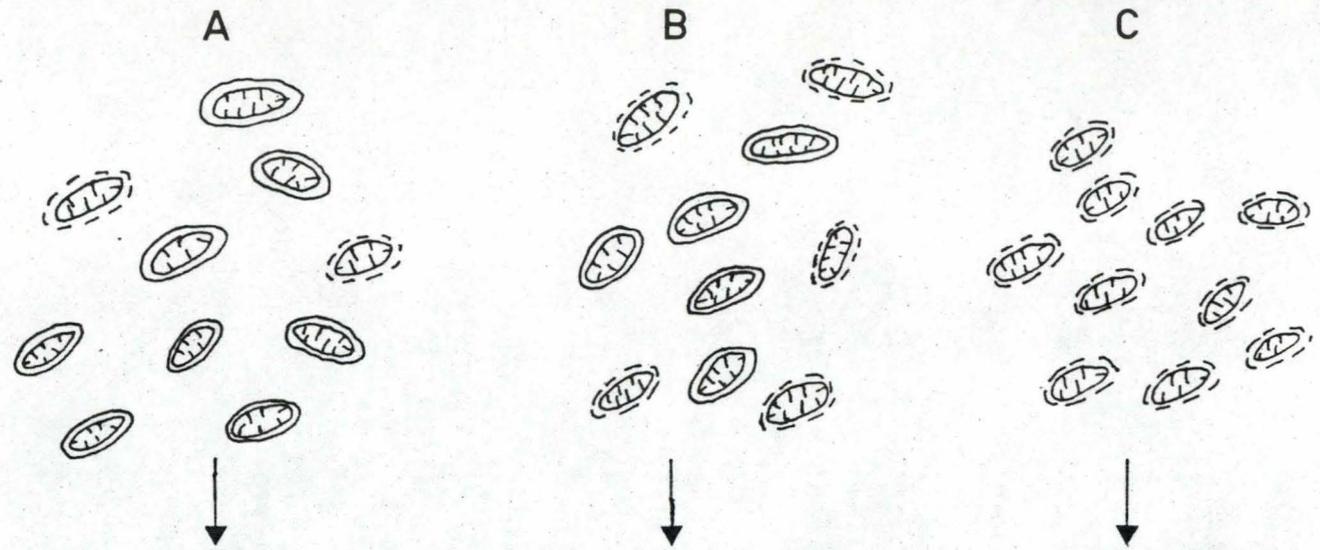


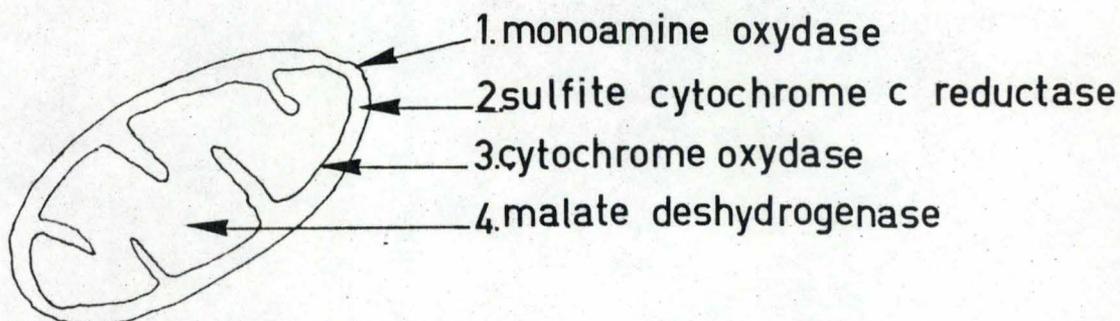
Figure 2: Schéma de la méthodologie utilisée dans la mesure de l'activité libre et de l'activité totale.

- A: deux granules sont activés parmi les dix: l'activité libre sera de 20%.
- B: le nombre de granules activés augmentent.
- C: l'activité enzymatique est très élevée car tous les granules sont activés.

Dans les expériences où nous avons suivi les effets de la vitesse de centrifugation, l'état des granules (mitochondries uniquement) a été estimé en établissant les distributions d'enzymes localisés dans des compartiments sub-mitochondriaux différents. Nous reviendrons sur ce point dans l'exposé des résultats.

### 1.3. Mesures enzymatiques.

#### 1.3.1. Enzymes latents des mitochondries



a) A cause de sa localisation mitochondriale (5), la sulfite cytochrome c réductase, nous renseigne sur l'état de la membrane mitochondriale externe. Le substrat correspondant à cet enzyme est le cytochrome c; dans les conditions normales, la membrane externe est imperméable à ce substrat.

- b) La malate déshydrogénase est un enzyme soluble de la matrice mitochondriale (6); elle peut donc nous informer sur la perméabilité de la membrane interne, celle-ci étant normalement imperméable au NADH, utilisé comme substrat dans le dosage de cet enzyme.
- c) En ce qui concerne les effets de la centrifugation, nous avons choisi comme enzyme de référence de la membrane externe la monoamine oxidase (6) et pour la membrane interne la cytochrome c oxydase (6).

#### 1.3.2. Enzyme latent des lysosomes

L'enzyme choisi est la phosphatase acide (4)

#### 1.3.3. Enzyme latent des peroxysomes.

Nous avons dosé la catalase, seul enzyme latent des peroxysomes (7).

Le tableau I nous donne un aperçu des méthodes utilisées pour mesurer ces différents enzymes.

#### 1.4. Activation des différents granules

- a) activation thermique: chapitre II
- b) autres activations: chapitre III

Tableau I

## Aperçu général des mesures enzymatiques

Enzyme -----	Substrat -----	pH -----	Mesure -----
Cytochrome oxydase	Cytochrome c réduit $1,7 \times 10^{-5} \text{ M}$	7,4	Spectrophotométrie du cytochrome c réduit
Monoamine oxydase	Benzylamine $2,5 \times 10^{-3} \text{ M}$	7,4	Spectrophotométrie de la benzaldé- hyde formée
Malate déshydrogéné- se	Oxalacétate $2,5 \times 10^{-3} \text{ M}$ NADH $1,5 \times 10^{-4} \text{ M}$	7,4	Spectrophotométrie du NADH
Sulfite cytochrome c réductase	Cytochrome c $5 \times 10^{-5} \text{ M}$	8,5	Spectrophotométrie du cytochrome c
Catalase	$\text{H}_2\text{O}_2$ $1,5 \times 10^{-3} \text{ M}$	7,2	Colorimétrie de $\text{H}_2\text{O}_2$
Phosphatase acide	glycérophosphate sodique $5 \times 10^{-2} \text{ M}$	5	Colorimétrie du phosphate inorga- nique.

#### 1.4.1. Activation thermique des mitochondries

On incube à 37°C 0,1 ml de la préparation mitochondriale à laquelle on a ajouté soit 0,1 ml imidazole 1mM - saccharose 0,25M (témoin); pH = 7, soit 0,1 ml d'une des trois drogues à concentrations choisies.

Le temps d'incubation varie de 0 à 70 minutes; ensuite on plonge le tube dans de l'eau glacée; on dilue adéquatement dans le saccharose 0.25M; on mesure enfin l'activité libre et totale de la sulfite cytochrome c réductase et de la malate déshydrogénase.

#### 1.4.2. Activation thermique des lysosomes

On incube également à 37°C pendant les temps choisis. 0,1 ml de M + L mélangé soit à 0,1 ml tampon acétate - saccharose 0,25M , soit à 0,1 ml d'une drogue; pH=5. Après ces temps d'incubation, on dose l'activité libre et totale de la phosphatase acide.

#### 1.4.3. Activation thermique des peroxysomes

Le milieu d'incubation est le suivant: à 37°C 0,1 ml de M + L mélangé soit à 0,1 ml de tampon d'imidazole 0,1M - saccharose 0,25M , soit à 0,1 ml d'une drogue; pH = 7. Après les temps d'incubation requis, les activités libre et totale sont mesurées.

1.4.4. Autres moyens d'activation

Outre l'effet thermique, nous avons aussi étudié l'activation en cours de centrifugation et lors d'une compression dans une presse hydraulique. Ces expériences ne concernent que les enzymes mitochondriaux (sulfite cytochrome c réductase et malate déshydrogénase).

Quelques détails expérimentaux seront donnés avec les résultats au chapitre III.

CHAPITRE 2. ACTIVATION DES MITOCHONDRIES, DES LYSOSOMES  
ET DES PEROXYSOMES PAR INCUBATION A 37° C.

2.1. Mitochondries

Lorsque nous incubons une fraction mitochondriale de foie de rat à 37° C, en milieu isotonique et à pH 7, nous observons une augmentation progressive des activités libres de la sulfite cytochrome c réductase et de la malate déshydrogénase. Un tel traitement conduit donc à une détérioration progressive de la membrane externe et de la membrane interne des mitochondries. La figure 15 tirée du travail de Jean Bossiroy, illustre l'évolution de ce processus. La perte de latence de la sulfite cytochrome c réductase va de pair avec celle de la malate déshydrogénase. L'une ne semble pratiquement pas précéder

l'autre. Les résultats suivants montrent l'effet que peuvent avoir la désipramine, l'imipramine et la méthylimipramine sur un tel processus.

### 2.1.1. Désipramine

La figure 3 rapporte comment évolue l'activité libre de la malate déshydrogénase, en présence de concentrations croissantes de désipramine. Aucun effet particulier n'est observé à une concentration 0,1 mM. Mais en présence de désipramine 0,6 mM, l'augmentation de l'activité libre en fonction du temps est nettement moins marquée. Une telle concentration protège donc la membrane mitochondriale interne contre la détérioration produite par l'incubation à 37°C. Un phénomène inverse est apparent lorsque la concentration de l'antidépresseur atteint 1 mM, la malate déshydrogénase libre augmente beaucoup plus vite. Il est à noter que pour une concentration de 5 mM, l'activité libre initiale, donc avant l'incubation à 37°C, est déjà considérablement augmentée. La désipramine exerce donc un effet biphasique sur la membrane interne stabilisant jusqu'à une certaine concentration, labilisant pour des concentrations plus élevées.

Sur la figure 4 est représenté l'effet de la désipramine sur l'activité libre de la sulfite cytochrome c réductase. On peut dire que globalement les résultats sont comparables à ceux que nous venons de décrire pour la malate déshydrogénase. Tout

MALATE DEHYDROGENASE

DESIPRAMINE

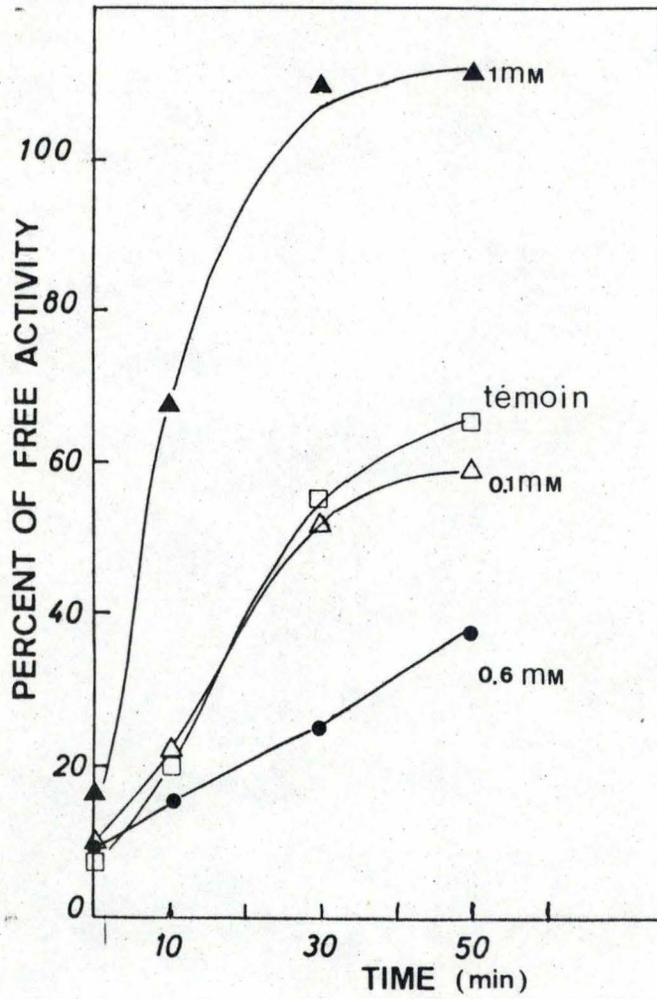


Figure 3: Effets de différentes concentrations de désipramine sur l'activité libre de la malate déshydrogénase. La fraction mitochondriale a été incubée à 37°C, à pH 7. L'activité enzymatique a été mesurée aux temps indiqués et est exprimée en pourcent de l'activité totale.

