



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Influence de la naftazone sur les lysosomes de foie de rat

Adam, Emmanuelle

Award date:
1989

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.

250889

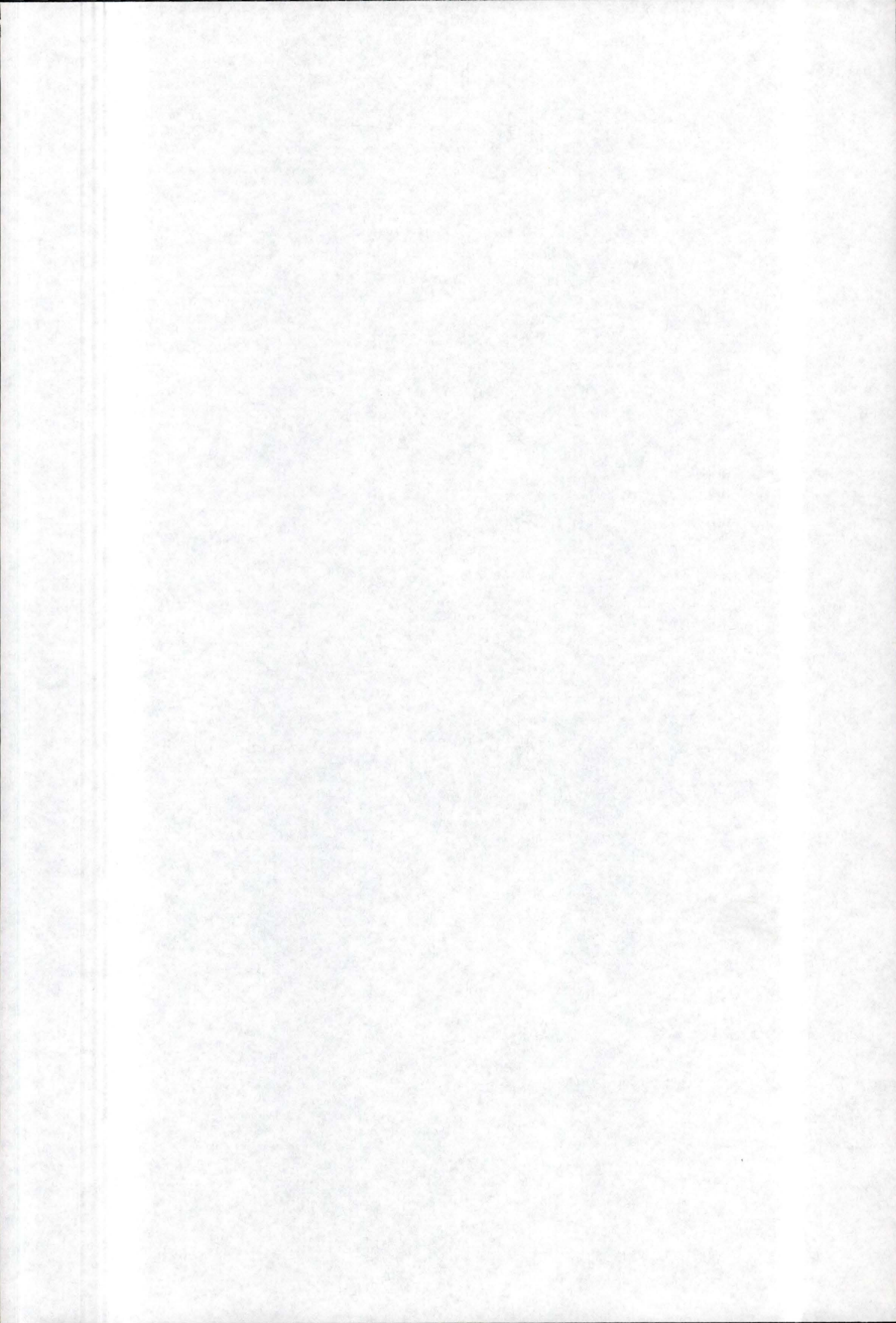
Département de Chimie Physiologique

Professeur : S. Wattiaux-De Coninck

INFLUENCE DE LA NAFTAZONE
SUR LES LYSOSOMES DE FOIE DE RAT

Emmanuelle ADAM

Année 1988-1989



Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix Facultés des Sciences

Rue de Bruxelles, 61
B-5000 NAMUR. BELGIUM

Tél 081-22 90 61
Télex 59222 facnam-b
Téléfax 081- 23 03 91

Mémoire de licence en Sciences Biologiques
Septembre 1989
Laboratoire de Chimie Physiologique
Professeur S. Wattiaux-De-Coninck

INFLUENCE DE LA NAFTAZONE SUR LES LYSOSOMES DE FOIE DE RAT

Emmanuelle ADAM

Résumé

On note dans le plasma de patients variqueux, une augmentation de l'activité des enzymes lysosomales. Une telle augmentation est réduite par l'administration de NAFTAZONE (naphtoquinone-2-semicarbazone). Il a été proposé que les propriétés thérapeutiques de la Naftazone pourraient résulter d'un effet de ce composé sur la membrane lysosomale.

In vivo, les résultats de la distribution intracellulaire dans le foie de rat montrent, qu'à faible dose, la Naftazone se localise, préférentiellement, par ordre décroissant, dans le cytoplasme, la membrane plasmique et les lysosomes; à forte dose, elle se maintient dans la membrane plasmique et apparaît dans les mitochondries. *In vitro*, lorsqu'une fraction ML de foie de rat est incubée en présence de Naftazone, la localisation de celle-ci se fait plutôt en faveur des lysosomes que des mitochondries.

D'un autre côté, des expériences d'activation d'une fraction ML préincubée en présence de glucose isotonique montrent, qu'à une concentration de 0,25 mM, la Naftazone est capable de réduire les dommages encourus par la membrane lysosomale (mesurés par le démasquage de la N-acétylglucosaminidase, de la cathepsine C, de l'arylsulfatase et de la phosphatase acide).

Finalement, des expériences préliminaires de "binding" de la Naftazone sur la membrane de lysosomes hautement purifiés ont été tentées.

Abstract

An increase in the level of lysosomal enzymes activities has been described in blood plasma of patients suffering from varicose vein. This increase is markedly reduced after a treatment with NAFTAZONE (naphtoquinone-2-semicarbazone). It has been proposed that this property of Naftazone could be explained by its effect on the lysosomal membrane.

Experiments performed *in vivo* show that, after injection of a low dose of Naftazone, its intracellular distribution is, in decreasing order, cytosol, plasma membrane and, to a lower extend, lysosomal compartment. When a high dose of Naftazone is injected, it is colocalized with plasma membrane markers and appears in mitochondria. When a ML fraction prepared from rat liver is incubated *in vitro* with Naftazone, this compound is recovered in lysosomes rather than in mitochondria.

On the other hand, 0,25 mM Naftazone is able to reduce lysosomal membrane damage (measured by the loss of latency of N-acetylglucosaminidase, cathepsine C, arylsulfatase and acid phosphatase) induced by a preincubation of a rat liver ML fraction with isotonic glucose.

We also report preliminary experiments on binding of Naftazone onto the membrane of highly purified lysosomes.

INTRODUCTION : La maladie veineuse

"Dans l'inconscient collectif est solidement ancrée l'idée que l'Homo Erectus, lorsqu'il adopta la position debout a dans le même temps transmis à sa descendance un legs moins enviable, la MALADIE VEINEUSE" (Dr Niebes)

Longtemps, la maladie veineuse, en raison de son caractère insidieux, fut considérée comme une pathologie "mineure".

Or aujourd'hui, des études épidémiologiques ainsi que les progrès réalisés dans l'approche tissulaire, cellulaire et moléculaire de cette pathologie sont à même de réfuter cette appellation fallacieuse.

Il est un fait que les désordres hémodynamiques participent à l'installation de la maladie, mais comme le rappelle Leriche, "c'est dans l'intimité du tissu que tout se joue", bien avant que cela ne soit cliniquement visible. Des études comparées des caractéristiques structurales, ultrastructurales et histochimiques de la paroi de la veine pathologique et de la veine saine permettent d'affirmer l'existence, chez tous les sujets atteints de l'affection, d'un tissu VEINEUX CONSTITUTIONNELLEMENT LESE.

A l'origine, nombre d'auteurs mettent en cause une mauvaise donne tissulaire des structures veineuses et périveineuses, probablement transmise par voie génétique. Ce tissu de médiocre qualité confère aux vaisseaux une baisse de tonus et une vulnérabilité extrême (Niebes *et al.*, 1983, 1986). Sur le plan fonctionnel, les désordres histochimiques préexistants rendent impossible l'adaptation des vaisseaux à l'homéostasie circulatoire. Résultat, la stase s'installe avec par voie de conséquence anoxie locale, oedème, souffrance cellulaire, inflammation, augmentation de l'activité des enzymes protéolytiques,... autant de phénomènes qui s'enchaînent inéluctablement car auto-entretenus et qui mettent en place le cercle vicieux.

Dès lors chez les sujets ainsi prédisposés de multiples facteurs favorisants vont greffer leur action sur ce substrat pathologique :

- obésité, sédentarité,
- grossesse, contraceptifs oraux,
- âge,
- station debout ou assise prolongée,
- sources de chaleur excessive

(exposition au soleil, bains chauds,...)

- habitudes vestimentaires (vêtements moulants, hauts talons,...)

pour ne citer que les plus importants.

Finalement on se rend compte, que dans la maladie veineuse, véritable maladie sociale, l'unité tissulaire de base, constituée du tissu capillaire, du tissu lymphatique et des tissus interstitiels et de soutien, est le siège d'altérations qui interagissent en permanence, autoentretiennent et aggravent l'affection.

L'origine : une distribution tissulaire défectueuse

I. Le tissu conjonctif : rappel histologique (Wheater, P.R., H.G. Burkitt, Daniels, V.G. (1979))

Le terme de tissu conjonctif s'applique à un tissu élémentaire d'origine mésodermique, support structural et métabolique des autres organes et tissus du corps. Le tissu conjonctif est la voie de passage des vaisseaux sanguins; il régule, par ailleurs, les échanges métaboliques entre les tissus et la circulation sanguine. Le squelette est essentiellement constitué par des formes rigides du tissu conjonctif, le cartilage et l'os. Les fonctions métaboliques du tissu conjonctif interviennent de façon active dans les mécanismes de défense de l'organisme contre les micro-organismes pathogènes. Le processus de réparation constitue une des fonctions essentielles du tissu conjonctif. Il est formé de deux constituants principaux : les **cellules** et le **milieu extracellulaire**.

On peut différencier les **cellules** du tissu conjonctif en trois types selon leur fonction essentielle.

1) Les cellules responsables de la synthèse et du maintien du matériel extracellulaire. Ce sont les fibroblastes qui dérivent de cellules précurseurs du tissu conjonctif primitif, le **mésenchyme**.

2) Les cellules responsables du stockage et du métabolisme des graisses. Ces cellules, les adipocytes, constituent le tissu adipeux.

3) Les cellules responsables des processus de défenses immunitaires.

Le **matériel extracellulaire** conditionne les propriétés physiques de chaque sorte de tissu conjonctif. Ce matériel est constitué d'une matrice organique, la **substance fondamentale** dans laquelle baignent les fibres. Cette substance est amorphe, transparente et possède les propriétés d'un gel semi-fluide. Ce tissu fluide fait intimement partie de la

substance fondamentale réalisant ainsi un milieu de passage des particules et participant aux échanges métaboliques avec la circulation sanguine. La substance fondamentale est essentiellement constituée de chaînes parallèles d'acides ploy-saccharidiques liés à des protéines. Ces substances traditionnellement appelées **muco-polysaccharides** répondent maintenant au terme plus précis de **glycosaminoglycanes**. L'acide **hyaluronique** combiné à 2 % de protéines est le principal glycosaminoglycane de la substance fondamentale du tissu conjonctif. Ces grosses molécules intimement liées confèrent au tissu conjonctif ses propriétés physiques elles-mêmes renforcées par la présence des fibres. La substance fondamentale, du fait de ses propriétés physiques, constitue une barrière s'opposant à la dissémination des micro-organismes; toutefois, certaines bactéries pathogènes élaborent une enzyme, la **hyaluronidase**, pouvant faciliter leur dissémination. La substance fondamentale contient, en plus des glycosaminoglycanes, des protéines solubles et des glycoprotéines qui peuvent participer à l'orientation et à la réalisation des éléments fibrillaires.

Les composants fibrillaires du tissu conjonctif sont le **collagène**, la **réticuline** et l'**élastine**. Les fibres sont présentes dans tous les tissus conjonctifs mais en proportions variables. La classification des tissus conjonctifs dépend de la nature de la fibre prédominante. Le collagène qui est le composant le plus fréquent, peut être lâche ou dense suivant la fonction métabolique. La régularité et la disposition des fibres de collagène varient selon la fonction tissulaire. La réticuline constitue un fin réseau dans le foie, les ganglions lymphatiques et les glandes endocrines. Les tissus conjonctifs élastiques ont pour constituant principal une protéine au pouvoir élastique marqué, se présentant sous forme de fibres ou de faisceaux discontinus, l'**élastine**.

II. Le système veineux : rappel histologique (Wheater, P.R., H.G. Burkitt, Daniels, V.G. (1979))

Excepté les constituants veineux de la microcirculation, le système veineux fonctionne essentiellement comme un système collecteur à basse pression assurant le retour du sang du lit capillaire vers le coeur.

Dans les veines, le courant sanguin se fait passivement en raison d'un gradient de pression vers le coeur. A chaque inspiration, une pression négative est créée dans le thorax et par la suite dans l'oreillette droite. Le retour veineux à partir des extrémités est facilité par la contraction des muscles squelettiques qui compriment les veines. A chaque expiration, les gradients de pression sont inversés et le sang tend à circuler en sens contraire. Ce retour est empêché par la présence de valves dans les veines de moyen diamètre.

La structure du système veineux est conforme à la structure générale de tout le système circulatoire, mais les constituants élastiques et musculaires sont moins importants. Les

variations relatives du volume veineux, dues par exemple à la dilatation du lit capillaire ou à une hémorragie peuvent être compensées par des changements dans la capacité du système veineux. Ces changements sont sous la dépendance du muscle lisse de la média qui contrôle le diamètre de la lumière des veinules et des veines.

A La paroi veineuse normale

On distingue trois tuniques dans la paroi veineuse : l'intima, la média et l'adventice.

a) L'intima : elle est composée d'une couche de cellules endothéliales bordant la surface interne du vaisseau dont les replis forment des valvules qui facilitent le retour veineux en s'opposant au reflux sanguin.

b) La média : elle est constituée de couches concentriques de cellules musculaires lisses avec, interposées entre elles, des quantités variables de fibres élastiques, de fibres de collagène et de protéoglycanes.

L'épaisseur de cette tunique, l'élément musculaire du vaisseau, et le rapport quantitatif entre le collagène et les myocytes diffèrent en fonction de la veine considérée.

c) L'adventice: elle comprend principalement des fibres de collagènes et des fibres élastiques orientées longitudinalement.

Le collagène de l'adventice est de type I alors que dans la média, il est principalement de type III. Le tissu conjonctif de l'adventice, par sa capacité de soutien, peut résister à la pression hydrostatique tout en restant lâche. Il permet ainsi au vaisseau d'adapter sans cesse son calibre aux variations du débit cardiaque.

B La paroi veineuse anormale

1. Dans la maladie veineuse, les trois tuniques sont le siège d'altérations intéressant toutes les structures tissulaires.