SULFITE CYT. c REDUCTASE  
DESIPRAMINE

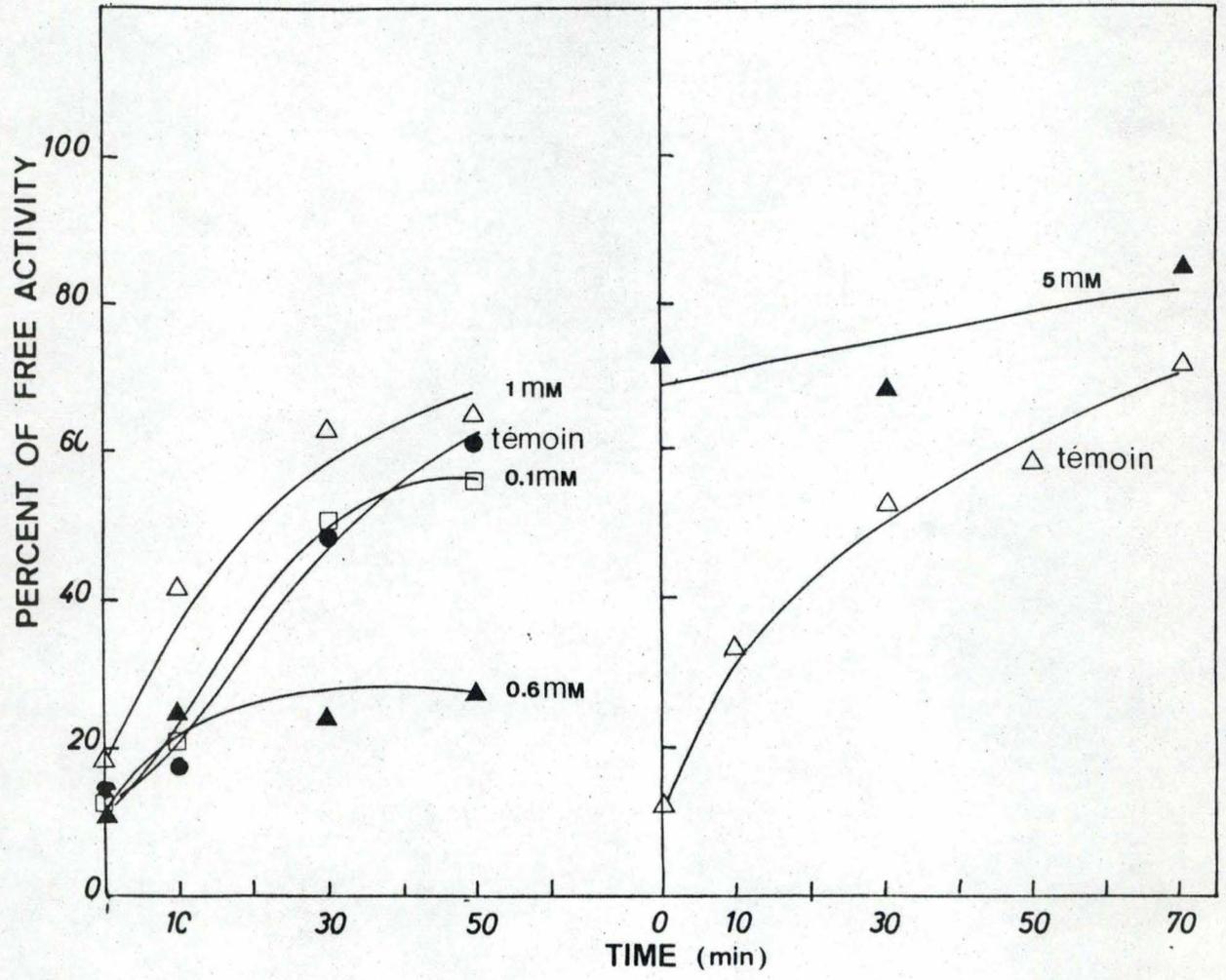


Figure 4: Effets de différentes concentrations de désipramine sur l'activité libre de la sulfite cytochrome c réductase. La fraction mitochondriale a été incubée à 37°C, à pH 7. L'activité enzymatique a été mesurée aux temps indiqués et est exprimée en pourcent de l'activité totale.

comme la membrane mitochondriale interne, la membrane mitochondriale externe est soit stabilisée, soit labilisée par la désipramine, suivant la concentration de cette drogue.

### 2.1.2. Imipramine

La fig. 5 illustre les variations de l'activité libre de la malate déshydrogénase à différentes concentrations d'imipramine. Une concentration 0,1 mM n'a pas d'effet significatif; une concentration 0,6 mM ralentit fortement la libération de l'enzyme. Au-delà de ces concentrations, l'imipramine diminue la latence de la malate déshydrogénase, même lorsque les mitochondries sont maintenues à 0°C avant la mesure enzymatique (donc dans ce cas, l'activation n'est pas due à l'incubation à 37°C). Comme la désipramine, l'imipramine est capable de protéger ou de détériorer la membrane mitochondriale interne, le résultat dépendant de la concentration utilisée. Quant à la membrane mitochondriale externe, on n'observe pas d'effet protecteur de la drogue, du moins aux concentrations que nous avons utilisées et si l'on se réfère à l'activité libre de la sulfite cytochrome c réductase (fig.6); l'effet labilisant est bien net et s'observe déjà à une concentration 1 mM d'imipramine.

# MALATE DEHYDROGENASE IMIPRAMINE

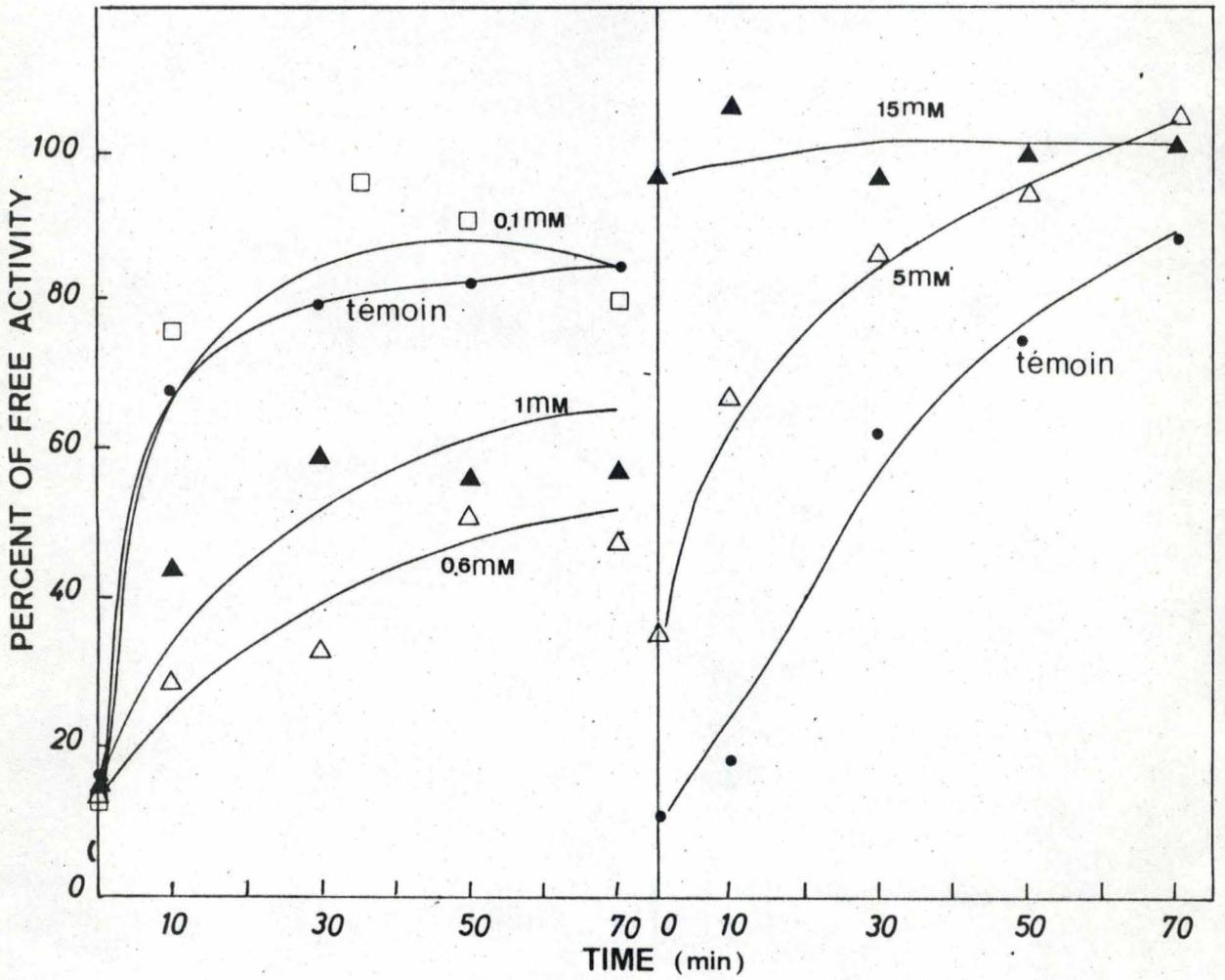


Figure 5: Effets de différentes concentrations d'imipramine sur l'activité libre de la malate déshydrogénase. La fraction mitochondriale a été incubée à 37°C, à pH 7. L'activité enzymatique a été mesurée aux temps indiqués et est exprimée en pourcent de l'activité totale.

SULFITE CYT. C REDUCTASE  
IMIPRAMINE

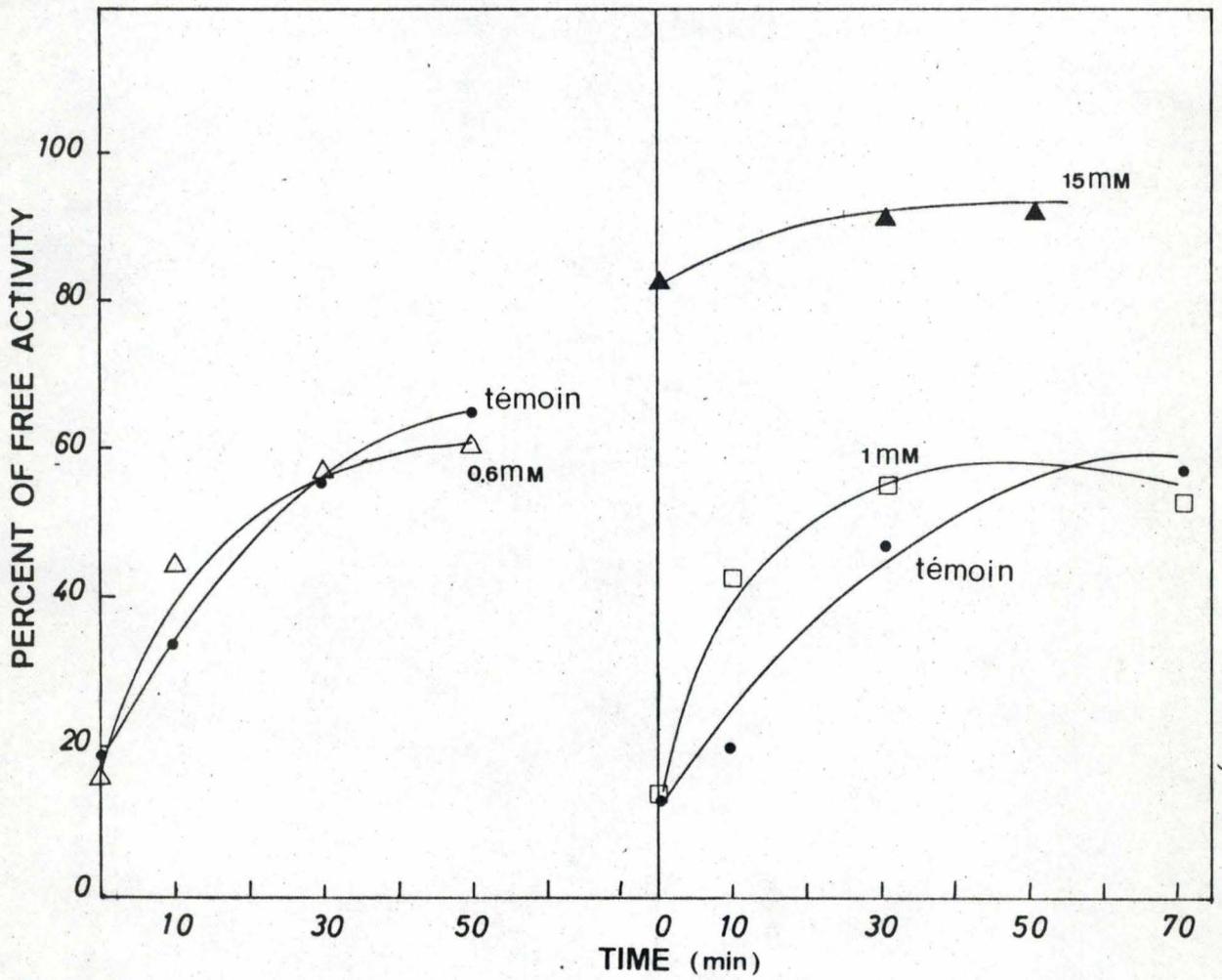


Figure 6: Effets de différentes concentrations d'imipramine sur l'activité libre de la sulfite cytochrome c réductase. La fraction mitochondriale a été incubée à 37°C, à pH 7. L'activité enzymatique a été mesurée aux temps indiqués et est exprimée en pourcent de l'activité totale.

### 2.1.3. Méthylimipramine

La figure 7 rapporte les effets de la méthylimipramine sur l'activité libre de la malate déshydrogénase. En bref, comme pour les deux autres drogues, on constate un effet stabilisant ou labilissant sur la membrane interne, dépendant de la concentration. Toutefois, il semble que l'effet protecteur ne se manifeste nettement qu'à des concentrations plus élevées en méthylimipramine. Quant à la sulfite cytochrome c réductase libre, elle augmente plus rapidement déjà pour une concentration très faible de 0,1 mM en méthylimipramine (fig 8). Il n'y a pas d'effet biphasique: seul l'effet labilissant est apparent sur la membrane mitochondriale externe. Il est remarquable que la méthylimipramine 1 mM conduit à une activation quasi totale de la sulfite cytochrome c latente, même sans incubation préalable des mitochondries à 37°C.

### 2.2. Lysosomes.

L'activation des lysosomes par incubation à 37°C, dépend très nettement du pH; elle est particulièrement bien marquée à pH 5. Nous avons donc choisi ce pH pour nos expériences.

Les figures 9, 10, 11 illustrent la façon dont évolue l'activité libre de la phosphatase acide en fonction du temps d'incubation à 37°C, en présence de quantités variables de

MALATE DEHYDROGENASE

METHYLIMIPRAMINE

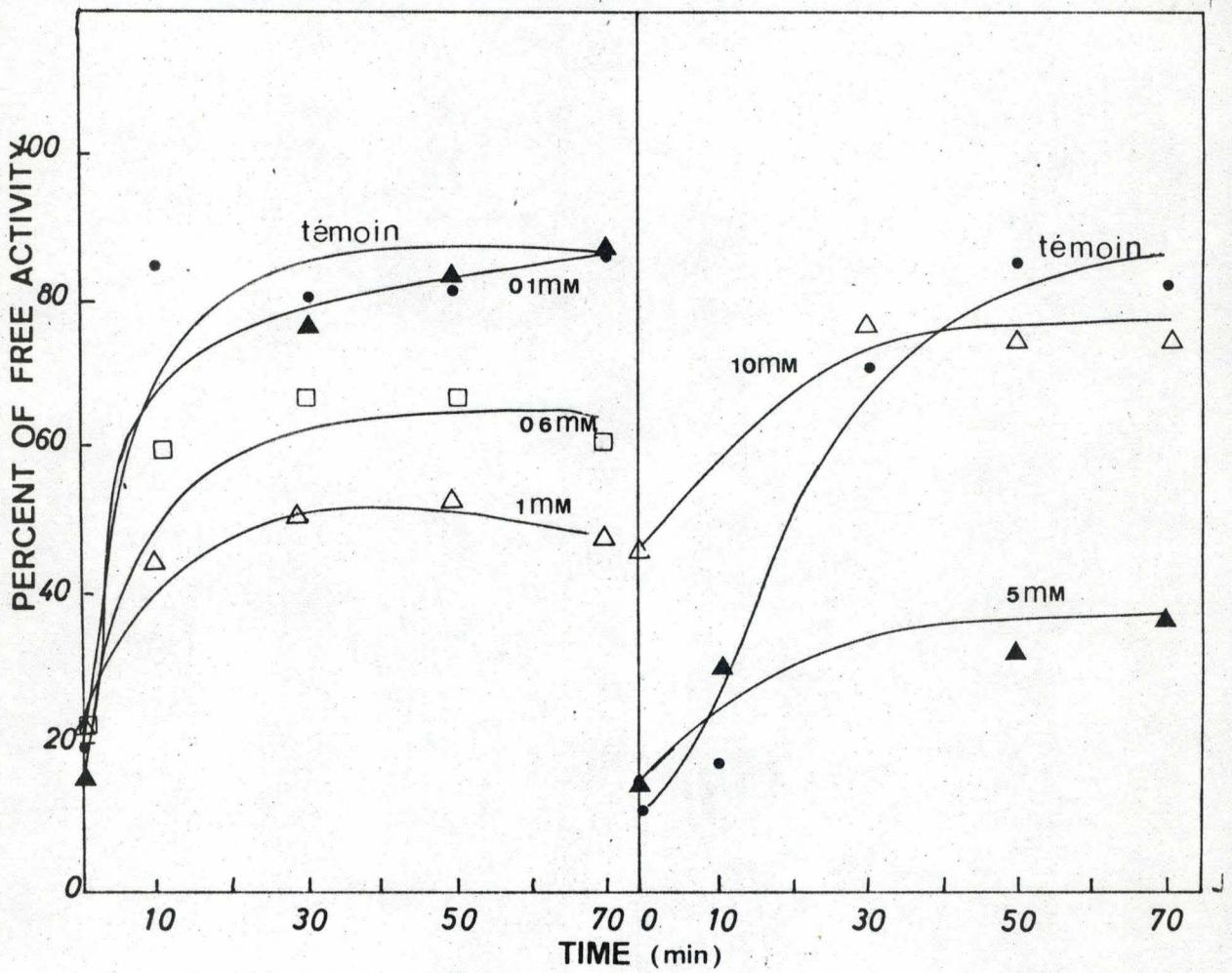


Figure 7: Effets de différentes concentrations de méthylimipramine sur l'activité libre de la malate déshydrogénase. La fraction mitochondriale a été incubée à 37°C, à pH 7. L'activité enzymatique a été mesurée aux temps indiqués et est exprimée en pourcent de l'activité totale.

SULFITE CYT. c REDUCTASE  
METHYLIMIPRAMINE

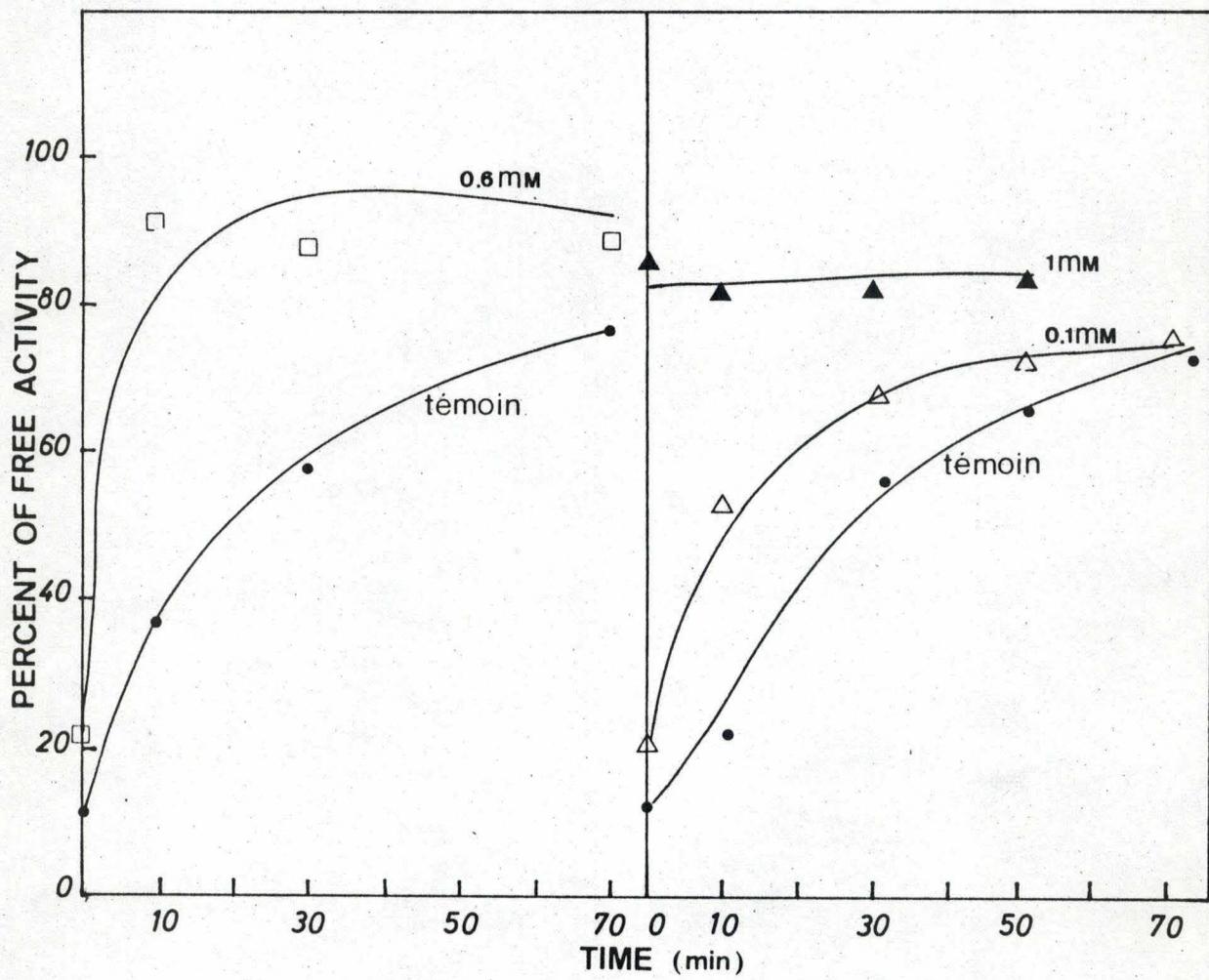


Figure 8: Effets de différentes concentrations de méthylimipramine sur l'activité libre de la sulfite cytochrome c réductase. La fraction mitochondriale a été incubée à 37°C, à pH 7. L'activité enzymatique a été mesurée aux temps indiqués et est exprimée en pourcent de l'activité totale.

désipramine, d'imipramine ou de méthylimipramine. Globalement les résultats sont comparables pour les trois substances. Celles-ci peuvent préserver ou diminuer la latence de l'hydrolyse acide, et ce suivant leur concentration dans le milieu de préincubation. Les trois drogues stabilisent ou labilisent la membrane des lysosomes. Toutefois, il semble que la méthylimipramine soit, à concentration égale, un moins bon protecteur. Elle nécessite également une concentration plus élevée pour labiliser la membrane lysosomale.

### 2.3. Peroxisomes

La membrane des peroxysomes est moins sensible à l'incubation à 37°C. En effet, pour obtenir une augmentation appréciable de l'activité libre de la catalase, il faut laisser les granules plus de 100 minutes à cette température.

Seule l'imipramine a pu être testée dans le cadre de ce mémoire (fig.12).

### 2.4. Discussion

#### 2.4.1. Mitochondries

La détérioration des membranes mitochondriales qui se produit lors d'une incubation à 37°C est essentiellement due à une action phospholipasique endogène (8). L'hydrolyse de

ACID PHOSPHATASE  
DESIPRAMINE

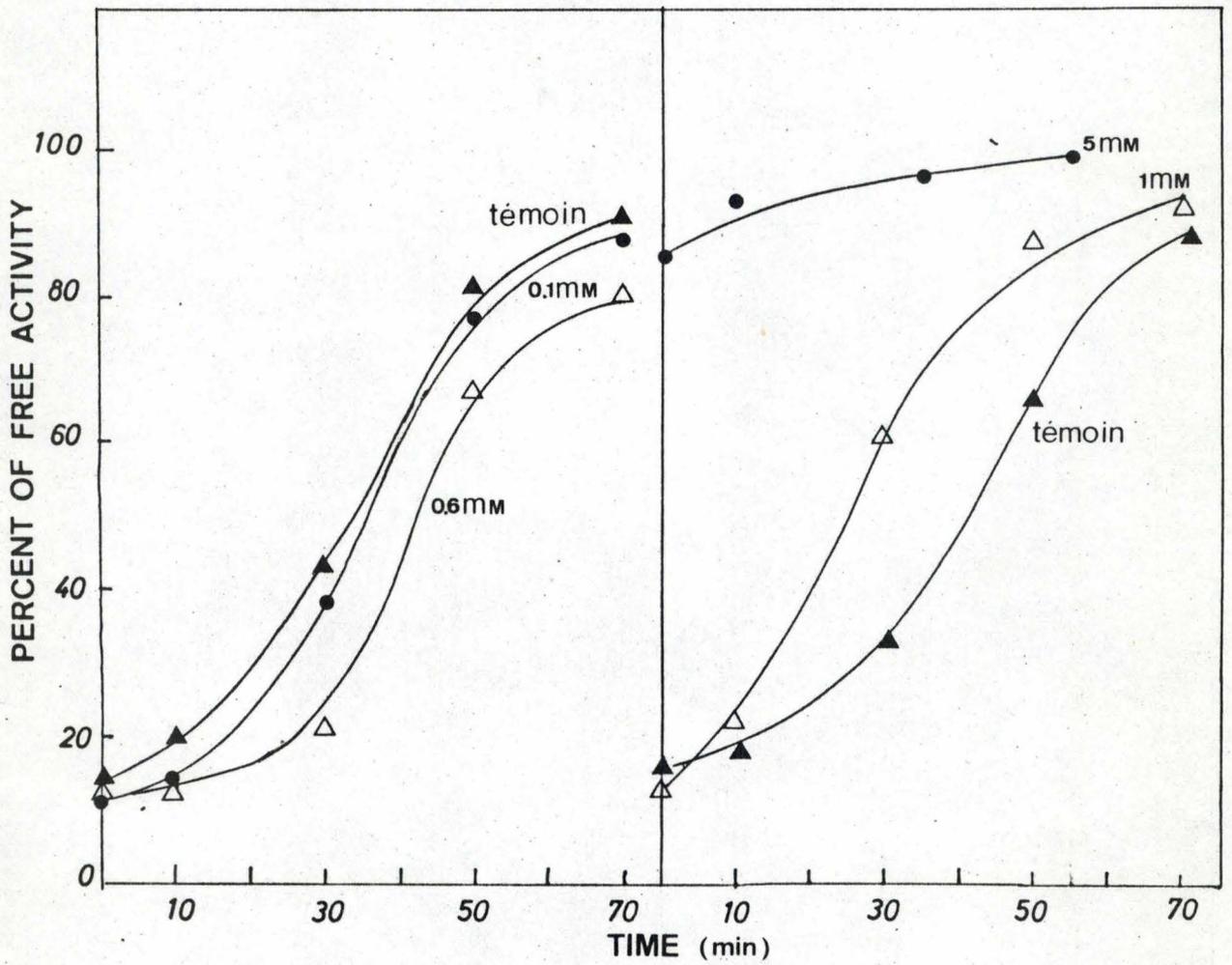


Figure 9: Effets de différentes concentrations de désipramine sur l'activité libre de la phosphatase acide. La fraction mitochondriale a été incubée à 37°C à pH 5. L'activité enzymatique a été mesurée aux temps indiqués et est exprimée en pourcent de l'activité totale.

ACID PHOSPHATASE

IMIPRAMINE

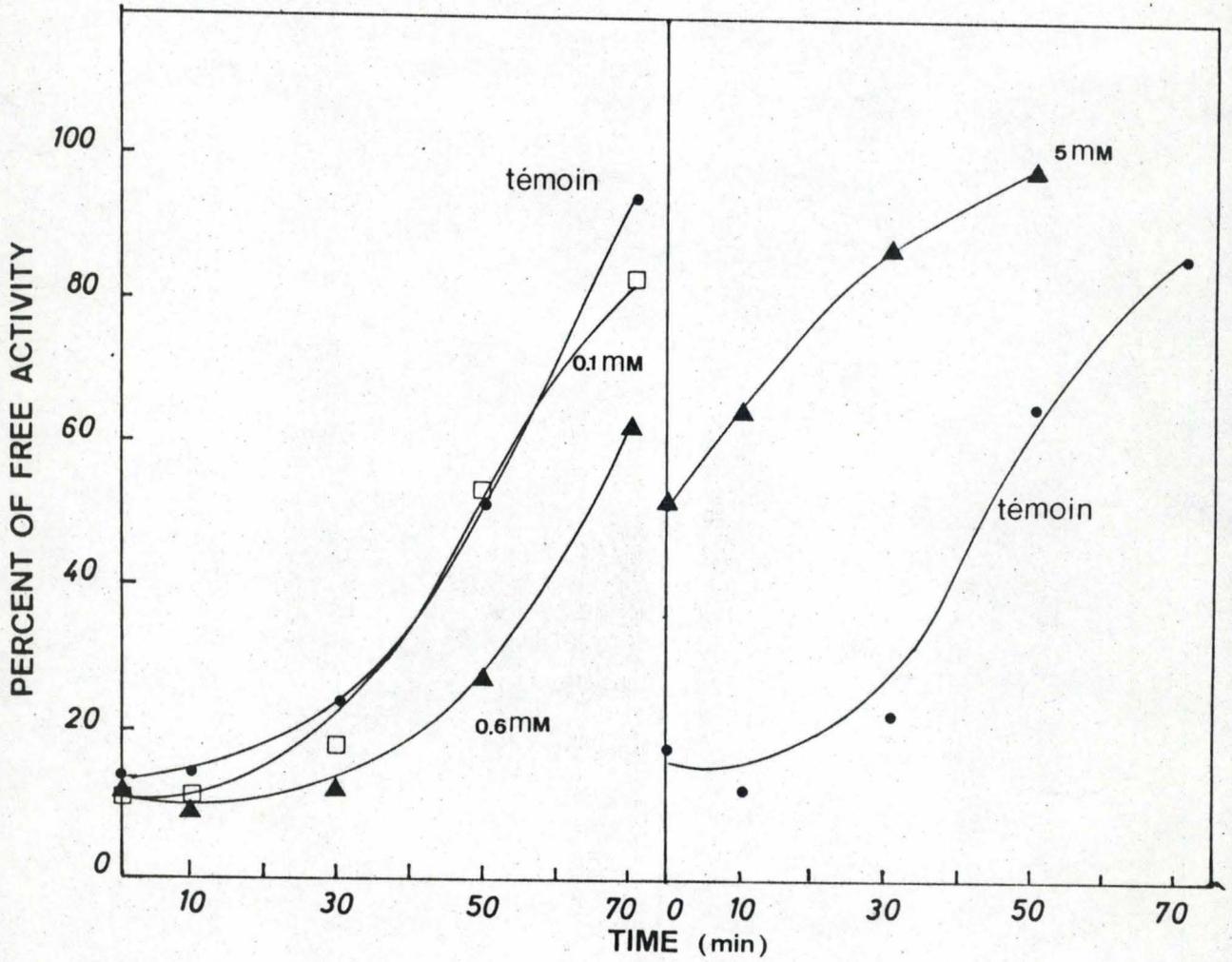


Figure 10: Effets de différentes concentrations d'imipramine sur l'activité libre de la phosphatase acide. La fraction mitochondriale a été incubée à 37°C à pH 5. L'activité enzymatique a été mesurée aux temps indiqués et est exprimée en pourcent de l'activité totale.