L'intima : Les valvules sont, au stade initial, indemnes; toutefois l'intima est très épaissie (Bourier *et al.*, .1978)

La média : elle est désorganisée et caractérisée par une augmentation marquée du tissu interstitiel (principalement des protéoglycans) dans lequel on peut observer des protéines anormales (Niebes, 1983). On dénote également la fragmentation des fibres

d'élastine, la perte d'orientation longitudinale des cellules musculaires lisses qui sont déformées et étriquées et de sévères perturbations au niveau du collagène.

L'adventice: étant majoritairement constituée de fibres de collagène, est aussi altérée (perturbations de même nature que celles de la média)

2. Altération des fibres du tissu conjonctif : approche histologique et biochimique.

Le tissu conjonctif est prédominant dans la veine. Ceci est en parfait accord avec la finalité fonctionnelle du vaisseau, étant donné que c'est la composante conjonctive qui confère au système vasculaire sa souplesse et sa résistance.

a) Rappel

Le tissu conjonctif que l'on retrouve dans la veine est, comme nous l'avons précédemment décrit, caractérisé par une matrice intracellulaire résistante composée de 4 types de macromolécules :

- des fibres de collagène : constituées par du collagène de type I et III et représentant 51 % des constituants de la veine;
- des fibres d'élastine (elles représentent 11 %);
- des protéoglycanes (complexes de protéines avec des mucopolysaccharides acides);
- des glycoprotéines de structure.

Ces différents constituants sont imbriqués les uns dans les autres et représentent 60 % du poids sec de la veine (Robert, L. (1975)).

b) Données histologiques et biochimiques

Dans les veines variqueuses, l'abondance relative de ces diverses substances n'est pas significativement différente. En revanche, il existe de sévères altérations d'ordre qualitatif, intéressant la structure et la répartition de ces éléments :

- on dénote une baisse du collagène insoluble constitutif des fibres bien formées : son taux tombe à 32 % contre 53 % dans la veine saine (Niebes, 1989). Les fibres de collagène bien polymérisées ont diminué au profit d'autres gonflées ou à fibrilles tordues (Zwillenberg *et al.*, 1971).
- Dans certains cas, l'élastine apparaît immature et non compacte.
- Quant à la substance fondamentale, formé de protéoglycanes et de glycoprotéines, on y relève une augmentation de 29 % de glycosaminoglycanes avec une augmentation de 76 % de l'acide hyaluronique (Niebes, 1989).

3. Panorama des altérations tissulaires :

Dans la maladie veineuse, la perte des capacités d'adaptation et de soutien du tissu veineux sont à l'origine d'une hyperpression et d'une stase veineuse qui d'abord transitoires, deviennent progressivement définitives. Les altérations tissulaires se retrouvent à tous les niveaux de "l'arbre" vasculaire :

- Au niveau du tissu capillaire, le ralentissement du flux sanguin cause l'augmentation de la viscosité sanguine. Le manque d'oxygénation et d'épuration contribuent à l'installation d'un état d'anoxie locale. Il s'ensuit que la membrane des hématies et des plaquettes s'altèrent et ces éléments s'agrègent. Une fuite plasmique, cellulaire et protéique se produit au niveau de ces capillaires dont l'assise épithéliale distendue est devenue anormalement perméable et nettement moins résistante à la pression anguine.
- Au niveau du tissu lymphatique, cette extravasation excessive "déborde" la capacité de résorption des canalicules. Par voie de conséquence un oedème tissulaire lymphatique riche en éléments agressifs se constitue, renforçant les déséquilibres biochimiques locaux.
- Au niveau du tissu interstitiel et du tissu de soutien, apparaissent d'une part des perturbations du métabolisme tissulaire et, d'autre part, une altération de la stabilité structurelle de l'ensemble.
En effet, il se produit une détérioration des échanges veine-tissu : les consommations d'O₂ et de glucose sont respectivement 3 fois et 2 fois moindre, par contre les déchets métaboliques, le CO₂ et le lactate, eux s'accumulent. Ces conditions favorisent l'installation d'une hypoxie sévère.

Le métabolisme oxydatif est détourné en faveur de la glycolyse anaérobie avec pour conséquence une baisse de production d'ATP d'où une diminution de l'activité trophique du tissu interstitiel.

Dans ce contexte de pression intratissulaire et d'acidose, les mastocytes éclatent et libèrent par dégranulation des médiateurs, tels l'histamine, la sérotonine, la bradykinine, des leucotriènes et du PAF acéther. Ces facteurs renforcent le développement de l'oedème et la création de foyers inflammatoires déjà favorisés par les leucocytes de la première vague d'extravasation plasmatique et les macrophages, attirés dans les tissus pour phagocyter les protéines de haut poids moléculaire; des enzymes lysosomiales et de radicaux libres vont être également libérés par les macrophages et les polymorphonucléaires. Ces éléments ainsi que les facteurs pro-inflammatoires vont contribuer aux altérations cellulaires et tissulaires engendrées lors de la maladie veineuse.

4. Altérations cellulaires et des structures subcellulaires:

Dans la maladie veineuse, il y a donc localement une diminution de l'apport en oxygène mais aussi une réduction du flux sanguin, ce qui provoque un ralentissement du transport des nutriments vers la cellule et une accumulation des déchets du métabolisme cellulaire (CO₂, lactate).

Les changements qui apparaissent alors au niveau cellulaire lors de cette ischémie locale sont de 3 types :

- altération de la régulation du volume cellulaire
- altération du métabolisme énergétique
- libération des hydrolases acides.

4.1. Altération de la régulation du volume cellulaire

Dans la cellule des mammifères, la composition ionique intracellulaire diffère fortement de celle du fluide extracellulaire : le milieu intracellulaire inclut une concentration élevée de protéines chargées négativement. La membrane plasmique permet le transport passif d'ions intracellulaires et extracellulaires. Le maintien des différences de concentration ioniques résulte d'une balance délicate entre le transport passif et le transport actif des ions.

Plus précisément cette balance dépend de l'intégrité du système de transporteurs du gradient électrochimique et du flux d'énergie. Des changements dans chacun de ces facteurs entraînent des altérations dans le volume cellulaire.

Le transport sodium/potassium dépendant de l'ATP est la clef de la régulation intracellulaire du volume. Si les mécanismes de transport sont altérés, ceci conduit à une augmentation du volume intracellulaire et par là-même de la pression intracellulaire. Si le phénomène continue, le volume cellulaire continue à augmenter jusqu'à rupture de la membrane plasmique.

4.2 Altération du métabolisme énergétique

La fonction principale de la mitochondrie est la fourniture de l'énergie sous forme de composés à haute énergie. Ceci nécessite l'apport de substrats et d'oxygène. Le système de transport des électrons et les facteurs couplants sont associés aux sous-unités de la membrane interne.

La structure mitochondriale est étroitement liée avec sa fonction. Ainsi, des différences dans les taux de respiration, de phosphorylation, des augmentations d'ions, d'eau sont reflétés par des changements de l'ultrastructure mitochondriale. Lors d'une ischémie, le volume de la mitochondrie augmente. Ce changement appelé "gonflement" est un phénomène qui se déroule dans les cellules lésées.

De l'apport d'ATP dépend non seulement l'état structural et fonctionnel des mitochondries mais aussi toutes les fonctions cellulaires requérant de l'énergie.

4.3 Conséquence au niveau des structures subcellulaires

Nous ne nous situons ici qu'au niveau de la membrane plasmique et des lysosomes et n'entrerons pas dans les détails en ce qui concerne les autres organites.

Le premier effet de la réduction de la pression partielle en oxygène dans le milieu extracellulaire et le cytoplasme est un abaissement du taux de phosphorylation oxydative amenant une contraction de la matrice mitochondriale ainsi qu'une activation de la phosphofruktokinase et donc par voie de conséquence l'activation de la glycolyse anaérobie.

Cette accélération de la glycolyse entraîne une accumulation de lactate qui, conjointement avec l'augmentation de phosphate inorganique, réduit le pH intracellulaire. De plus, étant donné que la circulation a cessé, les métabolites tels que le lactate et les ions H^+ s'accumulent aussi dans le milieu intracellulaire d'où une diminution du pH intracellulaire.

La cellule commence à ressentir les effets du manque d'ATP.

Les pompes Na^+/K^+ -ATP et Ca^{2+} -ATP dépendantes de la membrane cellulaire ne peuvent plus fonctionner avec comme conséquence des flux passifs d'ions qui ne sont plus contrebalancés : le K^+ fuit à travers la membrane tandis que le Na^+ et le Ca^{2+} s'accumulent dans la cellule.

Le volume aqueux de la cellule augmente, on observe la formation de vacuoles remplies d'eau (blebs) à la surface de la cellule, en nombre croissant au fur et à mesure que la cellule se rapproche de au point de non retour.

Finalement, l'entièreté de la cellule est gonflée avec une diminution du Na^+ , Cl^- et une augmentation du K^+ . La concentration en Ca^{2+} accrue active les phospholipases endogènes. Leur action sur les phospholipides membranaires entraîne une augmentation de la perméabilité membranaire. Petit à petit, la cellule s'achemine vers le point de non retour, c-à-d le moment où elle sera définitivement endommagée. A ce moment, les lysosomes sont gonflés et clairs, bien que l'on observe pas de fuites au niveau de la membrane lysosomiale. (Les détails en ce qui concerne les autres organites ne sont pas repris ici).

Ce gonflement est la conséquence du manque d'ATP dans la cellule.

La plupart des hydrolases lysosomales présentent une activité enzymatique optimale à des pH proches de 5, ce qui correspond au pH existant dans cet organite. Le maintien du pH intralysosomal est le fruit d'une pompe électrogénique ATP-dépendante, située dans la membrane qui transfère des protons à l'intérieur du lysosome. Dès lors, une pénurie d'ATP signifie un arrêt du transport de protons, une élévation du pH intralysosomal et donc une inactivation des enzymes.

Par voie de conséquence, les macromolécules ne sont plus dégradées en sous-unités capables de traverser la membrane, les lysosomes deviennent hypertoniques; par un appel d'eau, ils gonflent et finalement leur membrane se rompt cédant à la poussée de la pression interne. Les hydrolases sont déversées dans le milieu dont le pH abaissé favorise l'action. La digestion des composants cellulaires est largement entamée et la cellule se dégrade. La cellule est dans sa phase nécrotique appelée cytolysse.

Les activités enzymatiques se voient donc augmentées dans le tissu de la veine variqueuse, en particulier celles des enzymes lysosomiales qui interviennent dans la dégradation des protéoglycans et du collagène : accroissement de 40 % de la β -glucuronidase, de 30 % de la N-acétylglucosaminidase, de 19 % de l'arylsulfatase et de 178 % de la phosphatase acide (Niebes, 1987).

Les origines cellulaires de ces activités lysosomales accrues peuvent être diverses : les cellules impliquées dans la réaction inflammatoire, les fibroblastes, les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales du tissu veineux.

A noter que chez les patients variqueux, les changements observés dans le sérum sont similaires à ceux de la veine : l'activité des enzymes des lysosomes est augmentée, augmentation aussi de la quantité de glycosaminoglycans et de sucres constituant des protéines. Dans les urines de ces patients, il y a une nette augmentation de glycosides liées à l'hydroxyline ce qui est un signe de la dégradation anormale des fibres de collagène.

Comme on peut le constater, que les lysosomes appartiennent aux cellules de la réaction inflammatoire, aux fibroblastes, aux cellules musculaires lisses, ou encore aux cellules endothéliales du tissu veineux, ils semblent bel et bien impliqués dans le processus et l'auto-entretien de la maladie veineuse.

Les lysosomes :

1. Définition :

Les lysosomes sont des organites intracellulaires identifiés pour la première fois dans le foie de rat par de Duve et ses collaborateurs en 1959, sur bases biochimiques en un premier temps et confirmées par la suite morphologiquement.

La particularité de cet organite réside en son contenu riche en une cinquantaine d'enzymes hydrolytiques catalysant à pH acide, pH 5 exactement (ce qui correspond à celui existant l'organite (Reijnoud et Tager, 1973)) la dégradation de macromolécules telles les protéines, les acides nucléiques, les lipides et les hydrates de carbone.

Le maintien de l'acidité intralysosomale est le fruit d'une pompe électrogénique, située dans la membrane, transférant des protons dans la lumière de la vésicule, par l'hydrolyse de l'ATP (Mego, 1979). La plupart des hydrolases sont sous forme soluble et séparées de leur substrat par une membrane unique de nature lipoprotéique. Excepté traumatisme, elle fonctionne véritablement comme une barrière efficace évitant la digestion intracellulaire par relargage de ces enzymes dans le cytoplasme.

Les propriétés de perméabilité de la membrane lysosomiale sont d'une importance capitale pour le maintien d'un processus de dégradation limité à l'intérieur du lysosome. Dans la cellule vivante, la membrane lysosomale est exposée à toute une série de substances présentes dans le cytoplasme ou dans la matrice lysosomale. D'un côté il y a les petites molécules non chargées tel le glycérol pour qui on peut affirmer qu'il traverse par diffusion la membrane, sans l'assistance d'un transporteur. Des molécules de plus grande taille peuvent sans doute, aussi diffuser en-dedans et au-dehors du lysosome si elles sont liposolubles. D'autre part, il existe des systèmes de transporteurs dont la présence dans la membrane lysosomale est d'une importance physiologique indubitable : ce serait le cas des acides aminés (Pisoni *et al.*, 1987).

Entre ces deux extrêmes, il existe toute une série de composés pour lesquels les contributions relatives de la diffusion passive et d'un transporteur connu ou présumé, sont encore incertaines, tel est le cas du transporteur du glucose. Quoiqu'il en soit, actuellement, seules des données qualitatives existent à propos des hydrates de carbones. Il apparaît une diminution progressive de la perméabilité dans l'ordre : glycérol > monosaccharide > oligosaccharides > hexitols.

2. Rôle des lysosomes :

Les lysosomes apparaissent comme une population hétérogène tant au niveau enzymatique qu'au niveau morphologique. Leur rôle est de toute manière important. On distingue d'une part une fonction hétérophagique et d'autre part une fonction autophagique.

a) Rôle hétérophagique :

Comme toutes les protéines, les protéines lysosomales sont synthétisées sur les ribosomes du réticulum endoplasmique puis transférées dans des vésicules appartenant à la face trans du Golgi; celles-ci donnent naissance aux lysosomes PRIMAIRES qui généralement restent en attente avec leur stock d'enzymes latentes et qui peuvent décharger leur contenu à l'extérieur de la cellule après être entrés en rapport avec la membrane plasmique de celle-ci.

Les substances (ou corps étrangers) intégrés à la cellule à la suite du phénomène d'endocytose sont inclus dans des vésicules dites endosomes (phagosomes) dont la membrane limitante dérive de la membrane plasmique de la cellule. Les lysosomes primaires fusionnent avec les endosomes (phagosomes) et déversent leurs enzymes. Ces vésicules d'origine mixte lysosomale et endosomales (phagosomales), appelées lysosomes SECONDAIRES, sont enfin le siège des attaques enzymatiques et de la digestion des matériaux susceptibles d'être dégradés. Moyennant transfert dans le cytoplasme, les composés de dégradation de faible poids moléculaire peuvent être réutilisés par la cellule pour ses propres synthèses. Ceci constitue le rôle de nutrition attribué aux lysosomes.