ACID PHOSPHATASE  
METHYLIMIPRAMINE

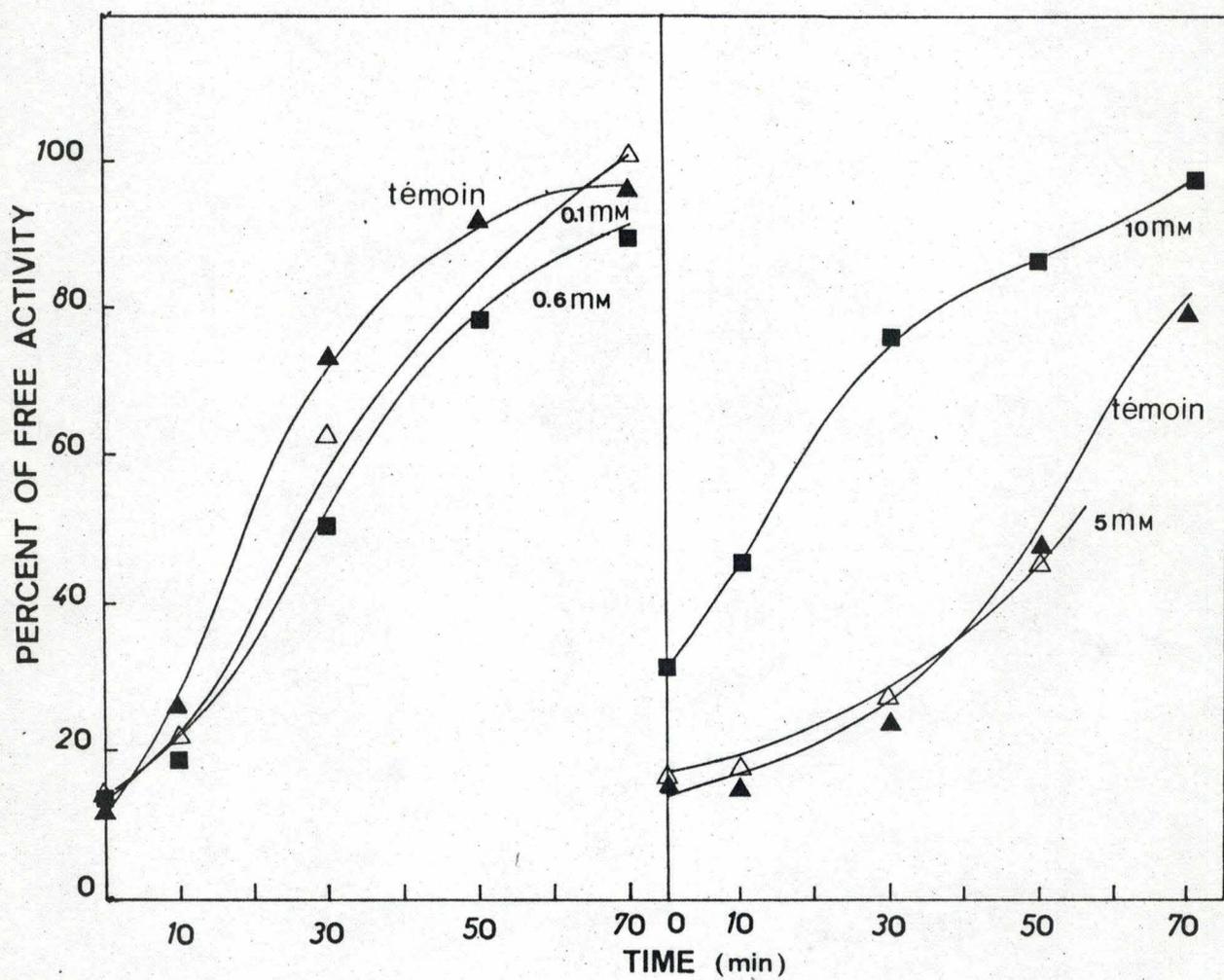


Figure 11: Effets de différentes concentrations de méthyliminopramine sur l'activité libre de la phosphatase acide. La fraction mitochondriale a été incubée à 37°C à pH 5. L'activité enzymatique a été mesurée aux temps indiqués et est exprimée en pourcent de l'activité totale.

CATALASE  
IMIPRAMINE

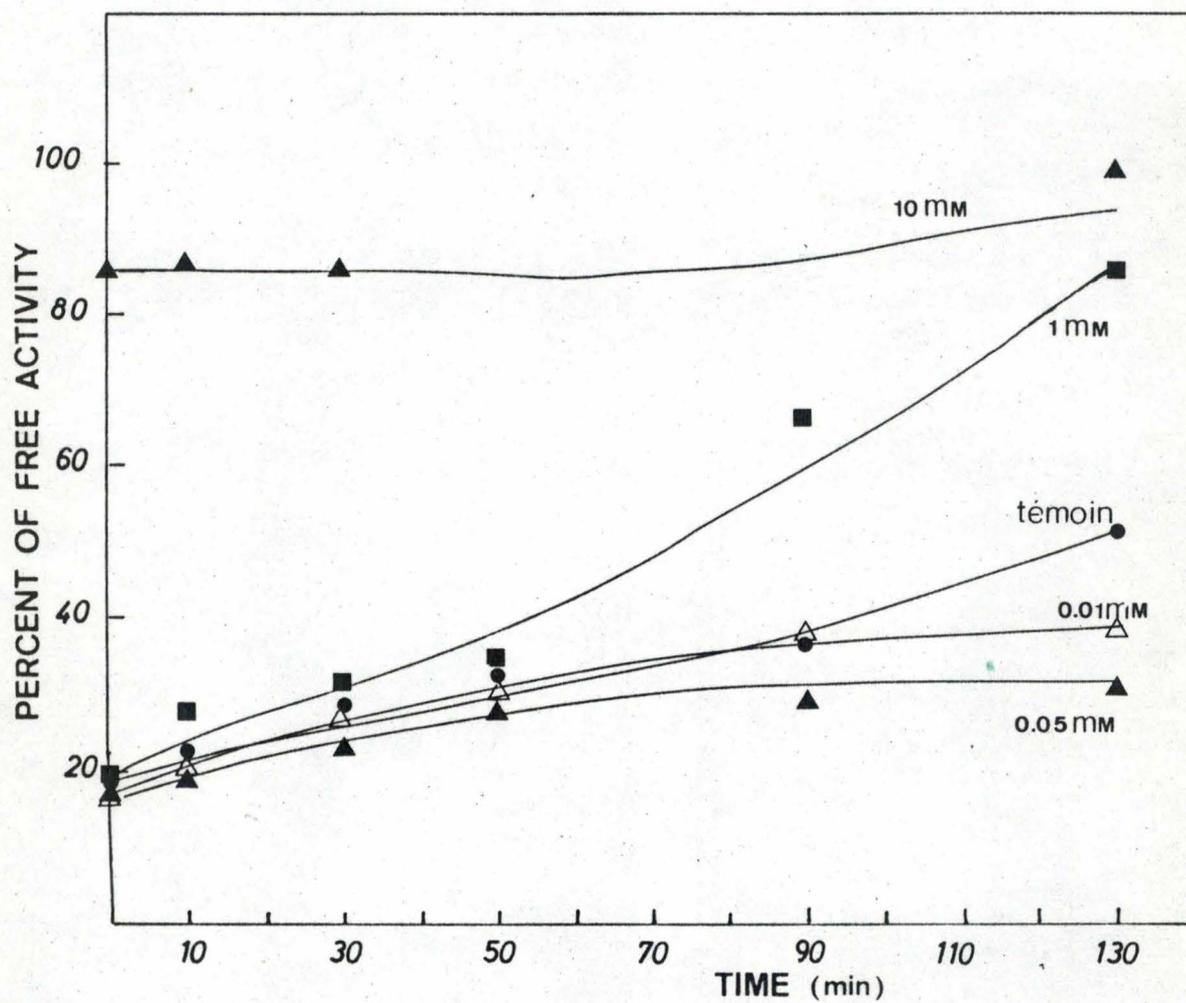


Figure 12: Effets de différentes concentrations d'imipramine sur l'activité libre de la catalase. La fraction mitochondriale a été incubée à 37°C à pH 7. L'activité enzymatique a été mesurée aux temps indiqués et est exprimée en pourcent de l'activité totale.

phospholipides des membranes provoque une augmentation de la perméabilité avec comme conséquence un gonflement osmotique et probablement une véritable lyse du granule.

A concentration appropriée, les trois drogues que nous avons testées peuvent inhiber ce phénomène. Nous nous référons à leur action sur la membrane interne. En effet, l'hydrolyse de cardiolipides, (phospholipides existant surtout dans la membrane interne) est associée à une détérioration de la mitochondrie; ceci suppose que les cardiolipides jouent un rôle critique et dans la stabilité de la membrane interne et dans l'intégrité de toute la mitochondrie (9). C'est la détérioration de la membrane interne qui doit conduire au gonflement de la matrice; celui-ci entraînant la rupture de la membrane externe pour se terminer par la lyse totale de la mitochondrie. L'augmentation de perméabilité de la membrane externe seule ne doit normalement pas avoir de conséquence sur le comportement osmotique de la mitochondrie.

Ces substances peuvent agir en inhibant l'action phospholipasique ou/et en permettant à la membrane lésée de mieux résister à l'expansion qu'elle doit subir. L'inhibition de l'action phospholipasique peut elle-même résulter d'une diminution de l'activité enzymatique ou d'une modification du substrat le

rendant moins apte à l'hydrolyse. Nos résultats ne nous permettent pas de choisir avec certitude entre l'une ou l'autre de ces possibilités. Nous n'avons en effet pas pu déterminer si la protection de la membrane interne que nous avons mise en évidence s'accompagnait ou non d'une diminution de l'hydrolyse des phospholipides membranaires. Signalons toutefois que Seppala et al(10) ont montré que certaines substances lipophiles chargées positivement, des anesthésiques locaux par exemple, étaient capables d'inhiber le gonflement des mitochondries induit par la phospholipase A. D'après ces auteurs, il ne s'agirait pas d'une action sur l'enzyme lui-même mais sur les phospholipides inclus dans les membranes mitochondriales qui deviendraient donc moins hydrolysables par la phospholipase. Scarpa et Lindsay (11) ont trouvé que la nupercaïne, qui est aussi une substance lipophile chargée positivement, inhibait fortement la phospholipase A, empêchant aussi l'hydrolyse spontanée des phospholipides mitochondriaux au cours du vieillissement à 0°C et protégeait aussi les phosphorylations oxydatives.

Il est donc plausible de supposer que la désipramine, l'imipramine et la méthylimipramine, qui sont lipophiles et chargées positivement sont capables d'inhiber l'hydrolyse des phospholipides mitochondriaux, et que ce phénomène joue un rôle important dans l'effet stabilisant que ces composés exercent

sur la membrane mitochondriale externe.

A partir d'une certaine concentration, l'imipramine et ses dérivés ont une action labilisante sur la membrane interne, qui peut même être manifeste sans préincubation à 37°C. Ces observations sont à rapprocher de celles de Cater et al (12) sur les interactions entre la désipramine et les phospholipides "in vitro"; selon ces auteurs, à haute concentration, la désipramine et des molécules analogues formeraient des complexes avec les lipides; ces complexes ne seraient pas miscibles dans la phase lipidique, ce qui provoquerait une désorganisation de cette phase et ensuite une lyse. Il est à noter que les anesthésiques locaux sont hémolytiques à partir d'une certaine concentration (1).

Seule la désipramine peut stabiliser la membrane externe. La rupture de la membrane externe peut résulter, comme dans la lyse hypotonique, du gonflement de la mitochondrie, alors la rupture de la membrane externe précède très nettement celle de la membrane interne. Or ce n'est pas le cas lors de la lyse par incubation à 37°C: membrane interne et membrane externe sont perméabilisées de façon quasi simultanée. Par conséquent, comment l'imipramine qui protège la membrane interne, ne peut-elle avoir une action comparable sur la membrane externe? On pourrait émettre l'hypothèse d'un gonflement de la mitochondrie mais sans rupture de la membrane interne, seule la

membrane externe serait atteinte. Nous pensons que des travaux complémentaires permettront une meilleure interprétation des résultats sur la membrane externe.

#### 2.4.2. Lysosomes

La labilisation de la membrane des lysosomes à pH 5 et à 37°C est connue depuis longtemps (13).

L'hypothèse proposée dès la mise en évidence de ce phénomène est la suivante: les protéases et les lipases lysosomales sont responsables de la détérioration de la membrane de l'organite (14). Effectivement tant l'influence de la température que du pH sont en faveur de cette interprétation (15); également le fait que la membrane des lysosomes est sensible aux protéases et phospholipases ajoutées au milieu d'incubation (16). On n'a toutefois pas d'argument aussi direct que pour les mitochondries, vraisemblablement du fait de la difficulté de réaliser les expériences adéquates sur les lysosomes purifiés. Tenant compte de cela, on peut supposer que l'effet protecteur de la désipramine et de ses dérivés peut s'interpréter de la même façon que celui qu'on observe pour les mitochondries. Notons toutefois que l'effet protecteur est quasi nul pour la méthylimipramine. Quant à l'effet labilisant, ce qui a été dit pour les mitochondries est certainement valable pour les lysosomes.

### 2.4.3. Peroxysomes

Il n'est pas possible d'expliquer la détérioration de la membrane des peroxysomes par l'action d'une hydrolase présente dans les organites. Dans l'état actuel de nos connaissances, un tel enzyme n'a pas été décrit. Par contre, on ne peut négliger le fait qu'un enzyme lytique provenant d'autres granules, les lysosomes en particulier, ne puisse exercer un effet sur la membrane des peroxysomes. De plus, l'augmentation de catalase libre est très lente; par conséquent, la détérioration de la membrane des peroxysomes se fait plus lentement que celle des autres organites étudiés. Ceci est compatible avec une action d'un enzyme exogène dont l'effet nécessiterait la rupture de la membrane des granules qui le contiennent (lysosomes, mitochondries).

L'effet protecteur de l'imipramine sur la membrane des peroxysomes, ne doit pas résulter d'un effet sur la membrane des lysosomes ou des mitochondries empêchant l'hydrolase d'être libérée. Cette protection se manifeste, en effet, à des concentrations où l'imipramine n'agit pas sur les lysosomes et les mitochondries. Il s'agit donc vraisemblablement d'une action directe sur la membrane du peroxysome mais nous ne pouvons donner plus de précisions.

Notons que l'effet labilissant sur la membrane peroxy-somale, que nous interprétons comme ci-dessus lorsqu'il s'agissait des mitochondries et des lysosomes, se manifeste à des concentrations faibles en imipramine.

CHAPITRE 3. DETERIORATION DES MITOCHONDRIES PAR  
CENTRIFUGATION A HAUTE VITESSE ET PAR  
COMPRESSION. EFFET DE L'IMIPRAMINE, LA  
DESIPRAMINE ET LA METHYLIMIPRAMINE.

Nous décrivons dans ce chapitre les effets que peuvent avoir la désipramine, l'imipramine, la méthylimipramine sur l'altération des membranes mitochondriales causée par la pression hydrostatique.

3.1. - Centrifugation isopycnique

3.1.1. Détails expérimentaux.  
-----

Dans une centrifugation isopycnique, la fraction

mitochondriale totale est déposée au sommet d'un gradient de densité de saccharose. La vitesse de sédimentation d'une particule sphérique dans un champ centrifuge est donné par l'équation suivante.

$$v = \frac{dx}{dt} = \frac{2 r^2 (\rho_p - \rho_m)}{9 \eta} \omega^2 x$$

où  $r$  = rayon de la particule en cm

$\rho_p$  = densité de la particule en  $\text{g.cm}^{-3}$

$\rho_m$  = densité du milieu en  $\text{g.cm}^{-3}$

$\eta$  = viscosité du milieu en poises

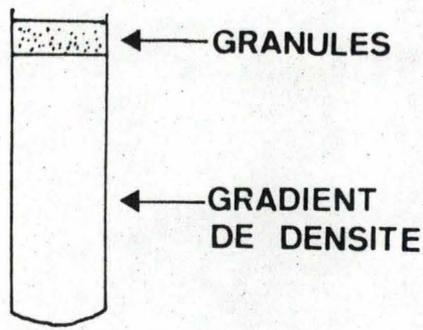
$\omega$  = vitesse angulaire en  $\text{rad}^2 \text{sec}^{-1}$

$x$  = distance radiale en cm.

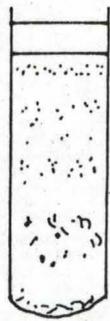
Les granules soumis à la centrifugation sédimenteront jusqu'à ce qu'ils atteignent une zone dont la densité est égale à la leur car à ce moment,  $\rho_m$  sera égale à  $\rho_p$  et par conséquent la vitesse sera nulle. Après centrifugation, on récoltera une série de fractions en sectionnant les tubes en tranches; on mesurera leur densité et on les dosera séparément après les avoir dilués adéquatement. La Fig. 13 schématise le processus expérimental.

### 3.1.2. Effet de la centrifugation

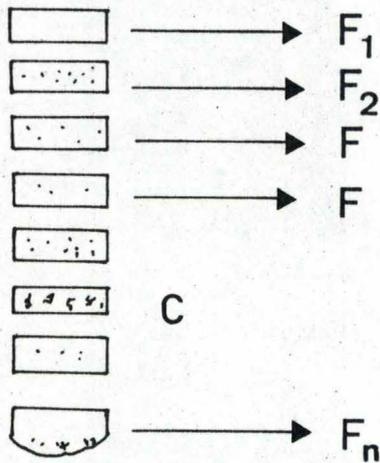
Lorsque les mitochondries sont intactes, les



A



B



C

D

Figure 13: Schéma de la centrifugation en gradient de densité. (A) Centrifugation. (B) Section du tube en tranches avec l'appareil de de Duve et al (1959)(24) (C) Recueil des fractions et mesure de leur densité. (D) Dilution, déterminations enzymatiques.

enzymes mitochondriaux à localisation submitochondriales différentes se distribuent après centrifugation de la même façon unimodale autour d'une densité d'environ 1,19 gr/ml. Lorsque les mitochondries sont altérées, les distributions deviennent plurimodales.

Prenons l'exemple des quatre enzymes que nous avons mesurés: la cytochrome oxydase associée à la membrane interne ( 6 ), la monoamine oxydase associée à la membrane externe ( 6 ), la malate déshydrogénase associée à la matrice ( 6 ) et la sulfite cytochrome c réductase qui se situe dans l'espace intermembranaire ( 5 ). La fig. 14 illustre la façon dont ils se distribuent après centrifugation isopycnique dans un gradient de saccharose à 65.000 t/min, le rotor étant le SW 65 spinco. Les distributions sont hétérogènes; en particulier une différence nette est observable si l'on compare les deux enzymes membranaires et l'enzyme soluble de la matrice. Un tel résultat indique que les mitochondries ont été profondément détériorées au cours de cette centrifugation ( 17 ). L'explication de ces résultats est schématisée à la fig.15 , comme Wattiaux et al l'ont démontré ( 17 ). Lorsque la vitesse de centrifugation est élevée, certaines mitochondries deviennent plus denses; ceci ne s'explique que si la membrane interne est altérée, les mitochondries devenant alors perméables au saccha-

RELATIVE CONCENTRATION

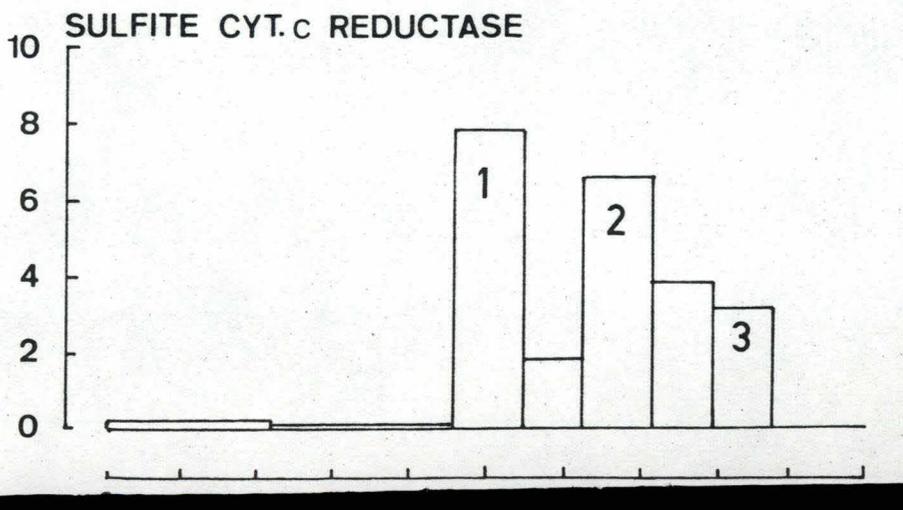
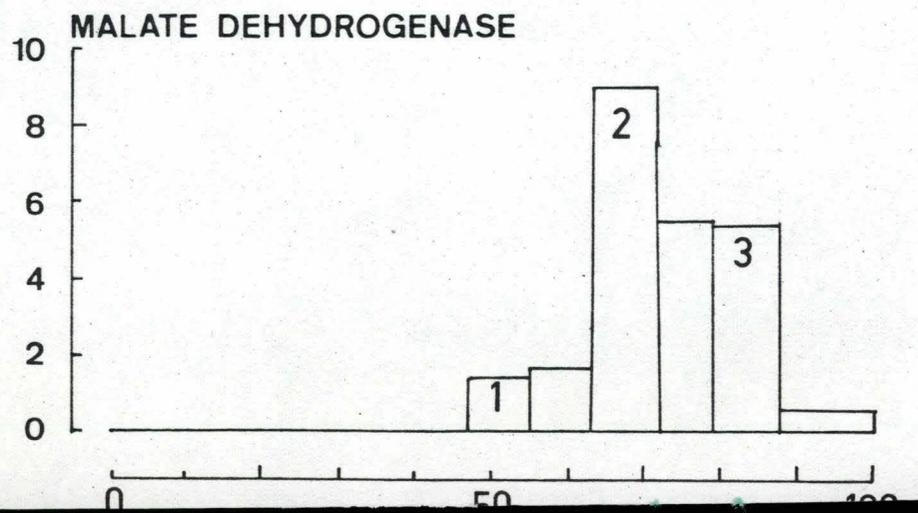
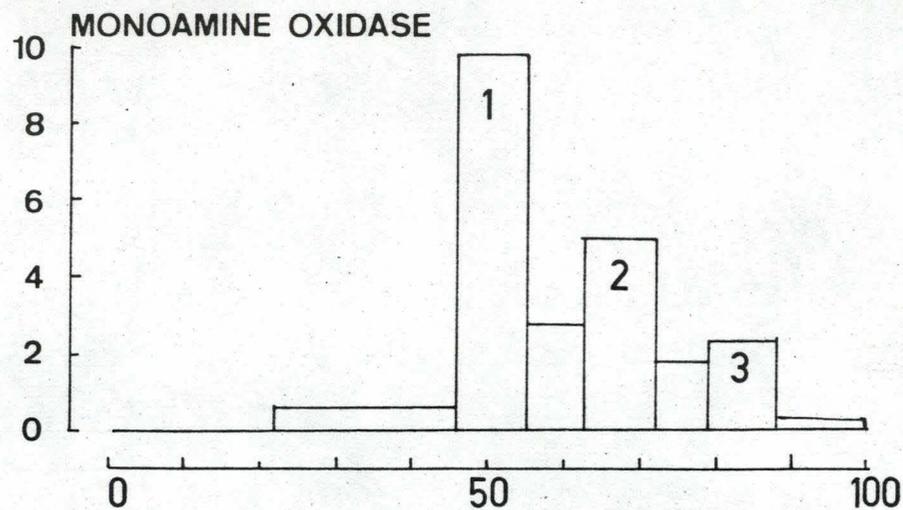
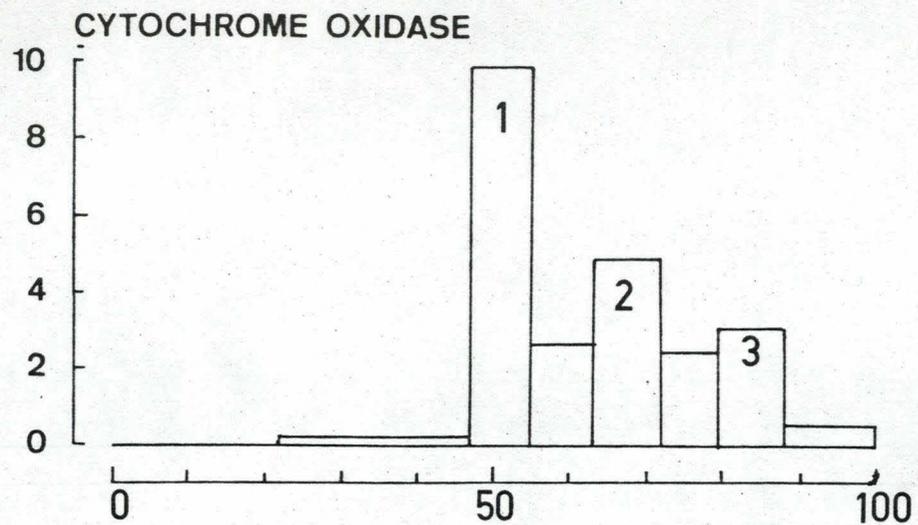


Figure 14: Distribution des enzymes de référence après centrifugation isopycniqne d'une fraction mitochondriale (M + L) de foie de rat. La centrifugation a été réalisée à 65.000 t/min. dans le rotor Spinco SW 65, pendant 60 minutes. Les limites de densité du gradient de saccharose sont 1,09 g/cm<sup>3</sup> et 1,26 g/cm<sup>3</sup>. Les granules dilués dans le saccharose 0,25 M ont été déposés au sommet du gradient avant la centrifugation. Les récupérations sont de 84% pour la cytochrome oxydase, 109% pour la monoamine oxydase, 98,5% pour la malate déshydrogénase et 85% pour la sulfite cytochrome c réductase.