Quelquefois il arrive que les matériaux non digérés restent inclus dans des vésicules résiduelles qui peuvent subsister plus ou moins longtemps dans la cellule ou fusionner à leur tour avec la membrane plasmique et décharger leur contenu à l'extérieur de la cellule. (Exocytose).

b) Rôle autophagique :

Les lysosomes interviennent également dans des phénomènes d'autophagie.

Au cours de ce processus, la cellule peut isoler et encercler par du réticulum ou du Golgi des portions de cytoplasme dans le but premier d'assurer leur renouvellement.

La vacuole autophagique ainsi formée fusionne avec un lysosome; le contenu subit la digestion induite par les lysosomes. Au cours de la microautophagie, c'est le lysosome lui-même qui intériorise les structures à détruire par invagination.

Ce phénomène peut aussi refléter un état de stress, de souffrance cellulaire, comme le jeûne par exemple. Dans ce cas, la cellule utilisera sa propre substance mais de façon ordonnée, ce qui lui permettra de rester longtemps organisée et fonctionnelle, en attendant des jours meilleurs.

c) Lysosomes et pathologies :

L'importance du rôle joué par ces organites, est clairement démontrée par leur implication dans nombres de phénomènes pathologiques d'autolyse et de nécrose. Les maladies de surcharge lysosomale montrent à quel point, un mauvais fonctionnement du lysosome, notamment l'absence d'origine génétique d'une hydrolase spécifique, peut être fatal à la cellule.

Un autre syndrome lysosomal est à mentionner : celui provoqué par certaines altérations de la membrane des lysosomes. Le relargage subséquent des enzymes hydrolytiques dans le cytoplasme génère une proportion variable de dommage autolytique, menant dans certains cas à la mort cellulaire et la nécrose.

Toutefois l'incertitude règne quant à savoir si cela constitue un facteur causal de la mort cellulaire ou s'insère plutôt en tant que phénomène post-mortem. Cette même question se pose à propos de la maladie veineuse pour laquelle, comme nous l'avons vu précédemment, Niebes (1971) a montré une activité enzymatique lysosomale anormalement intense dans le sérum, les urines et le tissu de la veine variqueuse.

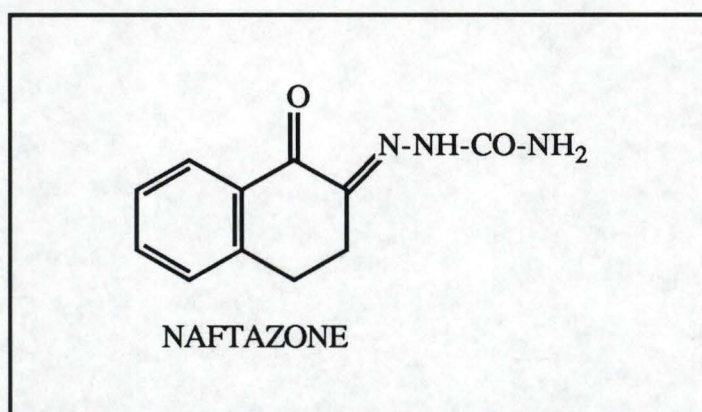
La libération de ces enzymes, surtout ceux impliqués dans le métabolisme du tissu conjonctif (α -1-fucosidase, N-acétylglucosaminidase, α et β -galactosidase, β -glucuronidase) contribuent à la dégradation cellulaire et tissulaire, en particulier du tissu conjonctif interstitiel.

Ce modèle, traduit une implication pharmacologique importante : des composés qui renforcent la membrane contre le "stress" auxquels elle peut normalement ou pathologiquement être exposée pourraient empêcher ou tout au moins retarder l'autolyse et exercer un effet protecteur sur les cellules dans certaines conditions.

Cet effet a déjà été mis en évidence pour de certains composés hydrophobes d'intérêt biologique; c'est ce phénomène qui semble caractériser la Naftazone.

Naftazone et maladie veineuse

L'intérêt de cette substance fut remarqué par Laberit et Baron (1971) qui démontrèrent que l'activité de la β -glucuronidase était augmentée dans le plasma d'un lapin ayant subi un choc hémorragique induit et que cette augmentation était fortement réduite par l'administration de 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de naphthoquinone β -monosemicarbazone ou NAFTAZONE.



Administrée à des sujets sains elle n'entraîne pas dans le sérum de modifications du pourcentage d'activité des 5 enzymes cités précédemment; par contre, chez les sujets variqueux, elle réduit l'activité enzymatique du plasma de plus ou moins 50 %; ceci indique clairement que l'activité enzymatique lysosomale libérée est diminuée sous l'influence de la naftazone. A noter que c'est l'activité de la β -glucuronidase qui est spécialement réduite.

L'activité enzymatique a également été mesurée dans les **parois veineuses** obtenues par excision chirurgicale : résultats : l'activité de la glucosidase, de la N-acétylglucosaminidase, α et β - galactosidase de paroi veineuse n'est pas spécifiquement modifiée par le traitement avec la naftazone alors que l'activité de la β -glucuronidase ne constitue plus qu'un quart de l'activité initiale.

BUT DU TRAVAIL

Ce mémoire s'inscrit dans le cadre des travaux contribuant à l'étude de la maladie veineuse. Au cours de cette pathologie nous avons montré que la situation est telle que finalement on aboutit à une stase veineuse qui plonge avec le concours d'autres phénomènes les cellules cibles de la paroi veineuse en l'occurrence les cellules endothéliales, les fibroblastes, les cellules musculaires lisses dans un état d'hypoxie dégénérant petit à petit en ischémie.

L'apparition d'une augmentation très nette des différents enzymes lysosomiaux dans le tissu veineux variqueux ainsi que dans le plasma et les urines de patients atteints de la maladie veineuse témoigne de la souffrance cellulaire endurée. Or une telle augmentation dans l'activité des enzymes lysosomiaux dans le plasma de patients variqueux est réduite par l'administration de Naftazone (Naphtoquinone 2 semicarbazone). Dès lors il nous a paru intéressant d'étudier par quel mécanisme la Naftazone exerçait son effet protecteur.

Ce travail est subdivisé en 3 parties, représentant chacune une étape bien définie dans notre étude:

- Une étude *in vivo* de la distribution intracellulaire dans le foie de rat de C-14 Naftazone injectée par intraveineuse.

- Une étude de l'effet protecteur de la Naftazone sur la membrane lysosomale soumise à un choc hypotonique. Cette étude a été faite en présence et en absence de Naftazone.

- Une tentative de mise en évidence par la technique du "binding" d'éventuels sites de fixation de la Naftazone.

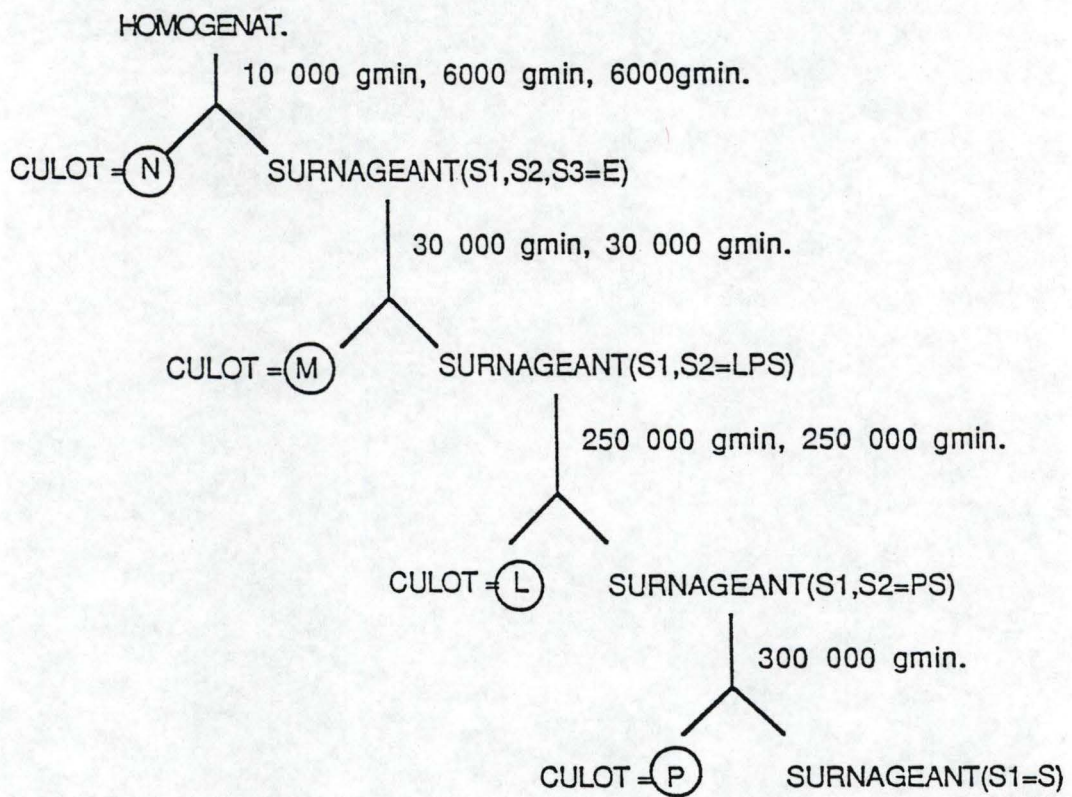


Schéma de fractionnement du foie de rat .

MATERIELS ET METHODES

A. Préparation d'un homogénat

Toutes les expériences ont été réalisées sur des rats Wistar de plus ou moins 200 g, à jeûn depuis la veille.

Une fois l'animal sacrifié, le foie est prélevé, pesé, coupé en fines lamelles, passées dans un homogénéiseur coaxial de Potter auquel on ajoute un certain volume de saccharose (0,25 M) isotonique glacé. Le tout est ensuite broyé.

L'homogénat ainsi préparé contient tous les composants subcellulaires des cellules hépatiques en suspension.

B. Centrifugation

La technique de centrifugation permet de séparer des particules subcellulaires grâce à leur comportement différent dans un champ centrifuge.

1. Centrifugation différentielle

L'homogénat, de préparation précédemment décrite, est soumis au schéma de fractionnement en centrifugation différentielle décrit par de Duve *et al.* (1955) (v figure). Ici, la séparation des granules se fait d'après leur taille.

L'homogénat est centrifugé à une vitesse telle que le culot en résultant est enrichi avec les granules les plus volumineux; ce culot est recueilli et le surnageant est soumis de nouveau à une centrifugation mais cette fois à vitesse plus élevée. On procède ainsi jusqu'à l'obtention de 5 fractions. Celles-ci sont loin d'être pures, loin de contenir un seul type de particules : de fait elles sont toujours hétérogènes.

La fraction N est constituée principalement de noyaux, de débris cellulaires et de cellules intactes ayant résisté à l'homogénéisation;

La fraction M ou fraction mitochondriale lourde renferme, quant à elle, des mitochondries mais aussi des lysosomes et des peroxysomes en quantités non négligeables;

La fraction L ou fraction mitochondriale légère est, par contre, enrichie en lysosomes et en peroxysomes;

La fraction P microsomale contient, pour sa part, des éléments du réticulum endoplasmique et du Golgi ainsi que des fragments de la membrane plasmique;

La fraction S ou fraction soluble est constituée de tous les éléments non sédimentables des cellules hépatiques dans ces conditions.

La première partie des expériences a été réalisée sur des fractions mitochondriales totales (M+L) selon un schéma permettant d'obtenir les fractions M et L dans un même culot.

Dans la troisième partie des expériences, le fractionnement est réalisé à partir de rats auxquels on a administré *in vitro* une certaine dose de Naftazone marquée au carbone 14:

- dans un premier temps, la dose injectée se compose de 5 μl de C^{14} -Naftazone $2,5 \cdot 10^{-2}$ M dilués dans 25 μl de Naftazone non-radioactive $2,5 \cdot 10^{-2}$ M.
- dans un deuxième temps, au lieu de diluer la C^{14} -Naftazone avec de la naftazone froide à même concentration, on injecte 0,5 μl de la C^{14} -Naftazone seule dissoute dans 0,5 μl de NaCl 0,15 M.

Les solutions sont injectées en intraveineuse dans la veine fémorale sous légère anesthésie à l'éther le sacrifice de l'animal a lieu à divers temps (1, 5, 10, 15, 30, 45 min) après cette administration. Le foie est ensuite perfusé *in situ* par injection de NaCl 0,9 % (0,15 M) glacé dans l'aorte jusqu'au blanchissement de l'organe vidé de son sang. Le foie est ensuite prélevé et homogénéisé suivant le schéma précédemment décrit.

La représentation graphique utilisée pour décrire les résultats en centrifugation différentielle est celle proposée par de Duve *et al.* (1955).

Il s'agit d'un histogramme avec en ordonnée l'activité spécifique à savoir le rapport entre le pourcentage d'activité totale de la fraction déterminée et le pourcentage de protéines dans cette même fraction, et en abscisse la quantité relative de protéines des 5 fractions cumulées de gauche à droite.

Chacune de ces 5 fractions est donc représentée par un rectangle dont la hauteur est proportionnelle à la purification de l'enzyme, la base est proportionnelle à la quantité de protéines présente dans la fraction et la surface représente le contenu relatif en enzyme dans la fraction.

Pour les dosages enzymatiques ainsi que pour le dosage des protéines, on calcule la récupération en sommant les valeurs d'activités enzymatiques trouvées dans les fractions N, M, L, P et S rapportées à l'activité de l'homogénat qui équivaut à E+N.

2. Centrifugation isopycnique

En centrifugation isopycnique, les particules sont centrifugées dans un gradient de densité continu ou discontinu jusqu'à ce qu'elles atteignent une région où leur densité propre approche celle du milieu; à ce moment leur vitesse de sédimentation est devenue infiniment petite.

Dans ce cas, la séparation des particules se fait selon leur densité.

En général, la densité des particules subcellulaires dépend de manière critique de la composition du milieu de suspension. Il s'ensuit que, selon la nature du gradient utilisé, les distributions obtenues différeront pour une préparation biologique donnée (de Duve, Berthet et Beaufay, 1959).

a) Purification des lysosomes

La purification des lysosomes de foie de rat en gradient discontinu de Métrizamide a été réalisée suivant Wattiaux *et al.*(1978). En ce qui concerne la préparation des membranes de lysosomes il suffit de faire éclater les lysosomes "purifiés" dans un certain volume d'eau (ou dans du tampon imidazol 5 mM pH 7,5) et de les centrifuger 40 min à 40000 rpm (Beckmann), puis de resuspendre les culots ainsi obtenus dans le même tampon imidazol suivant la dilution désirée.

b) Gradient continu de saccharose

Analyse des fractions N, ML, P après injection *in vivo* de la C¹⁴-Naftazone.

Les limites de densité des gradients sont :

- pour les fractions P et ML : 1,05 / 1,24 (gr/ml).
- pour la fraction N : 1,09 / 1,32 ((gr/ml).

0,5 ml de chacune des fractions est déposé au sommet du gradient linéaire de saccharose. Celui-ci est ensuite soumis à une centrifugation en rotor à godets basculants SW65 pendant 2 h 30 min à 39000 rpm. Après centrifugation, le tube est découpé en sections parallèles afin de récupérer les différentes fractions de densités croissantes. L'activité des enzymes de référence peut dès lors être mesurée.

Le mode de représentation des résultats utilisés pour le gradient continu de saccharose est celui décrit par Beaufay *et al.* (1964) à savoir la représentation graphique sous forme d'histogramme. Chaque fraction y est matérialisée sous forme

d'un rectangle bien défini : la base correspond aux limites de densité de la fraction, la hauteur représente la fréquence qui équivaut au rapport du pourcentage d'activité sur l'incrément de densité de chacune des fractions, et la surface, quant à elle, représente la proportion de granules dans la fraction en question.