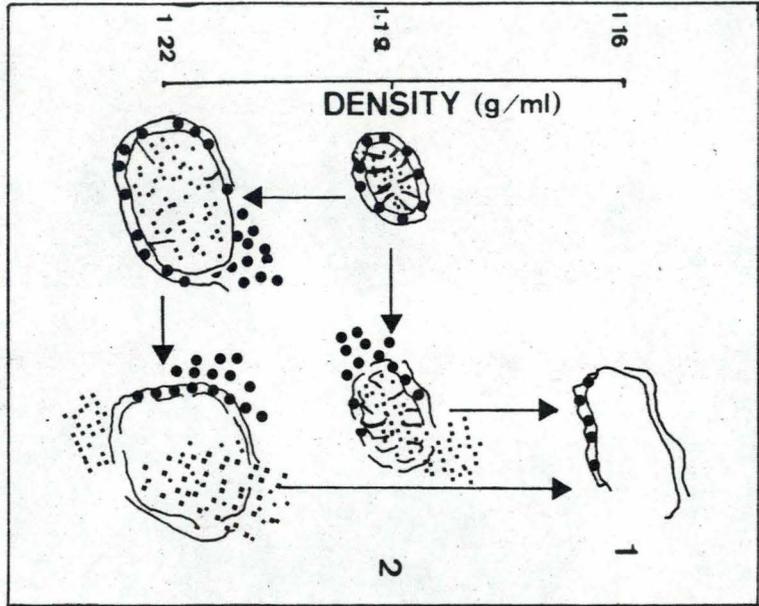


Figure 15: Interprétation de la distribution des enzymes mitochondriaux observée après une centrifugation isopycni- que d'une fraction mitochondriale. Tous les enzymes mito- chondriaux se retrouvent dans la zone 2 de densité 1,19 g./ml. A haute centrifugation certaines mitochondries deviennent plus denses et migrent dans une zone 3 de densité 1,22 g./ml. Les granules gonflent et on observe une séparation entre l' enzyme matriciel et les enzymes membranaires, ces derniers migrants dans une zone 1 de densité 1,17 g./ml.

rose. Dans ces conditions, les granules gonflent et les deux membranes finissent par se séparer du contenu mitochondrial soluble. Les débris membranaires migrent pour s'équilibrer à une densité moyenne de 1,16 g/ml tandis que les mitochondries gonflées et le contenu matriciel se stabilisent à une densité de 1,22 g/ml. (Les mitochondries normales restant évidemment stables à 1,19 g/ml. Les distributions enzymatiques de la fig.14 s'expliquent donc comme suit. Les deux enzymes membranaires sont principalement localisés dans la zone 1, là où on trouve très peu de malate déshydrogénase; par contre, on décèle la présence de cette dernière dans les zones 2 et 3. Une partie du contenu intermembranaire (sulfite cytochrome c réductase) a accompagné les membranes au cours de leur rééquilibration.

La fig.16 montre comment se distribuent ces mêmes enzymes lorsque la centrifugation a été réalisée en présence de désipramine 0,1 mM. Manifestement, les résultats sont différents. Les distributions des quatre enzymes sont unimodales et se ressemblent; ils se situent principalement dans la zone 2; cela suppose que les mitochondries, dans ces conditions, sont restées intactes puisque tous les constituants tant membranaires que matriciels se retrouvent à un même endroit du gradient. Donc la présence de désipramine a empêché l'effet détériorant de la centrifugation sur les mitochondries.

La fig. 17 représente les distributions enzymatiques observées, en présence d'imipramine 0,1 mM. Les distributions

DESIPRAMINE

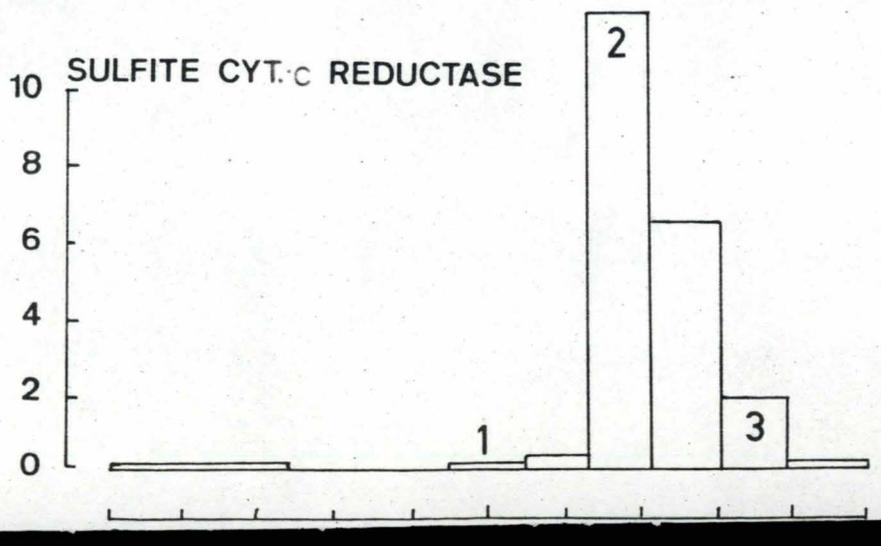
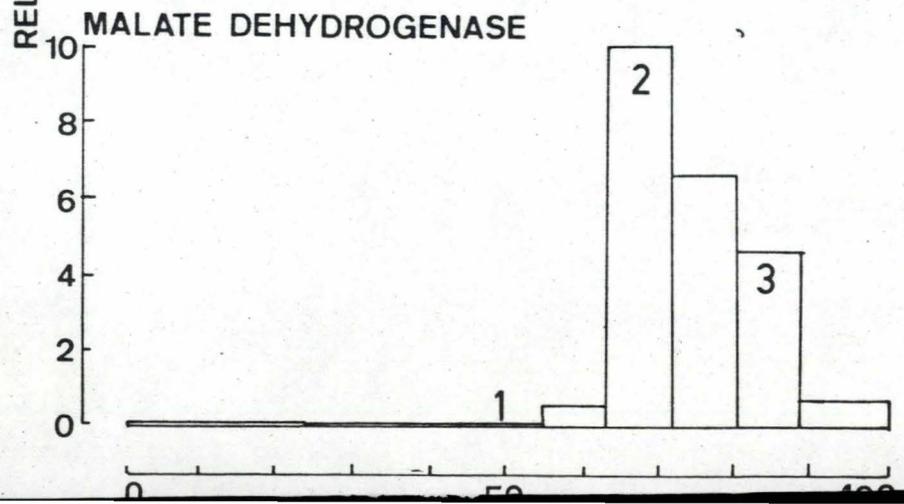
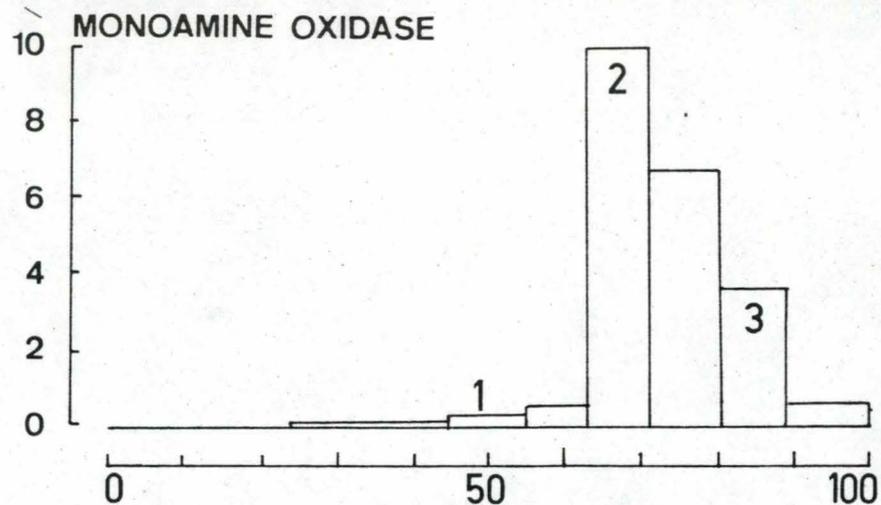
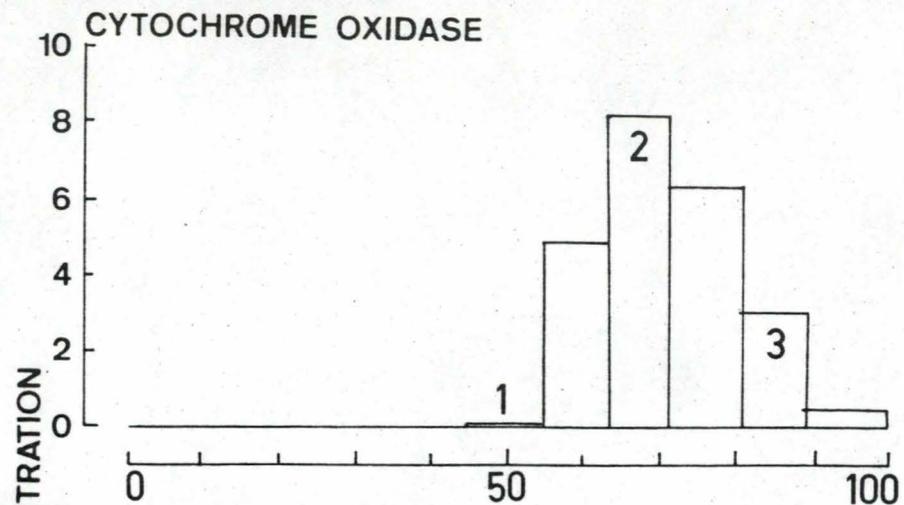
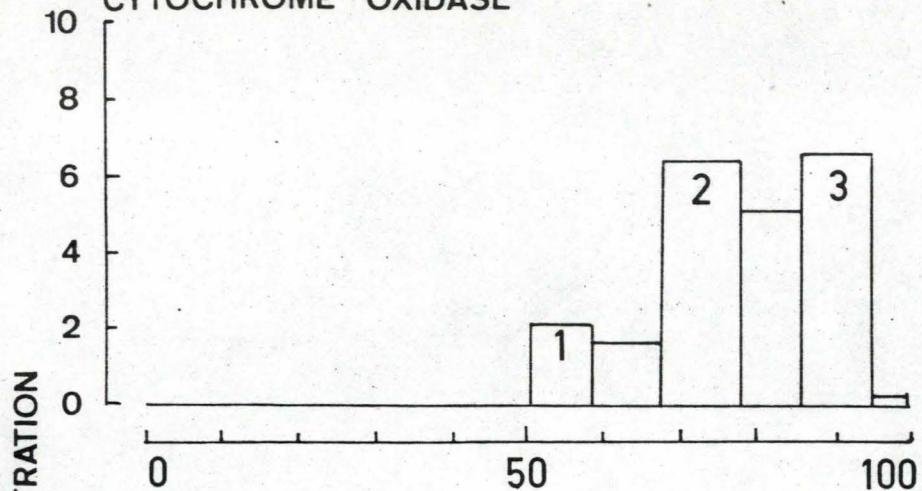


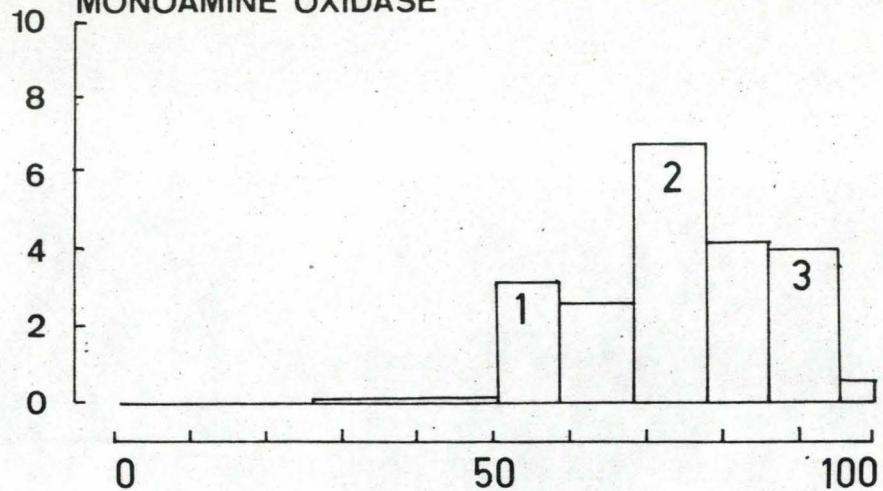
Figure 16: Distribution des enzymes de référence après centrifugation isopycnique d'une fraction mitochondriale (M+L) de foie de rat. La centrifugation a été réalisée à 65.000 t/min dans le rotor Spinco SW 65, pendant 60 minutes. Les limites du gradient de saccharose sont 1,09 g/cm<sup>3</sup> et 1,26 g/cm<sup>3</sup>. Les granules ont été mis en présence de désipramine 0,1 mM et déposés au sommet du gradient avant la centrifugation. Les récupérations sont de 98,9 % pour la cytochrome oxydase, 113 % pour la monoamine oxydase, 100,7 % pour la malate déshydrogénase et 123 % pour la sulfite cytochrome c réductase.

# IMIPRAMINE

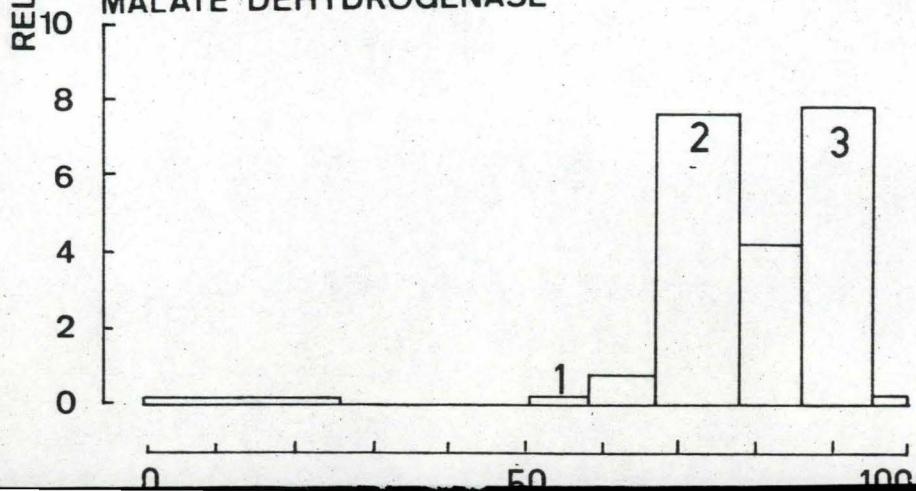
## CYTOCHROME OXIDASE



## MONOAMINE OXIDASE



## MALATE DEHYDROGENASE



## SULFITE CYT. C REDUCTASE

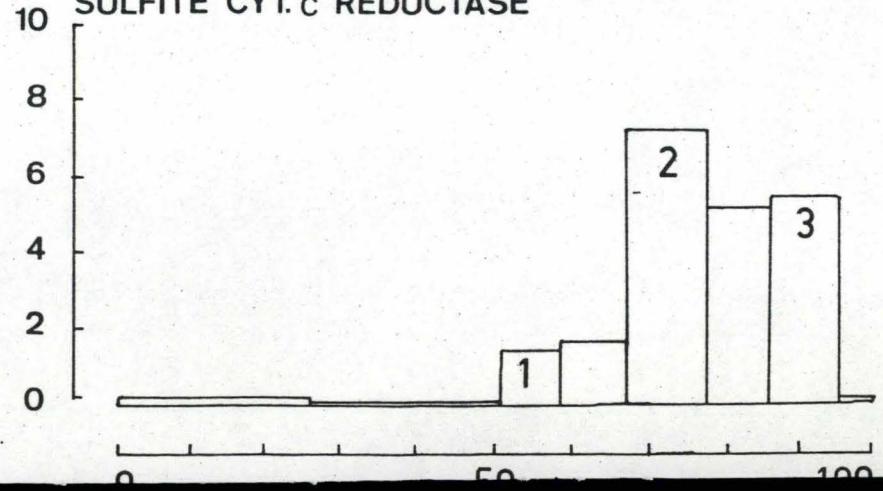


Figure 17: Distribution des enzymes de référence après centrifugation isopycnique d'une fraction mitochondriale (M + L) de foie de rat. La centrifugation a été réalisée à 65.000 t/min dans le rotor Spinco SW 65, pendant 60 minutes. Les limites du gradient de saccharose sont  $1,09 \text{ g/cm}^3$  et  $1,26 \text{ g/cm}^3$ . Les granules ont été mis en présence d'imipramine 0,1 mM et déposés au sommet du gradient avant la centrifugation. Les récupérations sont de 86 % pour la cytochrome oxydase, 103 % pour la monoamine oxydase, 93 % pour la malate déshydrogénase et 97 % pour la sulfite cytochrome c réductase.

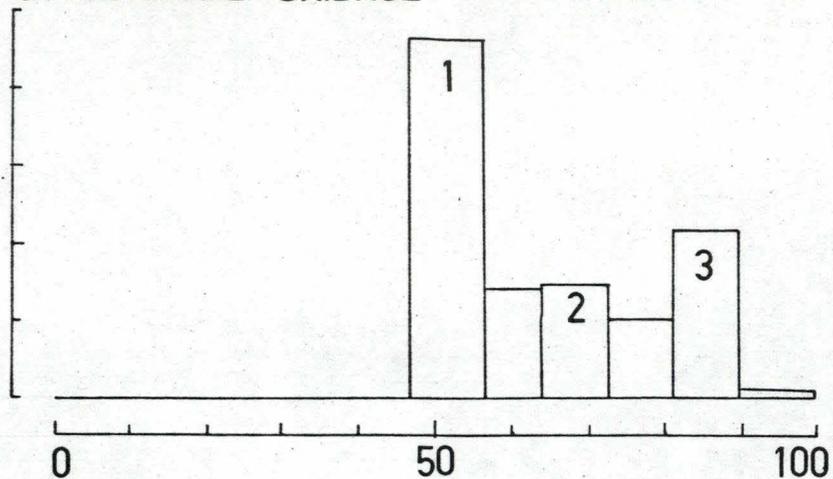
sont encore hétérogènes tout en étant sensiblement différentes de ce que l'on observe en absence de ce composé. Les deux enzymes membranaires ne sont plus aussi bien représentés dans la zone 1 mais ils sont nettement plus élevés dans les zones 2 et 3. Ceci conduit à une similitude plus marquée des distributions des quatre enzymes. Un tel résultat indique qu'en présence d'imipramine 0,1 mM la rupture des membranes mitochondriales a été moins prononcée. Cependant, on constate une quantité importante d'enzymes dans la zone 3; les mitochondries seraient plus denses, elles seraient effectivement gonflées mais garderaient en partie leur intégrité (17 ).

Dans la fig.18 , nous représentons les distributions obtenues lorsqu'on centrifuge en présence de méthylimipramine 0,1 mM. Les résultats sont semblables à ceux obtenus en absence de ce composé. De nouveau, il y a une nette dissociation entre les zones 1 ( enzymes attachés aux membranes) et les zones 2 et 3 (enzyme soluble de la matrice).

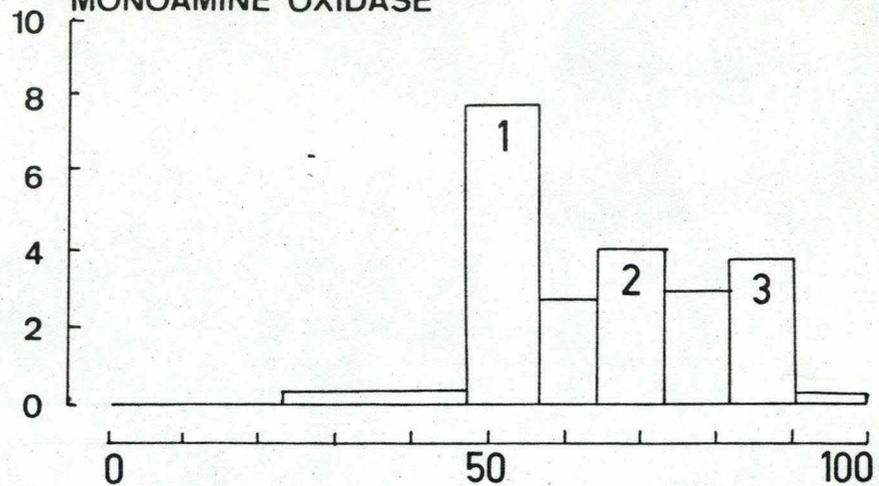
Donc en résumé, à concentrations égales, la désipramine peut protéger les membranes mitochondriales contre les effets de la centrifugation, l'imipramine également mais à un moindre degré, la méthylimipramine se révèle par contre inefficace.

# METHYLIMIPRAMINE

## CYTOCHROME OXIDASE



## MONOAMINE OXIDASE



## MALATE DEHYDROGENASE

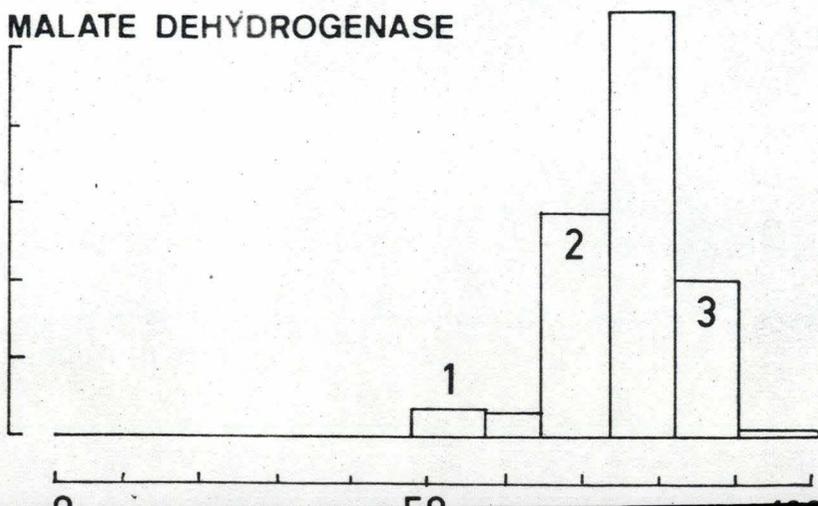


Figure 18: Distribution des enzymes de référence après centrifugation isopycniqne d'une fraction mitochondriale (M+L) de foie de rat. La centrifugation a été réalisée à 65.000 t/min dans le rotor Spinco SW 65 pendant 60 minutes. Les limites du gradient de saccharose sont 1,09 g/cm<sup>3</sup> et 1,26 g/cm<sup>3</sup>. Les granules ont été mis en présence de méthylmipramine 0,1 mM et déposés au sommet du gradient avant la centrifugation. Les récupérations sont de 60,74 % pour la cytochrome oxydase, 111 % pour la monoamine oxydase, 109 % pour la malate déshydrogénase.

### 3.2. Effet de la compression

La pression hydrostatique à laquelle les granules sont soumis lors d'une centrifugation semble être le facteur principal des détériorations des mitochondries (18)

Bronfman et Beaufay ( 18 ) ont mis en évidence l'effet de la pression en soumettant les granules à une compression dans une pression hydraulique. Disposant de l'appareillage fabriqué par ces auteurs, nous avons pu comparer les effets de la désipramine, de l'imipramine et de la méthylimipramine sur les mitochondries soumises à différentes pressions.

Les fig.19 et 20 rapportent les résultats de deux expériences, l'une où la préparation mitochondriale a été soumise à une pression de  $1000 \text{ kg/cm}^2$  et l'autre à une pression de  $1.500 \text{ kg/cm}^2$ . Trois concentrations de désipramine, d'imipramine et de méthylimipramine ont été utilisées: 0,1, 0,3 et 0,6 mM.

Nous avons mesuré l'activité libre de la sulfite cytochrome c réductase et celle de la malate déshydrogénase. Ces mesures ont été réalisées 1) sur des mitochondries n'ayant pas subi l'effet de la presse (I)

2) sur des mitochondries ayant subi l'effet de la presse mais en absence de drogue (II)

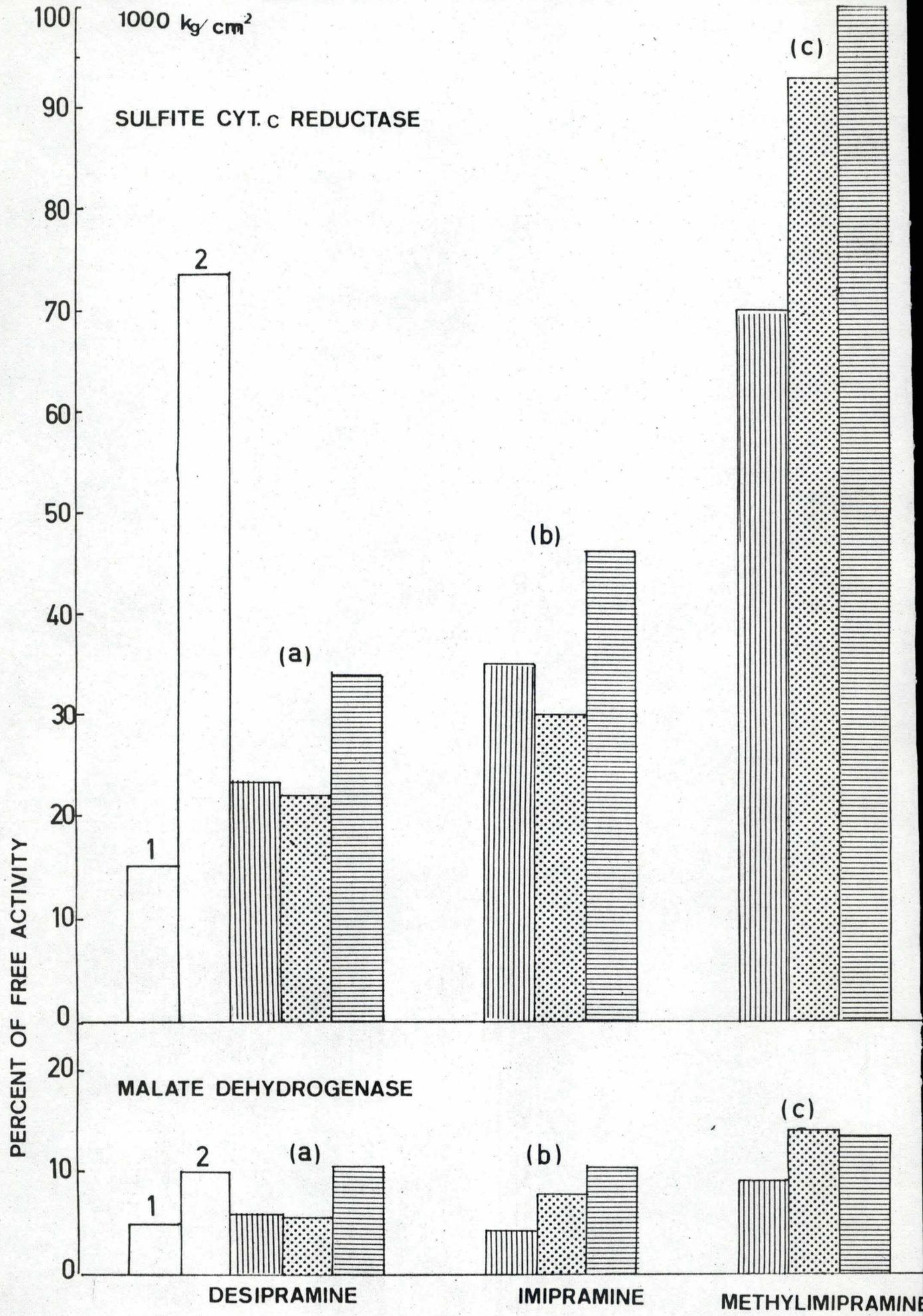


Figure 19: Effet d'une pression de  $1.000 \text{ kg/cm}^2$  sur une préparation mitochondriale (M+L). Les activités des deux enzymes sont exprimées en pourcent des activités totales. Ces mesures ont été faites sur des mitochondries n'ayant pas subi l'effet de la presse (1) sur des mitochondries ayant subi l'effet de la presse en absence de drogue (2), sur des mitochondries ayant subi l'effet de la presse en présence de désipramine (a) aux concentrations respectives de 0,1, 0,3 et 0,6 mM; sur des mitochondries ayant subi l'effet de la presse en présence d'imipramine (b) aux concentrations respectives de 0,1; 0,3 et 0,6 mM; sur des mitochondries ayant subi l'effet de la presse en présence de méthylimipramine (c) aux concentrations respectives de 0,1; 0,3 et 0,6 mM.