Un autre mode de présentation qui sera utilisé est celui qui donne les activités spécifiques relatives c'est-à-dire les pourcents d'activité rapportés aux pourcents de protéines.

Pour chaque enzyme de référence dosée sur les différentes fractions du gradient, un tel histogramme est tracé, les comparaisons d'un graphique à l'autre sont donc aisées.

3. Purification de lysosomes intacts par "free flow électrophoresis"

La "free flow électrophoresis" est une technique de séparation électrophorétique nouvellement mise au point. Elle est basée, sur les propriétés fonctionnelles de surface. La surface membranaire est connue pour être le siège d'une importante activité biologique. Transformation, différenciation et processus de spécialisation par exemple souvent corrélés avec les changements de charge de la surface membranaire. Ces modifications se répercutent ensuite sur le comportement électrophorétique. Ces différences de mobilité électrophorétique sont aussi l'expression de la variation dans la composition chimique des membranes biologiques, leurs principaux constituants différant quant à leur charge électrique.

Principe

Une solution d'électrolyte à pH adéquat s'écoule à travers des lignes de forces d'un champ électrique. L'échantillon, en l'occurrence une fraction ML pour les lysosomes, est injecté en continu dans le milieu d'entraînement en vue d'obtenir sa séparation. Les composants de mobilité différentes se déplacent suivant différentes trajectoires et sont collectés en continu à différents points au bas de la chambre de séparation. Cette technique voit son application dans la séparation et la caractérisation des fractions ? et des composants membranaires.

4. Enzymes de références

Au cours de ce travail, nous avons choisi de mesurer l'activité enzymatique de divers enzymes de référence:

- la cathepsine c, la N-acétylglucosaminidase, la phosphatase acide, l'arylsulfatase pour repérer les lysosomes;

Résumé des conditions expérimentales des dosages enzymatiques

Organites subcellulaires	Enzymes	Substrat	Concentration	pH	Mesure	Références
Lysosomes	Cathepsine C	glycyl-L-arginine b-naphtylamide	0,5 mM	5	colorimétrique de la naphtylanine	Jadot <i>et al.</i> , 1984
	N-acétylglucos-aminidase	p-Nitrophényl-N-acétyl b-D-glucosaminide	6 mM	4,5	colorimétrique du p-nitrophénol	Vaes G., 1966
	Arylsulfatase	p-Nitrocatéchol-sulfate	20 mM	5	colorimétrique du nitrocathécol	Bowers <i>et al.</i> , 1967
Mitochondries	Cytochrome oxydase	cytochrome C	0,017 mM	7,4	spectrophotométrique de cytochrome réduit	Duve <i>et al.</i> , 1955
Membrane plasmique	Dipetidylpeptidase	glycyl-proline b-naphtylamine	4,5 mM	8	colorimétrique de	Nagastu, 1976
	Phosphodiesterase alcaline	thymidine 5' monophosphate p-nitrophényl ester	5mM	9,6	colorimétrique du p-nitrophénol	Wattiaux, 1969
Réticulum endoplasmique	Glucose-6-phosphatase	glucose-6-phosphate	0,24 M	6,5	colorimétrique du phosphate	de Duve, 1955

- la cytochrome oxydase pour repérer les mitochondries;
- la glucose-6-phosphatase pour repérer le réticulum endoplasmique;
- et les dipeptidylpeptidase IV et phosphodiesterase alcaline pour la membrane plasmique.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

1 ère partie : Etude de la distribution intracellulaire de la Naftazone dans le foie de rat

I. INTRODUCTION

La maladie variqueuse, comme souligné dans l'introduction, voit son origine dans la transmission d'un tissu veineux et périveineux de médiocre qualité.

C'est une maladie lourde au double plan individuel et social, or malheureusement, cette pathologie est en nette progression.

Toutefois, il est possible par une intervention précoce de prévenir ou du moins de freiner l'évolution de la maladie vers des phases plus sévères (varices, décompensations loco-régionales) en agissant sur les facteurs de risque et en suivant conjointement un traitement par les phlébotoniques.

Parmi ceux-ci, on peut citer le Ginkor fort ® qui se révèle être très efficace.

La Naftazone possède également des propriétés intéressantes dans le domaine de l'hémostase et de la pathologie vasculaire (Germaut *et al.*, 1963). Administrée à des sujets souffrant de varices, elle réduit dans le sérum, l'activité enzymatique de 5 hydrolases lysosomales impliquées dans le métabolisme des macromolécules du tissu conjonctif (Winand). Ces deux faits, augmentation des activités des enzymes lysosomales et effet bénéfique de la Naftazone dans la maladie veineuse nous ont incité à examiner si *in vivo*, la Naftazone devait son action uniquement en se liant aux lysosomes et en protégeant leur intégrité et leur nombre ou si l'action de la Naftazone sur les lysosomes était indirecte et les changements dans la membrane lysosomale une conséquence secondaire aux modifications encourues par d'autres membranes notamment les membranes mitochondriales et plasmiques. Il nous a donc paru intéressant dans un premier temps de suivre la distribution intracellulaire de la Naftazone *in vivo* et cela au niveau du foie de rat.

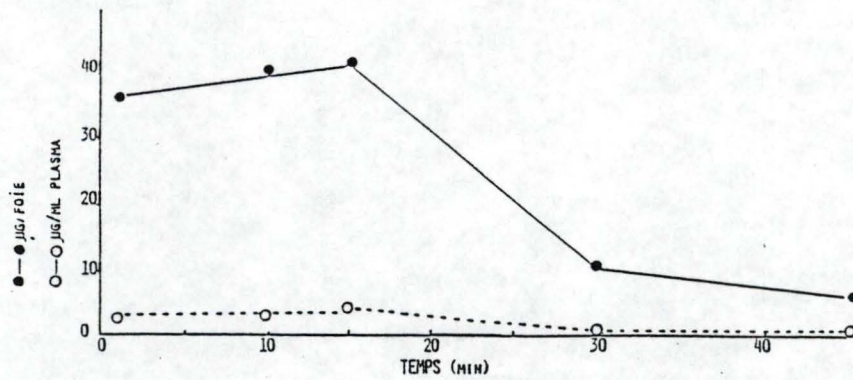


Fig 1 : Evolution de la radioactivité dans le foie et le plasma après injection de 450 µg de Naftazone dont 5% de C 14- Naftazone.

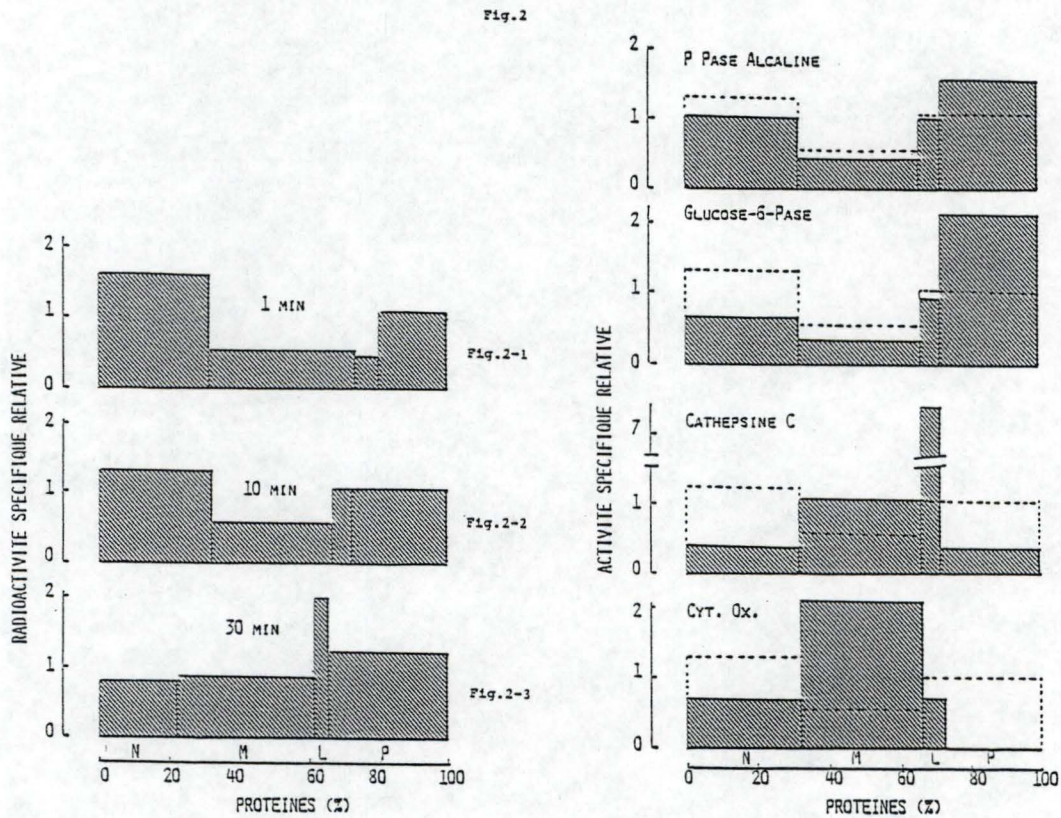


Fig 2 : Profils de distribution de la radioactivité après centrifugation différentielle.

Les résultats sont obtenus après fractionnement de foies de rats ayant reçu une injection de 22,5 µg de C14- Naftazone, et sacrifiés à des temps croissants (1, 10, 30 min) après cette injection.

Fig 3 : Profils de distribution des enzymes de référence après centrifugation différentielle.

Sont présentés ici les distributions des enzymes de référence correspondant à la figure 2. Les pointillés représentent la distribution de la radioactivité après 10 min de la figure 2-2.

II. RESULTATS

A. Distribution intracellulaire de la C¹⁴-Naftazone dans le foie de rat après injection *in vivo* .

1. Distribution après centrifugation différentielle

Au cours de ces expériences, nous avons administré de la C¹⁴-Naftazone en intraveineuse à des rats que nous avons ensuite sacrifiés après des temps croissants après injection.

Deux séries d'expériences ont été réalisées : dans la première, seule la Naftazone radioactive a été administrée à raison de 22,5 µg; dans la deuxième série, 450 µg de Naftazone dont 5 % sont constitués du composé radioactif ont été injectés, soit 20 fois plus que dans la première série.

A la fig 1 est présentée l'évolution de la radioactivité dans le foie et dans le plasma : jusqu'à la 15^e minute, la radioactivité est maximale dans le foie. La distribution de la C¹⁴-Naftazone sera analysée après 1, 10, 15, 30 et 45 min d'injection dans les expériences de distribution en fractionnement. La distribution de la C¹⁴-Naftazone sera analysée, après 10 min d'injection, en centrifugation isopycnique (gradient de saccharose).

Le foie, perfusé avec du NaCl isotonique a été ensuite fractionné par centrifugation différentielle suivant le schéma de de Duve *et al.* (1955).

La radioactivité et les enzymes de références ont été mesurées dans les fractions. A noter que, dans tous les cas, la fraction soluble contient une part importante de la radioactivité (± 85 %) (raison pour laquelle elle n'a pas été représentée sur les histogrammes). Les distributions en centrifugation différentielle de la radioactivité sédimentable sont présentés respectivement aux fig 2 et 4.

Fig 2 : Seule la Naftazone radioactive a été injectée, à raison de 22,5 µg (soit une quantité de Naftazone 20 fois moindre qu'à la fig 8). Globalement après 1 et 10 min la radioactivité semble se distribuer dans les fractions N et P. Cette localisation préférentielle varie au cours du temps : la radioactivité (contrairement à la fig 8) diminue dans la fraction N et augmente dans la fraction P. A noter aussi l'établissement progressif d'un pic de radioactivité dans la fraction L qui correspond aux lysosomes. Toutefois la radioactivité dans les fractions est très faible pour une telle dose injectée.

Fig 3 : On y trouve les distributions des enzymes de référence :

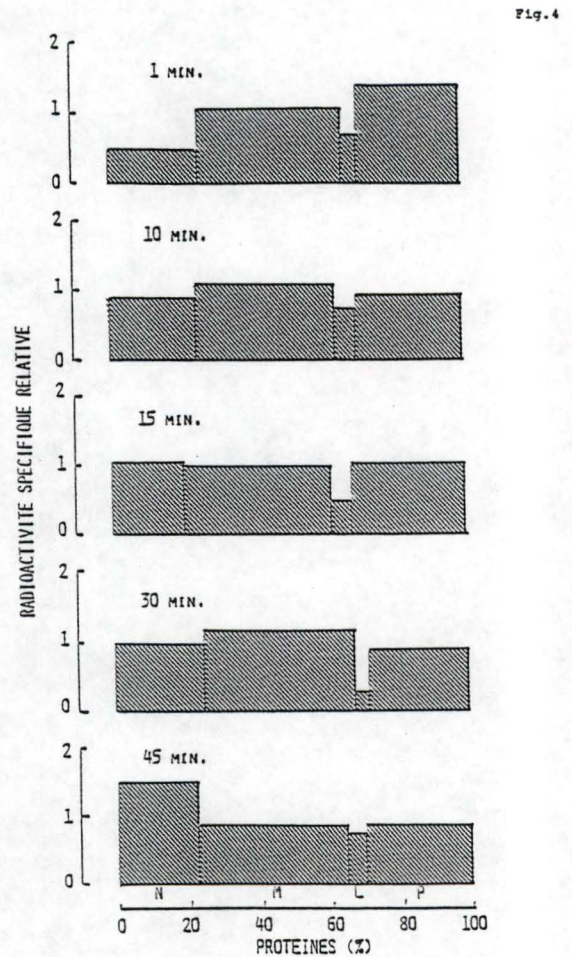
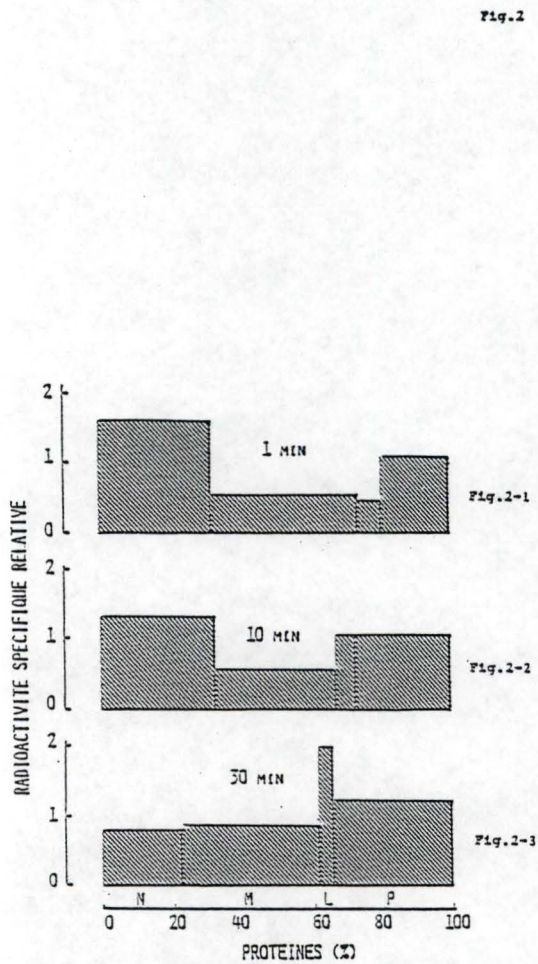


Fig 2 : Profils de distribution de la radioactivité après centrifugation différentielle.