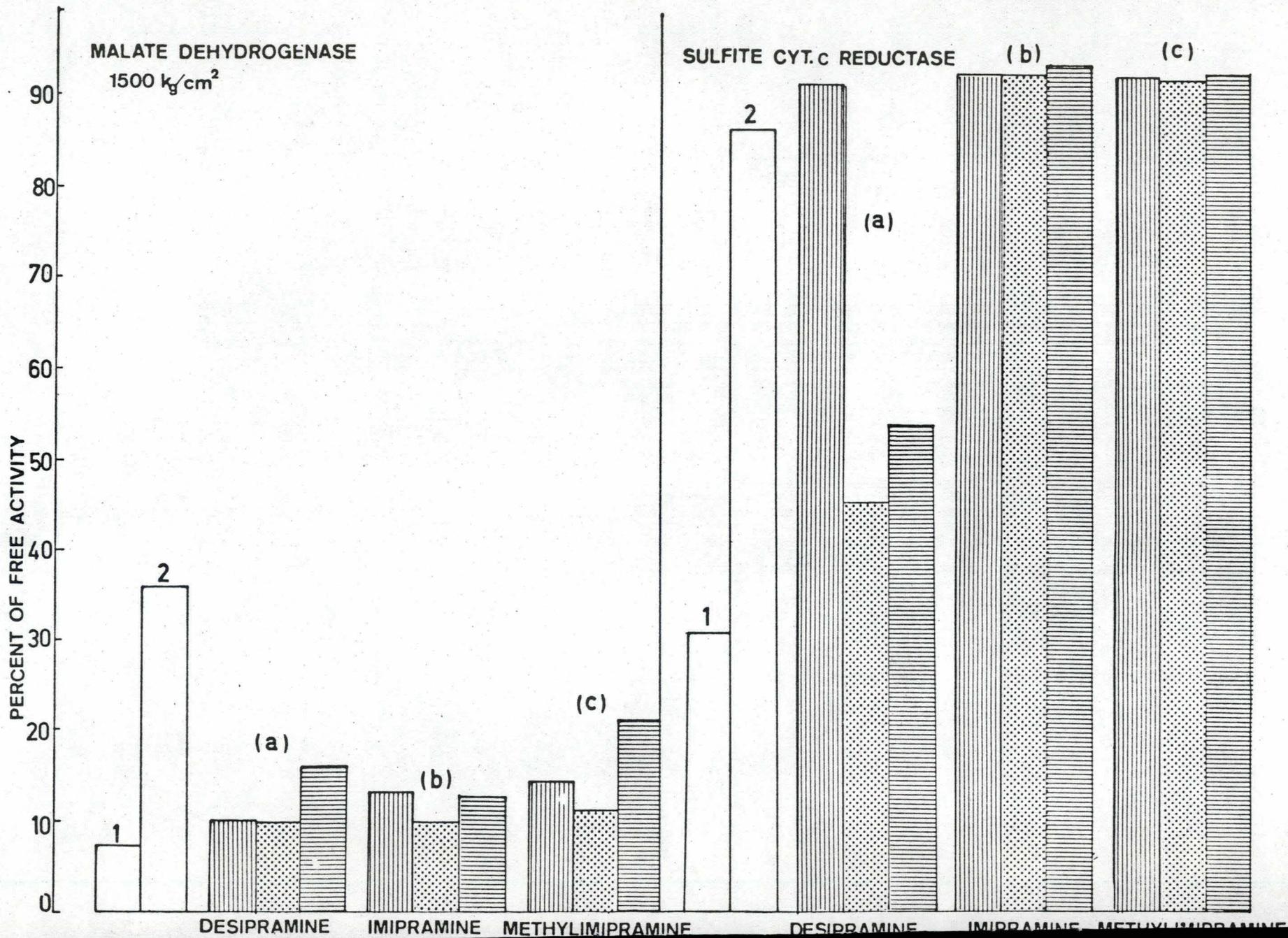


Figure 20: Effet d'une pression de  $1500 \text{ kg/cm}^2$  sur une préparation mitochondriale (M+L). Les activités des deux enzymes sont exprimées en pourcent des activités totales. Ces mesures ont été faites sur des mitochondries n'ayant pas subi l'effet de la presse (1) sur des mitochondries ayant subi l'effet de la presse en absence de drogue (2), sur des mitochondries ayant subi l'effet de la presse en présence de désipramine (a) aux concentrations respectives de 0,1, 0,3 et 0,6 mM; sur des mitochondries ayant subi l'effet de la presse en présence d'imipramine (b) aux concentrations respectives de 0,1, 0,3 et 0,6 mM; sur des mitochondries ayant subi l'effet de la presse en présence de méthylimipramine (c) aux concentrations respectives de 0,1, 0,3 et 0,6 mM.

- 3) sur des mitochondries ayant subi l'effet de la presse et en présence de l'une des trois drogues à concentration déterminée.

Une pression de  $1000 \text{ kg/cm}^2$  augmente très peu l'activité libre de la malate déshydrogénase ( fig 19 ,comparaison entre I et II pour cet enzyme). Par conséquent, l'effet éventuel des composés essayés dans ce cas s'avère difficile à apprécier. Par contre, l'activité libre de la sulfite cytochrome c réductase est considérablement augmentée. La désipramine à une concentration 0,1 et 0,3 mM inhibe très nettement ce phénomène et une protection de la latence est encore très nette en présence d'une concentration 0,6 mM de composé. L'imipramine exerce une action comparable mais semble un peu moins efficace. Par contre la méthylimipramine 0,1 mM n'a pas d'effet; à une concentration plus élevée, elle semble même favoriser l'effet de la pression.

Une pression de  $1500 \text{ kg/cm}^2$  élève de façon nette l'activité libre de la malate déshydrogénase (fig.20 comparaison entre I et II pour cet enzyme). Ceci est possible si la membrane interne a subi une détérioration appréciable, ce qui ne s'observait pas à pression inférieure. Les trois com-

posés à des concentrations de 0,1 et de 0,3 mM, contrecarrent cet effet de la pression; dans ces conditions, en effet, la malate déshydrogénase libre n'est qu'un peu plus élevée qu'avant la compression. Une concentration 0,6 mM est un peu moins efficace surtout pour la méthylimipramine. L'activité libre de la sulfite cytochrome c réductase est fortement augmentée par la compression des granules. Seule la désipramine aux concentrations 0,3 et 0,6 mM peut s'opposer jusqu'à un certain point, à l'effet de pression. Les deux autres composés s'avèrent inefficace pour une telle compression.

### 3.3. Discussion

Nous discuterons d'abord les résultats des expériences de compression, les résultats des centrifugations en découlant dans une large mesure.

Il a été proposé que la pression détériorait les membranes mitochondriales en augmentant la température de transition des lipides membranaires (19) c.à.d. le passage de l'état liquide cristallin à l'état gel cristallin. Ce qui provoque une diminution du volume. La pression en augmentant la température de transition des lipides membranaires provoque une congélation de ceux-ci à une température plus élevée et par conséquent des séparations de phase ; celle-ci peut s'accompagner d'une augmentation brusque de la perméabilité (20). Il en résulte une entrée de saccharose dans la mi-

tochondrie, un gonflement osmotique et une lyse éventuelle du granule. Cette hypothèse vient de recevoir un appui expérimental important, en effet, il a été démontré que des séparations de phase apparaissaient dans les membranes de mitochondries soumises à des pressions de 1.000 et 1.500 kg/cm ( 21 ).

La désipramine, l'imipramine et la méthylimipramine sont toutes trois capables de protéger la membrane mitochondriale interne contre les effets de la pression. La façon la plus simple d'expliquer leur action est, en fonction de ce que nous venons de dire, de supposer qu'elles diminuent la température de transition des lipides membranaires. Or, on a montré que la désipramine et l'imipramine abaissaient la température de transition des systèmes lipidiques artificiels ( 12 ). On peut donc raisonnablement supposer qu'il en est de même pour les lipides mitochondriaux . A cela pourrait d'ailleurs venir s'ajouter un autre effet: des substances comparables à celles que nous avons utilisées peuvent augmenter le volume critique des hématies et les rendre ainsi plus résistantes au gonflement osmotique ( 1 ). La désipramine et ses dérivés pourraient agir de même sur les mitochondries.

La différence d'effet sur la membrane externe est assez complexe à interpréter vu la dépendance éventuelle existant entre

le gonflement de la mitochondrie (donc l'altération de sa membrane) et la rupture de la membrane externe. Constatons simplement qu'on retrouve dans une certaine mesure les différences observées dans de l'activation à 37°C; la désipramine protège la membrane, l'imipramine la protège moins et la méthylimipramine n'a aucun effet.

Comme nous l'avons dit la détérioration des membranes mitochondriales au cours d'une centrifugation est avant tout due à la pression hydrostatique (17 ). On devrait donc s'attendre à une certaine corrélation entre les résultats des expériences de compression et de centrifugation. Effectivement la désipramine et dans une moindre mesure l'imipramine protègent les mitochondries contre les effets de la centrifugation. La méthylimipramine est inefficace alors qu'elle protège jusqu'à un certain point la membrane interne dans les expériences de compression. Notons que c'est la seule des trois substances qui ne protège aucunement la membrane externe. Cela pourrait signifier que l'état de la membrane externe est également important au cours d'une centrifugation pour que la mitochondrie garde son intégrité.

### CONCLUSION

Le tableau II schématise l'effet qu'ont les trois substances sur les systèmes membranaires dans les conditions où nous les avons étudiées. Il ne concerne que l'effet stabilisant qui croyons-nous est le plus intéressant à considérer. Manifestement c'est la désipramine qui semble la plus efficace, l'imipramine venant en deuxième lieu et la méthylimipramine en troisième. Deux types de différences existent entre ces trois substances: la charge et le nombre de méthyles fixés sur le groupement aminé.

En ce qui concerne la charge, rappelons que la désipramine et l'imipramine existent sous deux formes: l'une pro-

Tableau II . Effet stabilisant des trois substancesProtection de la membrane interne

	Désipramine	Imipramine	Méthylimipramine
Activation	++	++	++ (mais concentrations plus élevées)
Pression	++	++	+ ±
Centrifugation	++	+	0

Protection de la membrane externe

	Désipramine	Imipramine	Méthylimipramine
Activation	++	0	0
Pression	++	+	0
Centrifugation	++	+	0

tonée positivement et l'autre non chargée. A un même pH, le rapport forme chargée/ forme non chargée sera plus grand pour la désipramine. La méthylimipramine n'existe que sous une forme chargée positivement. Il semble donc que les effets observés ne sont pas fortement dépendants de la charge puisqu'ils sont moins marqués globalement par la méthylimipramine. Mais on observe une certaine corrélation avec le nombre de méthyles, l'effet protecteur étant plus ou moins inversement proportionnel au nombre de méthyles. De toute façon, il semble évident que le côté aliphatique de ces molécules est très important. Cater a en effet montré que l'iminodibenzyl n'a pas d'effet sur la température de transition des lipides, bien que la structure moléculaire soit la même excepté l'absence de la partie aliphatique ( 12 ).

Nos résultats illustrent les effets que peuvent avoir des substances neurotropiques sur les membranes subcellulaires. Le plus intéressant est peut être le fait que l'interaction qui s'établit entre les membranes et ces composés est telle que ces membranes peuvent être protégées contre des processus apparemment aussi différents que l'action des phospholipases endogènes et celle de la pression hydrostatique. Ces phénomènes se comprennent si l'on admet, comme d'ailleurs des

expériences le prouvent (22) que ces substances se fixent sur la partie lipidique des membranes. Il a par exemple été démontré que l'imipramine se fixe sur les membranes subcellulaires du foie de rat proportionnellement à leur teneur en phospholipides (3), que des drogues amphiles semblables réagissent fortement avec les phospholipides (23). Dès lors on comprend que ces composés puissent stabiliser les membranes dans des conditions bien différentes. L'interaction avec les phospholipides peut les rendre plus résistantes aux phospholipases; elle peut d'autre part modifier leur propriétés physico-chimiques au point de les rendre plus fluide, de diminuer leur température de transition.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 - SEEMAN, P. (1972) *Pharmacol. Rev.* 24, 583-655.
- 2 - WATTIAUX-DE CONINCK, S., DUBOIS, F. et WATTIAUX, R. (1974) *Eur. J. Biochem.* 48, 407-416.
- 3 - DUTRIEUX, L.M. (1976) *Mémoire*.
- 4 - de DUVE, C., PRESSMAN, B.C., GIANETTO, R., WATTIAUX, R et APPELMANS, F. (1955) *Biochem. J.*, 60, 604-617.
- 5 - WATTIAUX-DE CONINCK, S. et WATTIAUX, R. (1971) *Eur. J. Biochem.* 19, 552-556.
- 6 - SCHNAITMAN, C. et GREENAWALT, J.W. (1968) *J. Cell Biol.* 38, 158-175.
- 7 - BAUDHUIN, P., BEAUFAY, H., RAHMAN-LI, Y., SELLINGER, O.Z., WATTIAUX, R., JACQUES, P. et de DUVE, C. (1964) *Biochem. J.* 92, 172-184.
- 8 - WAITE, M., VAN DEENEN, L.L.M., RUIGROK, T.J.G. et ELBERS, P.F. (1969) *Journal of Lipid Research* 10, 599-608.
- 9 - FRENCH, S.W., NORUM, M.L., IHRIG, T.J. et TODOROFF, T. (1971) *Laboratory Invest.* 25, 427-434.

- 10 - SEPPALA, A.J., SARIS, M.E.L. et GAUFFIN, M.L. (1971)  
Biochem. Pharmacol. 20, 305-313.
- 11 - SCARPA, A. et LINDSAY, G. (1972) Eur.J.Biochem. 27, 401-407.
- 12 - CATER, B.R., CHAPMAN, D., HAWES, S.M. et SAVILLE, J. (1974)  
Biochim.Biophys.Acta 363, 54-69.
- 13 - APPELMANS, F. et de DUVE, C. (1955) Biochem.J. 59, 426
- 14 - WEGLIICKI, W.B., RUTH, R.C. OWENS, K., GRIFFIN, H.D. et WAITE, B.M. (1974) Biochim.Biophys.Acta 337, 145-152
- 15 - BERTHET, J et de DUVE, C. (1951) Biochem.J. 50, 175-181
- 16 - BEAUFAY, H. et de DUVE, C. (1959) Biochem.J. 73, 604-609.
- 17 - WATTIAUX, R., WATTIAUX-DE CONINCK, S. et RONVEAUX-DUPAL, M.F. (1971) Eur.J.Biochem. 22, 31-39.
- 18 - BRONFMAN, M. et BEAUFAY, H. (1973) FEBS Letters 36, 163-168.
- 19 - WATTIAUX-DE CONINCK, S., RONVEAUX-DUPAL, M.F., DUBOIS, F., WATTIAUX, R. (1973) Eur.J.Biochem. 39, 93.
- 20 - ELHANEZ, M., DE GIER, J. et VAN DER NEUT-KOK, E.C.M. (1973)  
Biochim.Biophys.Acta 298, 500-512.

- 21 - WATTIAUX-DE CONINC, S., DUBOIS, F. et WATTIAUX, R.  
Résultats non publiés.
- 22 - DUTRIEUX, L.M. (1976) Mémoire et BRONFMAN, M. Thèse (1975)
- 23 - SEYDEL, J.K., WASSERMANN, O. (1976) Biochem. Pharmacol. 25,  
2357-2364.
- 24 - de DUVE, C., BERTHET, J. et BEAUFAY, H. (1959) Progr. Biophys.  
Chem. 9, 325-369.
- 25 - de DUVE, C. et BERTHET, J. (1953), Nature, 172, 1142.