Les résultats sont obtenus après fractionnement de foies de rats ayant reçu une injection de 22,5 µg de C14- Naftazone, et sacrifiés à des temps croissants (1, 10, 30 min) après cette injection.

Fig 4 : Profils de distribution de la radioactivité après centrifugation différentielle.

Les résultats sont obtenus après fractionnement de foies de rats ayant reçu une injection de 450 µg de Naftazone dont 5% de C 14- Naftazone, et sacrifiés à des temps croissants (1, 10, 15, 30, 45 min) après cette injection.

- la phosphodiesterase alcaline (PDase) pour la membrane plasmique qui est surtout distribuée dans les fractions N et P;
- la glucose-6-phosphatase pour le réticulum endoplasmique que l'on retrouve principalement dans la fraction P;
- la cathepsine C pour les lysosomes, principalement distribuée dans la fraction ML;
- et la cytochrome oxydase pour les mitochondries qui se retrouve également en majeure partie dans la fraction ML.

A la fig 3, les pointillés correspondent à la distribution de la radioactivité (Fig 2-2) après 10 min; on peut remarquer qu'un tel type de distribution correspond le mieux à celui de la phosphodiesterase, enzyme de référence de la membrane plasmique.

Fig 4 : Au cours de ces expériences 450 µg de Naftazone dont 5 % constitués du composé radioactif ont été injectés donc une dose 20 fois plus élevée. Les rats ont été sacrifiés 1, 10, 15, 30, 45 min après l'injection. La radioactivité se retrouve dans toutes les fractions sans prépondérance significative. Toutefois, les valeurs les plus faibles de radioactivité spécifique relative se retrouvent toujours dans la fraction L, la plus enrichie en lysosomes ce que démontre la distribution de la cathepsine C (voir fig 3). A noter que au cours du temps, la radioactivité diminue dans la fraction P et s'accroît dans la fraction N.

Si on compare les résultats des distributions des figures 2 et 4, on peut remarquer:

- que au temps 1 min, injectée à faible concentration, la Naftazone est répartie surtout dans la fraction N et à forte concentration dans les fractions M et P.
- au temps 10 min, on constate essentiellement qu'à faible dose une quantité importante de Naftazone se retrouve dans la fraction N tandis qu'à forte dose le maximum est signalé dans la fraction M.
- finalement au temps 30 min, la Naftazone injectée à faible concentration est maximale dans la fraction P; à forte concentration dans la fraction M.

En réalité, ces 2 expériences, peuvent être considérées comme l'une représentant une approche de la fixation spécifique de la Naftazone (Fig 2) et l'autre (fig 4) plutôt de la fixation non spécifique étant donné qu'à la fig 4 la quantité de Naftazone radioactive est la même qu'à la fig 2 mais qu'on injecte en même temps une dose 20 fois plus élevée de Naftazone non radioactive.

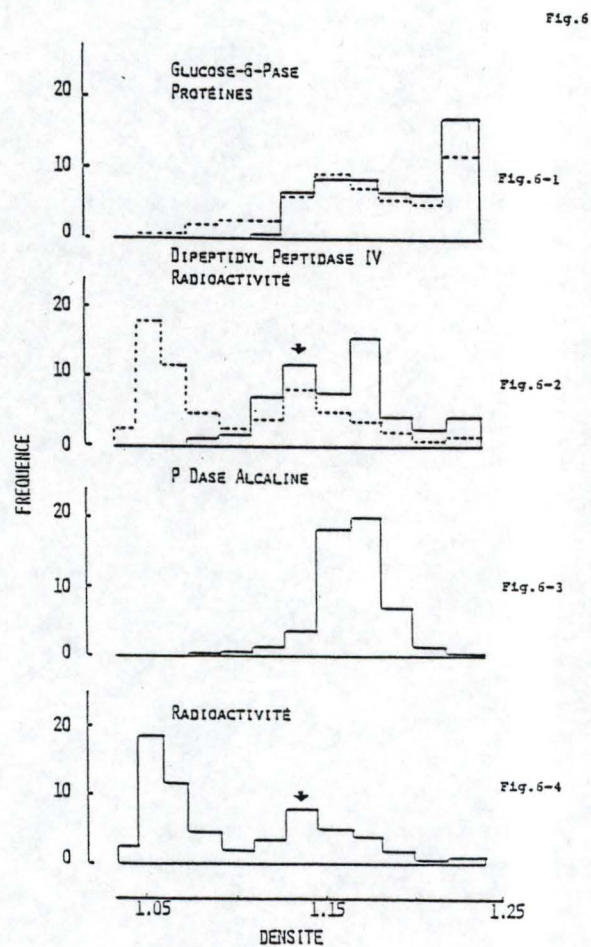
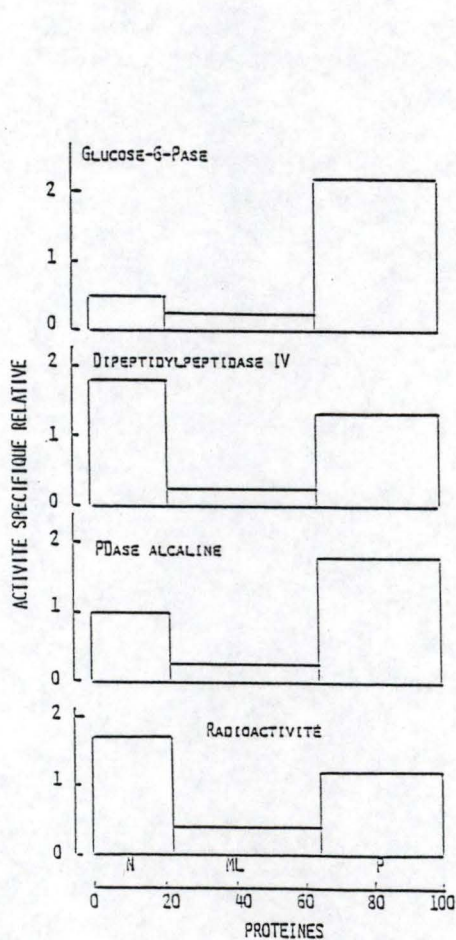


Fig 5 : Profils de distribution de la radioactivité et de certaines enzymes de référence après centrifugation différentielle.

Les résultats sont obtenus après fractionnement d'un foie de rat ayant reçu une injection de 450 μ g de Naftazone dont 5% de C 14- Naftazone, et sacrifiés 10 minutes après cette injection.

Fig 6 : Profils de distribution de la radioactivité et de certaines enzymes de référence après centrifugation isopycniqne d'une fraction P dans un gradient de saccharose.

La fraction P provient du fractionnement présenté à la figure 5. Cette fraction a été déposée au sommet du gradient de saccharose qui va de 1,05 à 1,24 gr/ml. La centrifugation a été réalisée à 39 000 tours/min dans le rotor Spinco SW 65 pendant 2h30.

A la fig 6-1, les traits pleins représentent la distribution de la glucose-6-phosphatase, les pointillés, les protéines.

A la fig 6-2, le profil de distribution de la radioactivité est visualisé par les pointillés, celui de la dipeptidylpeptidase VI est représenté par les traits pleins.

2. Distributions après centrifugation isopycnique:

Nous avons procédé de la même manière que précédemment. Les rats ont reçu en intraveineuse 450 μg de Naftazone radioactive et ont été sacrifiés 10 min après l'injection. La quantité importante de C^{14} -Naftazone injectée se justifie en raison des dilutions élevées des fractions isolées en gradient. Nous avons constaté une faible radioactivité des fractions de centrifugation différentielle (après une dose injectée de 22,5 μg de Naftazone (Fig 2)). Le temps 10 min a été choisi car à ce moment (voir fig 1), la radioactivité est maximale dans le foie. Nous avons ensuite procédé à la centrifugation différentielle pour obtenir les différentes fractions. Les fractions N, ML (M+L) et P (chacune provenant de 3 fractionnements différents) ont été analysées par centrifugation isopycnique en gradient continu de saccharose.

a) Fraction microsomale P

Fig 5. Y sont présentées les distributions après centrifugation différentielle. On note que le profil de distribution de la radioactivité se rapproche au mieux de celui de la dipeptidyl peptidase IV, enzyme marqueur de la membrane plasmique.

C'est pourquoi nous avons analysé la fraction P, que contient la plus grande partie des éléments du réticulum endoplasmique de l'appareil de Golgi et de la membrane plasmique.

Fig 6. La fig 6 reprend les distributions de la radioactivité et de certaines enzymes de référence après centrifugation isopycnique de la fraction P décrite ci-dessus, déposée au sommet d' un gradient continu de saccharose. (limites de densité : 1,05 / 1,24 (gr/ml)).

Fig 6-1 : on voit que le profil de distribution de la radioactivité ne correspond en rien aux distributions des protéines et de la glucose-6-phosphatase, enzyme marqueur du réticulum endoplasmique.

Fig 6-2 : Les distributions de la radioactivité et du marqueur de la membrane plasmique sont superposées. La distribution de l'enzyme est bimodale.: à noter qu'au deuxième pic de radioactivité correspond un pic de l'enzyme (\rightarrow). Le deuxième pic d'activité de la dipeptidyl peptidase IV correspond à la distribution de la phosphodiesterase alcaline.

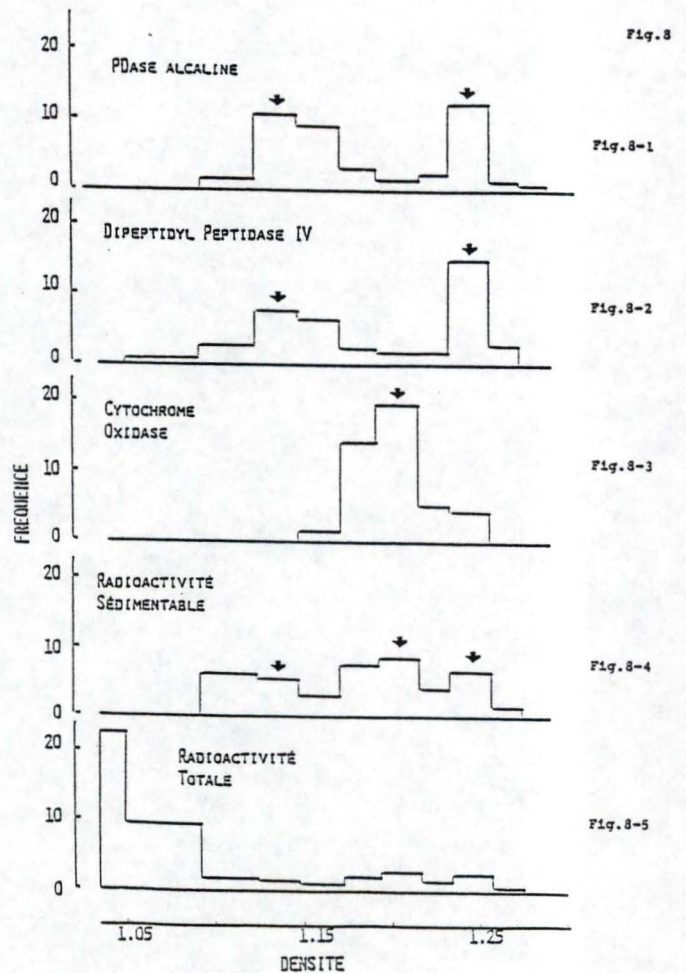
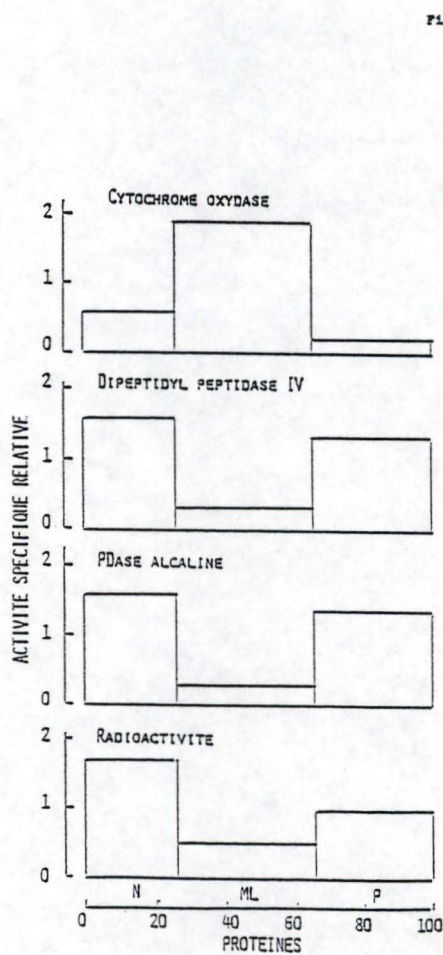


Fig 7 : Profils de distribution de la radioactivité et de certaines enzymes de référence après centrifugation différentielle.

Les résultats sont obtenus après fractionnement d'un foie de rat ayant reçu une injection de 450 μ g de Naftazone dont 5% de C 14- Naftazone, et sacrifiés 10 minutes après cette injection.

Fig 8 : Profils de distribution de la radioactivité et de certaines enzymes de référence après centrifugation isopycnique d'une fraction N dans un gradient de saccharose.

La fraction N provient du fractionnement présenté à la figure 7. Cette fraction a été déposée au sommet du gradient de saccharose qui va de 1,09 à 1,32 gr/ml. Les conditions de centrifugation sont identiques à celles décrites dans la légende de la figure 6.

Fig 6-3 : La phosphodiesterase alcaline est un autre marqueur de la membrane plasmique; toutefois on observe que sa distribution ressemble nettement moins à celle de la radioactivité, contrairement à la dipeptidyl peptidase IV.

Fig 6-4 : En ce qui concerne la radioactivité, on observe qu'une proportion élevée de celle-ci se localise au sommet du gradient, là où on a déposé la fraction P. Cela signifierait qu'une partie de la Naftazone s'est détachée des structures auxquelles elle était attachée dans la fraction P ou que le lavage de celle-ci était insuffisant.

b) Fraction nucléaire N

Fig 7. La fig 7 reprend les distributions observées après centrifugation différentielle. La radioactivité montre la même distribution qu'à la fig 5 c'est-à-dire celle qui correspond le mieux à la distribution des enzymes marqueurs de la membrane plasmique, à savoir la phosphodiesterase alcaline et la dipeptidyl peptidase IV.

La fraction N renferme essentiellement des noyaux, des débris cellulaires, des cellules intactes ayant résistées à l'homogénéisation, une part non négligeable de vésicules dérivées de la membrane plasmique, et des mitochondries.

Fig 8. La fig 8 donne les distributions observées après centrifugation isopycnique en gradient continu de saccharose de la fraction N provenant du fractionnement décrit ci-dessus.

8-5 : Comme précédemment une part non négligeable de la Naftazone marquée s'est détachée et est restée localisée au sommet du gradient où avait été déposée la fraction N.

8-4 : Si l'on fait abstraction de cette fraction soluble, la radioactivité sédimentable montre une distribution correspondant à la fois à celles de la dipeptidyl peptidase IV (8-2), de la phosphodiesterase alcaline (8-1) et de la cytochrome oxydase (8-3) : aux pics de radioactivité marqué d'une flèche correspondent plus ou moins les pics de activités enzymatiques citées.

c) Fraction mitochondriale ML

Dans ce cas-ci, la C¹⁴-Naftazone a été injectée à un rat prétraité au Triton WR 1339. Le triton WR 1339 est un détergent qui pénètre par endocytose dans le lysosome. Ne

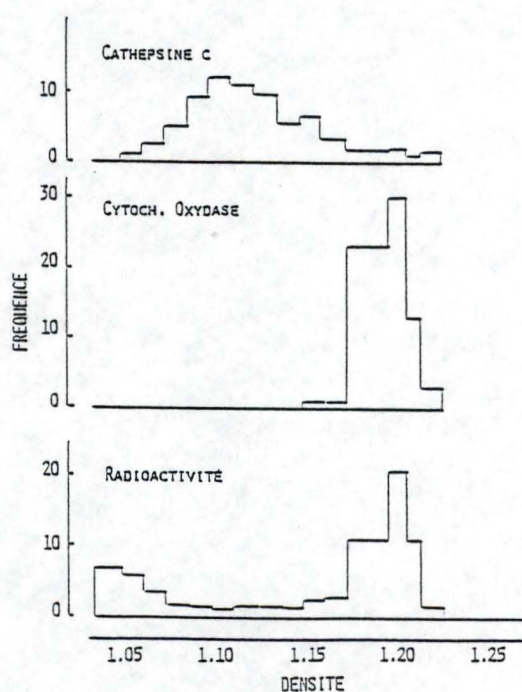
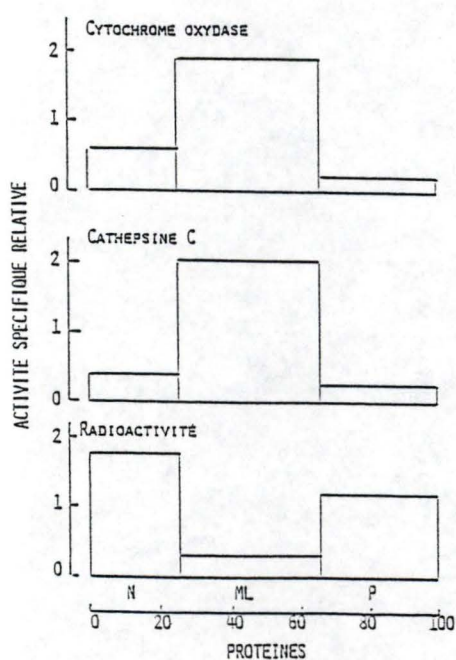


Fig 9 : Profils de distribution de la radioactivité et de certaines enzymes de référence après centrifugation différentielle.

Les résultats sont obtenus après fractionnement d'un foie de rat prétraité au Triton WR 1339 ayant reçu une injection de 450 μg de C 14- Naftazone, et sacrifiés 10 minutes après cette injection.

Fig 10 : Profils de distribution de la radioactivité et de certaines enzymes de référence après centrifugation isopycnique d'une fraction ML dans un gradient de saccharose.

La fraction ML provient du fractionnement présenté à la figure 9. Cette fraction a été déposée au sommet du gradient de saccharose qui va de 1,05 à 1,24 gr/ml . Les conditions de centrifugation sont identiques à celles décrites dans la légende de la figure 6.

pouvant être dégradé, il provoque par un appel d'eau, une diminution considérable de la densité des lysosomes et permet ainsi de les individualiser plus nettement.

Fig 9 La fig 9 donne les distributions après centrifugation différentielle, de la radioactivité et des enzymes de référence, en l'occurrence la cytochrome oxydase et la cathepsine C, marqueurs respectivement des mitochondries et des lysosomes.

On peut noter que la distribution de la radioactivité ne correspond en rien à celle des deux enzymes de référence, elle se rapproche plutôt de la distribution de la radioactivité de la fraction P présentée à la fig 5 et de la fraction N préincubée à la fig 7.

Se retrouvent surtout dans la fraction ML, les mitochondries et lysosomes.

Fig 10. A la figure 10, sont présentés les résultats de la centrifugation isopycnique de la fraction ML déposée au sommet du gradient continu de saccharose.

On remarque que grâce à l'utilisation du triton WR 1339, les mitochondries et lysosomes sont bien séparés.

Comme à la fig 6, une partie de la radioactivité se retrouve dans les premières fractions du gradient. Cette fraction soluble résulte sans doute d'un détachement de la Naftazone. Ce qui reste sédimentable, c'est-à-dire la majeure partie dans ce cas, suit la même distribution que la cytochrome oxydase et donc que les mitochondries et n'est dès lors absolument pas associée aux lysosomes.

CONCLUSION

A. fixation de la Naftazone *in vivo* dans le foie de rat.

Il ressort de ces expériences dont le but est de déterminer la distribution *in vivo* de la Naftazone dans le foie de rat deux faits importants :

En centrifugation différentielle lorsque la Naftazone est injectée à faible dose (22,5 µg), la fixation de la Naftazone paraît se faire après 1 et 10 min sur la membrane plasmique (Fig 9) ; après 30 min alors que la quantité de Naftazone dans le foie diminue très nettement, elle semble se fixer sur les lysosomes (Fig 2-3).

En centrifugation différentielle, lorsque la dose de Naftazone est 20 fois plus élevée, la répartition semble bimodale : elle suit la distribution de la membrane plasmique et des mitochondries quel que soit le temps d'injection. Comme la quantité de Naftazone dans le foie est maximale après 10 min d'injection de 450 µg de Naftazone une analyse plus approfondie des fractions N, ML et P a été réalisée en centrifugation isopycnique.

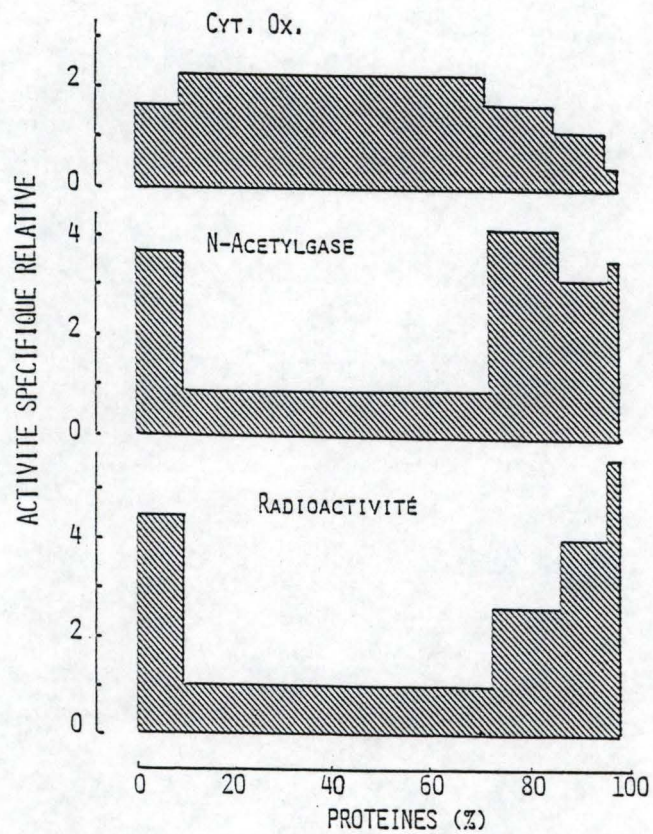


Fig 11 : Profils de distribution de la radioactivité et de certaines enzymes de référence après centrifugation isopycniqne d'une fraction ML dans un gradient de saccharose.

La centrifugation a été réalisée sur une fraction ML préparée à partir d'un foie de rat n'ayant reçu aucun traitement au préalable. Cette fraction ML a été préincubée en présence de C 14-Naftazone ($2,5 \cdot 10^{-4}$ M) pendant 10 minutes à température ambiante et déposée ensuite dans le fond du gradient continu de saccharose (limites de densité : 1,05-1,24 gr/ml). Les conditions de centrifugation sont identiques à celles décrites dans la légende de la figure 6.

Après 10 min d'injection de la Naftazone à raison de 450 μg (que nous appellerons forte dose) la centrifugation isopycnique permet de mettre en évidence (si l'on se réfère à la distribution de la radioactivité totale) une fixation de la Naftazone sur les mitochondries ainsi que sur la membrane plasmique (Fig 6 et 8) ou du moins sur certains domaines de celle-ci . Il apparaît en effet une différence selon l'enzyme de référence choisi : la phosphodiesterase alcaline ou la dipeptidyl peptidase IV).

Par contre, il n'apparaît aucune fixation de la Naftazone sur les lysosomes (fig 14) ni sur le réticulum endoplasmique (Fig 6) dans nos conditions expérimentales : à savoir 10 min d'injection et une forte dose de Naftazone.

Les cibles intracellulaires de la Naftazone semblent donc dépendre de la dose injectée : membrane plasmique et lysosomes si la dose de Naftazone est de 22 μg , membrane plasmique et mitochondries lorsque la dose est de 22 μf de Naftazone radioactives additionnée de 423 μg de Naftazone non radioactive.

B. Fixation de la Naftazone *in vitro*

L'expérience présentée ici vise à vérifier si les conclusions tirées à propos de la fixation de la Naftazone sur les lysosomes *in vivo* sont confirmées *in vitro*.

Dans cette expérience, une fraction mitochondriale lourde (M+L) préparée avec du saccharose isotonique en présence de tampon TRIS 5 mM pH 7,4 a été préincubée en présence de Naftazone ($2,5 \cdot 10^{-4}$ M) marquée au C^{14} , pendant 10 min à température ambiante.

Les granules, déposés dans le fond du gradient continu de saccharose, ont ensuite été soumis à une centrifugation isopycnique dans le rotor SW65 durant 2h30 à 39000 rpm.

Sur les différentes fractions du gradient, une enzyme de référence des mitochondries, la cytochrome oxydase et une des lysosomes, la N-acétylglucosaminidase, ont été dosées. La distribution de la radioactivité associée aux granules a également été établie ici en éliminant la radioactivité libérée et donc soluble qui reste confinée dans le fond du gradient.

La Fig 11 présente l'ensemble de ces distributions : on constate que le profil de distribution de la radioactivité s'ajuste nettement à celui de la N-acétylglucosaminidase, enzyme marqueur des lysosomes mais non à celui de la cytochrome oxydase.

Afin de confirmer cette éventuelle fixation de la Naftazone aux lysosomes, l'expérience a été réitérée mais cette fois avec une ML d'un foie de rat traité au triton WR 1339.

Ce traitement a pour but d'alléger les lysosomes qui par voie de conséquence s'équilibrent à des densités plus faibles, s'individualisant de la sorte des mitochondries. La

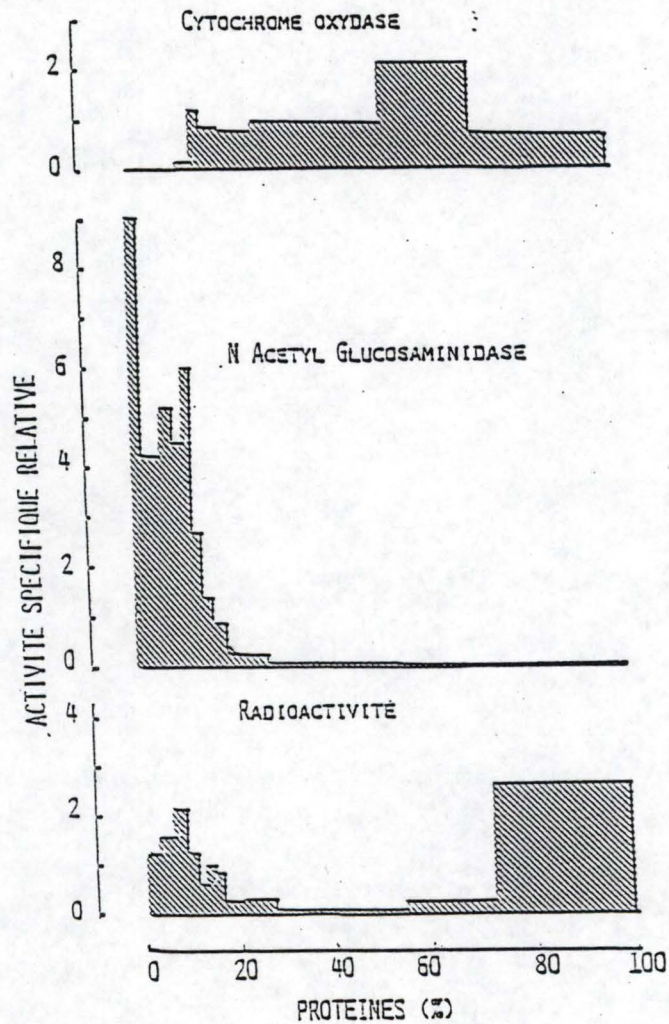


Fig 12 : Profils de distribution de la radioactivité et de certaines enzymes de référence après centrifugation isopycniqne d'une fraction ML dans un gradient de saccharose

La centrifugation a été réalisée sur une fraction ML préparée à partir d'un foie de rat prétraité au Triton WR 1339. Cette fraction ML a été préincubée en présence de C 14-Naftazone ($2,5 \cdot 10^{-4}$ M) pendant 10 minutes à température ambiante et déposée ensuite dans le fond du gradient continu de saccharose (limites de densité: 1,09-1,23 gr/ml). Les conditions de centrifugation sont identiques à celles décrites dans la légende de la figure 6.

distribution de leur enzyme de référence s'en trouve donc modifiée. On espère ainsi observer la même modification en ce qui concerne la radioactivité; ceci confirmerait la fixation de la Naftazone aux lysosomes.

La fig. 12 montre que ces suppositions se vérifient bien en réalité. En effet, on remarque une profonde modification de distribution du marqueur lysosomal qui vient maintenant s'équilibrer dans des zones de densités beaucoup plus faibles. En ce qui concerne la radioactivité, on note qu'une part très significative accompagne les lysosomes indiquant bien une fixation aux lysosomes.

III. DISCUSSION

In vivo, la distribution de la radioactivité obtenue en centrifugation différentielle après injection de 22 µg de C¹⁴-Naftazone, révèle, qu'au temps 1 et 10 min la C¹⁴-Naftazone se localise préférentiellement dans des fractions N et P à savoir deux fractions contenant des fragments de la membrane plasmique en quantité importante.

Le temps de 30 min, quant à lui, montre une distribution différente qui laisserait penser à un "transfert" de la Naftazone de la membrane plasmique (fractions N contenant surtout les membranes bordant les canalicules biliaires) vers les lysosomes (fraction L).

Toutefois, il faut remarquer qu'à ce temps d'injection, une grosse partie de la Naftazone (approximativement 50 %) a été éliminée par rapport aux temps 1 et 10 min où, par gr de foie, on retrouve respectivement 132.736 cpm et 149.000 cpm contre 53.938 cpm au temps 30 min.

On pourrait peut-être alors imaginer que la quantité de Naftazone diminuant fortement la quantité restante se fixe et reste fixée sur des sites "plus spécifique", voire des protéines. Par contre lorsque la quantité de Naftazone dans le foie est importante, elle se fixerait plutôt sur des sites "non spécifiques" les lipides par exemple de la membrane plasmique ou des lysosomes pour lesquels elle aurait moins d'affinité donc qu'elle quitterait en premier lieu, s'attardant plus sur des sites pour lesquels elle a plus d'affinité.

En centrifugation différentielle lorsque *in vivo* la dose de Naftazone injectée est élevée il est malaisé d'identifier le profil de distribution de la radioactivité à l'un ou l'autre profil de distribution des enzymes de référence. La centrifugation isopycnique en gradient éclairé cependant la question.

Etant donné que dans le foie la quantité maximale de radioactivité se situe entre 10 et 15 min, c'est ce temps qui a été choisi (10 min) pour réaliser des gradients afin de préciser la localisation de la Naftazone dans les différentes fractions.

Globalement, il ressort de ces expériences en gradients que la C¹⁴-Naftazone semble se lier préférentiellement à la membrane plasmique et aux mitochondries. Mais non aux lysosomes ni au réticulum endoplasmique.

Il est certain que les analyses en gradient de densité se doivent d'être poursuivies et pour les faibles et les fortes doses de Naftazone. D'autre part le temps d'injection 30 min à faible dose aurait été intéressant pour confirmer la fixation éventuelle de la Naftazone *in vivo* aux lysosomes et à la membrane plasmique, ainsi que les résultats en centrifugation différentielles le suggèrent.

Finalement, les expériences réalisées *in vitro* : à savoir une ML (avec ou sans injection au préalable de triton) incubée en présence de C¹⁴-Naftazone, montrent que la Naftazone est bel et bien capable de se fixer en quantité appréciable sur les lysosomes.

Au terme des expériences menées *in vivo* et *in vitro*, les résultats ne semblent pas contradictoires, ainsi qu'ils paraissent à première vue.

On peut résumer l'ensemble des faits observés comme ceci, en ayant bien en vue que les résultats obtenus sont trop partiels pour en tirer des conclusions définitives.

Lorsque la dose de Naftazone est faible, celle-ci se fixe *in vivo* sur la membrane plasmique et les lysosomes vraisemblablement. Lorsque la dose de Naftazone injectée est élevée, la distribution du composé s'oriente surtout vers la membrane plasmique et les mitochondries. On aurait tendance à assimiler la première situation (faible dose) à une fixation spécifique, la deuxième à une fixation non spécifique. *In vitro*, dans des conditions expérimentales, la Naftazone est à même de se fixer sur les lysosomes.

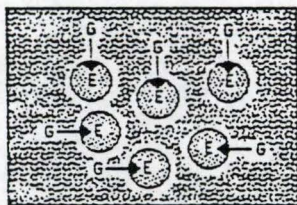
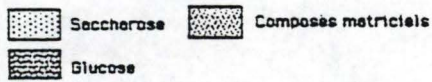
Une expérience *ex vivo* analogue à celles présentées ici a été réalisée en utilisant comme matériel des hépatocytes en culture de rats foetaux. De la Naftazone tritiée en position 6 a été ajoutée aux boîtes de culture pendant 24 h. Au terme de ces 24 h, les cultures ont été lavées 10 fois avec 10 ml de solution de Dulbecco puis détachées de la boîte, homogénéisées au Potter et soumises au fractionnement cellulaire.

En premier lieu, les auteurs de cette expérience ont pu constater que la radioactivité se trouvait essentiellement dans la fraction soluble du cytoplasme. Il ne s'agissait pas d'une contamination car la radioactivité du liquide du dernier lavage des cellules était négligeable.

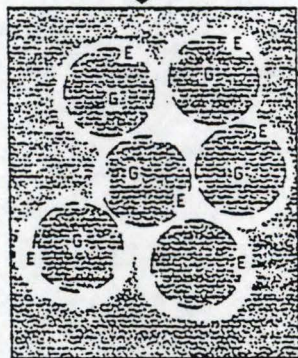
En outre, ils ont observé, par ordre décroissant, une activité spécifique relativement élevée dans les noyaux et les membranes. La radioactivité spécifique des lysosomes n'était pas négligeable et était en tout cas supérieure à celle des mitochondries et des microsomes. Ils soulignent également qu'au niveau du noyau, l'importance relative de la radioactivité peut s'expliquer par un phénomène de capture de la Naftazone tritiée lors de la mitose.

Ces mêmes auteurs ont également étudié la distribution de la Naftazone marquée dans les différentes fractions cellulaires du glomérule rénal. Ces glomérules ont été mis en contact avec la Naftazone pendant 2 h à 37 °C. Ils constatent que les fractions les plus riches sont par ordre décroissant :

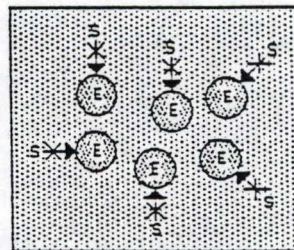
les membranes basales > les mitochondries > les lysosomes > les vésicules lisses



L'hypertonicité due au glucose perméant provoque le gonflement des lysosomes et la rupture de leur membrane



ACTIVITE LIBRE AUGMENTEE



Le membrane lysosomiale est imperméable au saccharose, qui se comporte comme protecteur osmotique



ACTIVITE LIBRE FAIBLE

Il semblerait que la Naftazone administrée par voie intraveineuse ou par voie orale subisse une élimination maximale dans les premières heures (0-2h). Toutefois, à côté d'une excrétion urinaire rapide et importante, il subsisterait une fraction de rétention portant sur une faible proportion de la radioactivité (environ 10 %) mais de période plus longue.

Ces conclusions proviennent d'une étude préliminaire faite sur la Naftazone visant à en établir quelques paramètres pharmacocinétiques à l'aide du même produit tritié. La Naftazone-³H associée au produit froid a été administrée par voie intraveineuse dans un premier temps, puis après 15 jours, par voie orale à deux témoins en bonne santé; l'évolution de la radioactivité a été déterminée dans le plasma et l'urine. Ici l'expression "radioactivité" recouvre l'ensemble constitué par la Naftazone-³H et ses métabolites tritiés (indiscernables entre eux). Dès lors les conclusions tirées restent prudentes.

2 ème partie : Effet protecteur de la Naftazone sur la membrane lysosomale soumise à un choc hypotonique

I INTRODUCTION

Dans la maladie veineuse, la situation est telle que l'on aboutit généralement à une stase veineuse qui établit avec le concours de divers phénomènes, un état d'hypoxie locale qui finalement plonge les cellules cibles en ischémie.

On a montré, dans l'introduction comment cet état d'ischémie réduit l'apport d'ATP à la cellule et par voie de conséquence diminue le rendement de la pompe électrogénique qui de ce fait, n'assure plus un pH intralysosomal adéquat.

Par voie de conséquence, les macromolécules ne sont plus dégradées en unités capables de traverser la membrane, les lysosomes deviennent hypertoniques, par appel d'eau, ils gonflent et finalement leur membrane se rompt cédant à la poussée de la pression interne.

Parmi les traitements causant des dommages aux lysosomes, l'activation isotonique au glucose paraît restituer le stress subi par la membrane lysosomale au cours de la maladie veineuse.

Activation isotonique au glucose

Des lysosomes de foie de rat incubés dans un milieu de faible pression osmotique éclatent et libèrent ainsi leur contenu .

En effet, le lysosome, incubé dans des solutions isotoniques de substances incapables de traverser la membrane, reste intact étant donné qu'il n'y a pas échange d'eau plus d'un

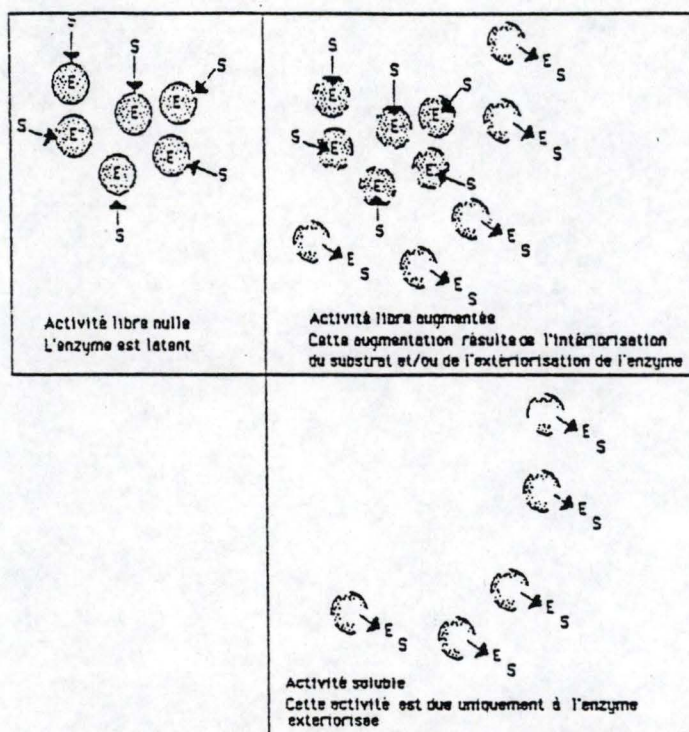


Fig 13- N-acétylglucosaminidase-Saccharose

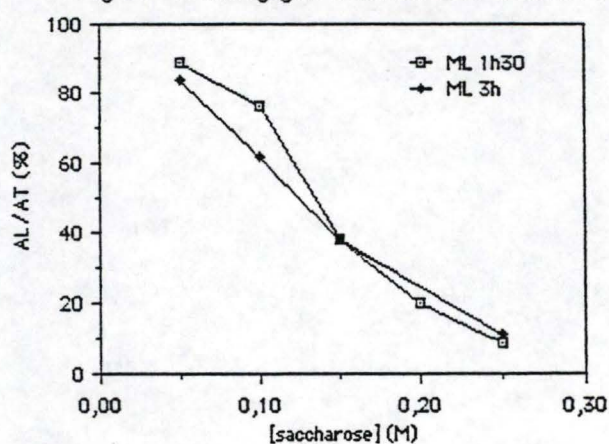


Fig 13 : Principe de déséquilibre osmotique.

Incubation des granules à 25°C dans des solutions de saccharose de concentrations décroissantes. Temps d'incubation constant : 15 minutes.

côté que de l'autre. C'est le cas du saccharose qui agit comme protecteur osmotique. Entre ces deux extrêmes, l'incubation des lysosomes dans une solution 0,25 M d'un composé apte à traverser la membrane lysosomale tels le glucose et le glycérol provoque l'éclatement de ces organites après un certain temps.

Le pouvoir osmotique du milieu d'incubation se conjugue à celui des substances osmotiquement actives présentes dans les lysosomes rendant ceux-ci hypertoniques et démasquant comme précédemment les enzymes lysosomales.

La latence est une propriété exprimée par la plupart des hydrolases lysosomales. Elle résulte de l'accessibilité des enzymes au substrat. En effet quand les lysosomes sont intacts, le substrat ne peut accéder aux enzymes et aucune activité de l'enzyme ne peut être décelée : l'enzyme est latent. Quand la membrane est endommagée, par contre, l'activité est démasquée et mesurable.

Il convient de définir quelques notions:

- l'activité totale est obtenue lorsque la membrane des lysosomes est suffisamment rompue pour que leurs enzymes aient un accès non limité à leur substrat.

- l'activité libre exprime la proportion d'enzyme accessible au substrat (exprimée en pourcentage de l'activité totale). Soit le substrat seul peut franchir la membrane lysosomale altérée, soit l'enzyme et donc aussi le substrat peuvent traverser cette membrane. Les deux possibilités traduisent une altération plus ou moins prononcée de la membrane.

- l'activité soluble correspond à la proportion d'hydrolases lysosomales passée totalement à l'extérieur du granule et ne pouvant plus de ce fait être sédimentée par centrifugation.

II RESULTATS

Les expériences présentées ci-après ont été réalisées sur des fractions mitochondriales totales (M+L) de foie de rat.

Importance de la tonicité du milieu d'incubation de la fraction ML

La fig 13 confirme bien le principe de déséquilibre osmotique :

Lorsque la fraction ML (testée 1 h30 ou 3 h après sa préparation) est préincubée durant 15 min dans du saccharose 0,25 M et donc isotonique, la protection est maximale. En deçà,

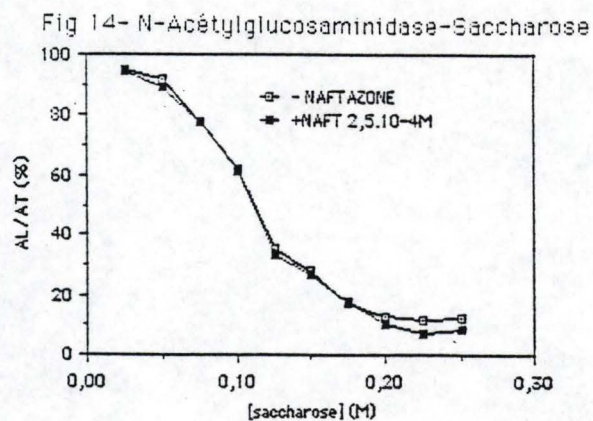


Fig 14 : Activation des lysosomes par mise en milieu hypotonique de saccharose.

Incubation des granules un temps court à 0°C dans des solutions de saccharose de concentrations décroissantes, en absence ou en présence de Naftazone 2,5.10⁻⁴ M.

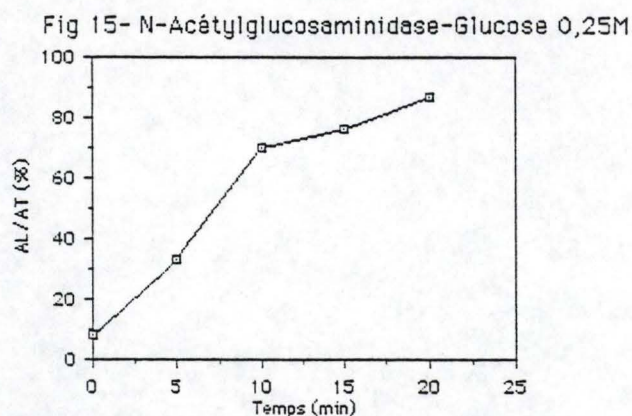


Fig 15 : Activation isotonique des lysosomes par le glucose.

Incubation des granules à 25°C en présence de glucose 0,25 M , Tris 5 mM, pH 7,5.

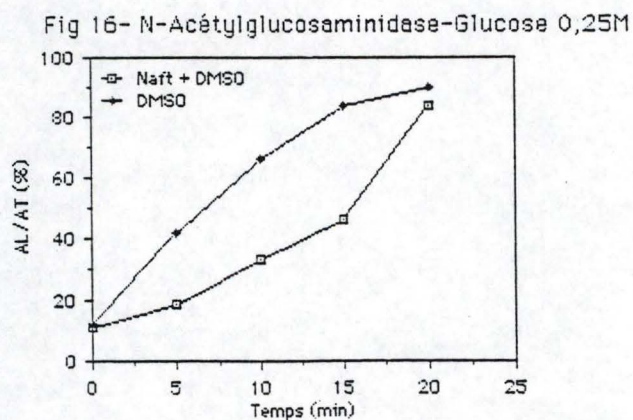


Fig 16 : Inhibition par la Naftazone de l'activation isotonique au glucose.

Incubation des granules à 25°C en présence de glucose 0,25 M , Tris 5 mM, pH 7,5, en absence ou en présence de Naftazone 2,5.10⁻⁴ M .La concentration en DMSO est de 1%.

l'hypotonie croissante du milieu d'incubation se traduit par l'augmentation de l'activité libre de la N-acétylglucosaminidase, résultant d'une proportion sans cesse grandissante des lysosomes altérés.

Action de la Naftazone sur une activation hypotonique au saccharose

La fig 14 montre que l'activation des lysosomes en milieu hypotonique de saccharose n'est pas affectée par la Naftazone $2,5 \cdot 10^{-9}$ M. Il s'agit là d'un processus résultant d'une entrée très rapide d'eau.

Activation isotonique par le glucose

Les granules ont été préincubés durant des temps croissants (0, 5, 10, 15 et 20 min) dans une solution isotonique de glucose (0,25 M) en présence de tampon TRIS 5 mM pH 7,5 à 25 °C. Ceci constitue l'étape d'activation proprement dite.

En accord avec ce qui a été précédemment dit à propos de la perméabilité de la membrane au glucose, la fig 15 montre que l'activité libre de l'hydrolase lysosomale augmente proportionnellement au temps de préincubation. Finalement après 20 min, 80 % des lysosomes ont éclaté.

Inhibition par la Naftazone de l'activation isotonique au glucose

L'expérience présentée à la fig 16 a été réalisée dans les mêmes conditions qu'à la fig 15 si ce n'est que la Naftazone est ajoutée au milieu de préincubation. La Naftazone étant particulièrement insoluble dans l'eau, a été dissoute dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) dont la concentration dans le milieu de préincubation est de 1 %. Le contrôle contient le solvant seul en même proportion. On remarque que l'effet activateur du glucose est contrecarré par la Naftazone. Dans ce cas, il s'agit d'un processus conditionné par l'entrée de glucose beaucoup plus lente que l'entrée d'eau.

Effet de la concentration en Naftazone (Fig 17 et 18)

Dans cette expérience dont le protocole est identique au précédent, différentes concentrations en Naftazone ont été testées.

La fig 17 montre que l'activation des lysosomes en milieu isotonique de glucose est ralentie par les différentes concentrations en Naftazone testées. Il semblerait qu'au plus le glucose pénètre c'est-à-dire au plus le temps de préincubation est long, au plus l'effet

Fig 18.1a- N-acétylglucosaminidase-Glucose 0,25M

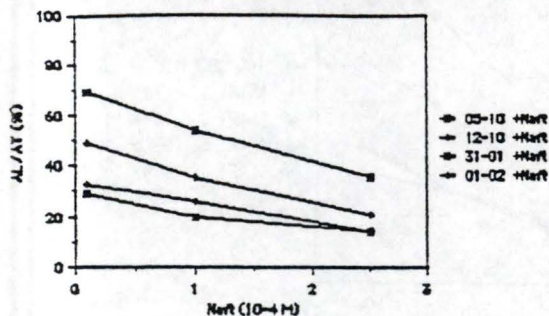


Fig 18.2a- N-Acétlyglucosaminidase-Glucose 0,25M

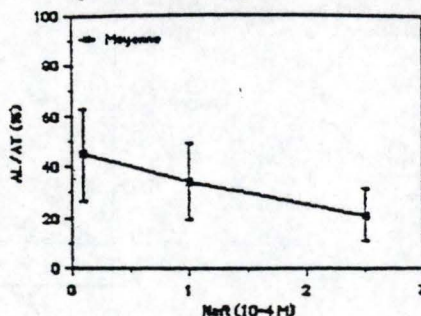


Fig 18.1b- Cathepsine C-Glucose 0,25M

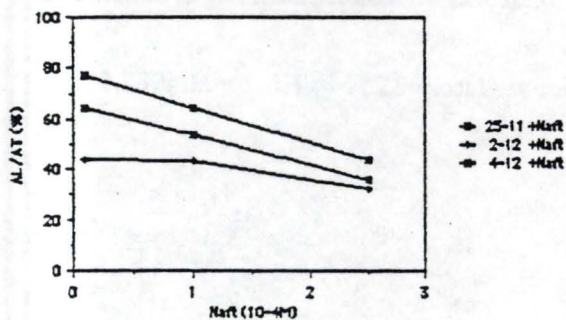


Fig 18.2b- Cathepsine C-Glucose 0,25M

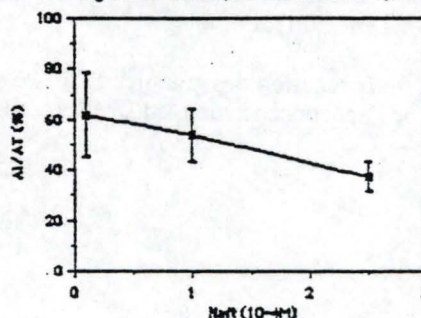


Fig 18.1c- Phosphatase acide-Glucose 0,25M

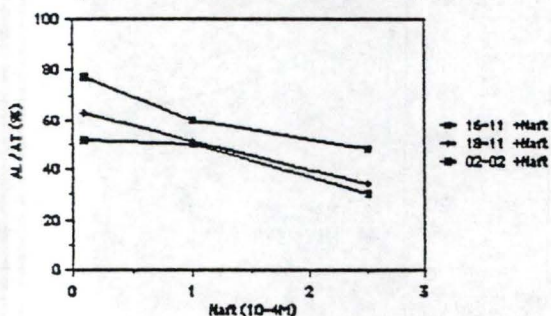


Fig 18.2c- Phosphatase acide-Glucose 0,25M

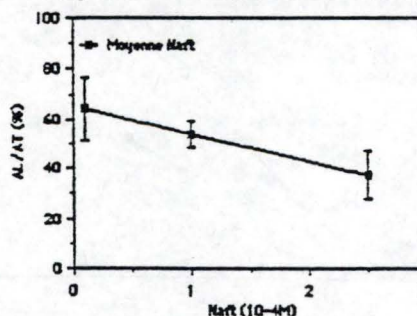


Fig 18 : Effet de la concentration en Naftazone.

Incubation des granules à 25°C en présence de glucose 0,25 M , Tris 5 mM, pH 7,5. Temps d'incubation constant : 15 minutes. Concentration variable en Naftazone, concentration en DMSO de 1%.

L'activation est suivie par la libération de la N-acétylglucosaminidase (fig 18-1a), de la cathepsine C (fig 18-1b), de la phosphatase acide (fig 18-1c).

Aux figures 18-2a, 18-2b, 18-2c sont présentées les courbes moyennes d'activation des lysosomes (moyennes des 3 expériences avec déviation).

Fig 17- N-Acétyleglucosaminidase-Glucose 0,25M

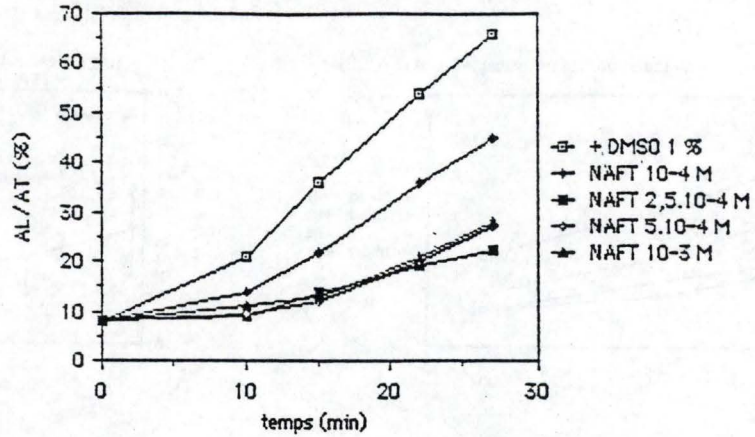


Fig 17 : Effet du temps d'incubation en présence de concentrations croissantes en Naftazone

Incubation des granules à 25°C en présence de glucose 0,25 M , Tris 1 mM, pH 7,5.
La concentration en DMSO est de 1%.

Fig 19- N-Acétyleglucosaminidase-Glucose 0,25M

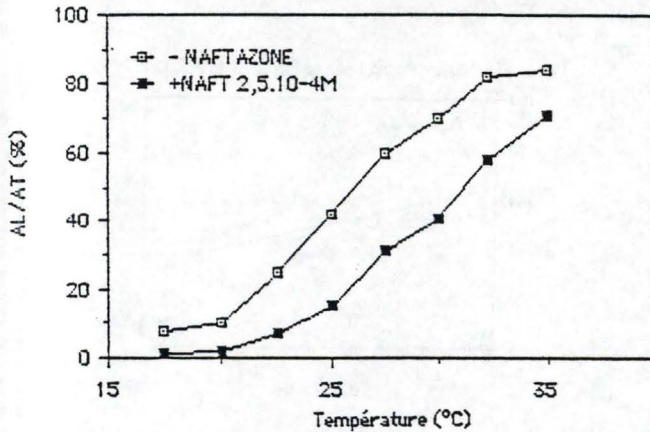


Fig 20- N-Acétyleglucosaminidase-Glucose 0,25M

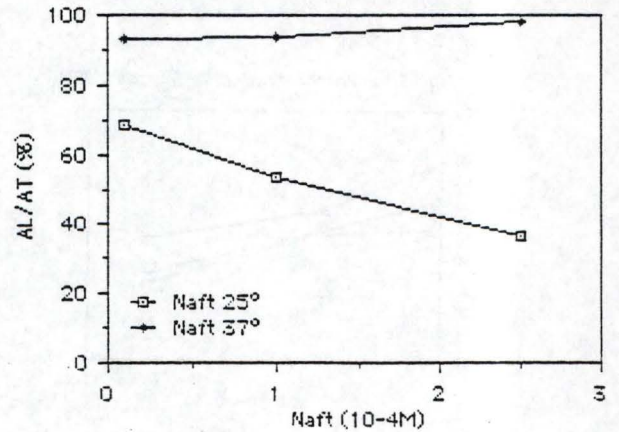


Fig 19 et 20 : Influence de la température sur l'activation des lysosomes.

Incubation des granules à 25°C en présence de glucose 0,25 M , Tris 5 mM , pH 7,5.

A la figure 19, l'incubation est réalisée en présence ou en absence de Naftazone 2,5.10⁻⁴ M pendant 15 minutes aux différentes températures.

A la figure 20, seul l'effet de la Naftazone à différentes concentrations a été exploré à 25°C et 37°C uniquement.

protecteur de la Naftazone est marqué. A noter également qu'à partir de la concentration de $2,5 \cdot 10^{-4}$ M, augmenter la concentration de Naftazone n'apporte aucune protection supplémentaire.

La durée de préincubation en présence de glucose est de 15 min à 25 °C. La rupture osmotique des lysosomes causée par la préincubation en présence de glucose est évaluée en mesurant l'activité libre des 3 enzymes : la N-acétylglucosaminidase, la cathepsine C et la phosphatase acide.

On observe à la fig 18 que pour ces 3 enzymes, la protection maximale est offerte pour une concentration finale de $2,5 \cdot 10^{-4}$ M. A de plus faibles concentrations, l'influence de la Naftazone décroît et devient négligeable pour la concentration $0,1 \cdot 10^{-4}$ M : les valeurs élevées des activités libres en sont les témoins.

Effet de la température

A la fig 19 sont représentés les activités libres de la N-acétylglucosaminidase d'une fraction ML incubée en présence de glucose isotonique et en présence ou non de Naftazone à différentes températures; on constate que la protection est d'autant meilleure que la température est basse. Tout se passe comme si le seuil de température à partir duquel l'activation commence était abaissé de plusieurs degrés en présence de Naftazone.

A la fig 20 seul l'effet de la Naftazone à différentes concentrations a été exploré à 25°C et 37 °C uniquement.

A 37°C, l'activité libre de la N-acétylglucosaminidase quelle que soit la concentration en Naftazone est considérable, de l'ordre de 100 %. Il semblerait qu'à cette température, la Naftazone ne soit plus du tout efficace. Par contre lorsque le temps de préincubation est de 25 °C on constate une protection très nette de la membrane lysosomale par la Naftazone. Cette protection se traduit par une activité libre de l'ordre de 30 %; en absence de Naftazone, celle-ci est d'environ 80 %.

Evaluation statistique de l'effet de la Naftazone

Les figures 21, 22, 23 et 24 rendent compte de l'effet de la Naftazone sur l'activation des lysosomes soumis au choc osmotique en présence de glucose.

Quatre enzymes différents ont été dosés: l'arylsulfatase, la phosphatase acide, la N-acétylglucosaminidase et la cathepsine c.

Phosphatase acide (fig 21)

Fig 21.1- Phosphatase acide-Glucose 0,25M

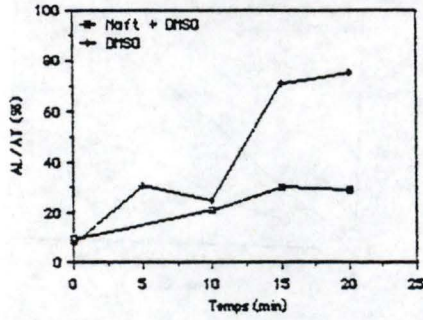


Fig 22.1- Aryl sulfatase-Glucose 0,25M

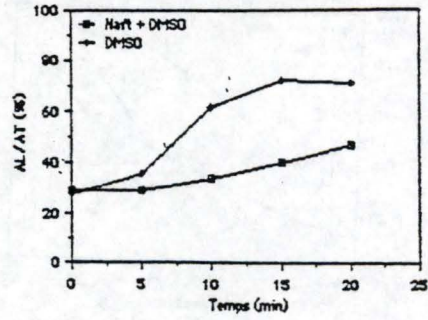


Fig 21.2- Phosphatase acide-Glucose 0,25M

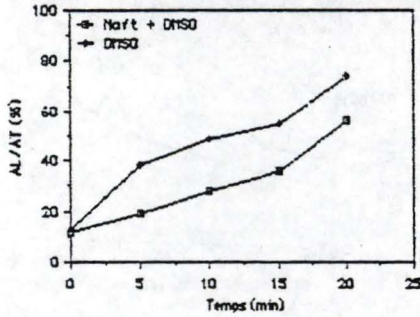


Fig 22.2- Aryl sulfatase-Glucose 0,25M

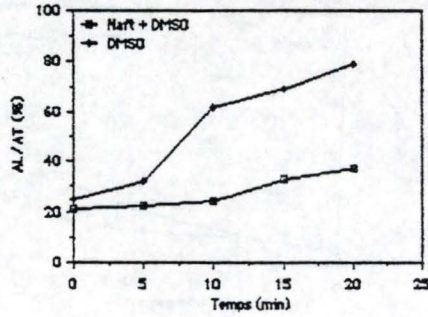


Fig 21.3- Phosphatase acide-Glucose 0,25M

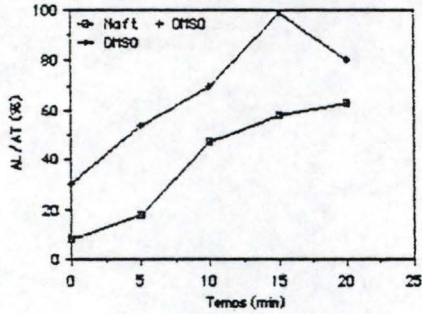


Fig 22.3- Aryl sulfatase-Glucose 0,25M

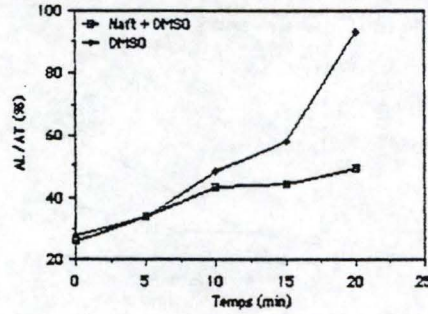


Fig 21, 22, 23, 24 : Evaluation statistique de l'effet de la Naftazone.

Incubation des granules à 25°C en présence de glucose 0,25 M, Tris 5mM , pH 7,5, en absence ou en présence de Naftazone $2,5 \cdot 10^{-4}$ M. L'activation est suivie par la libération de la phosphatase acide (Fig 21), l'arylsulfatase (Fig 22), de la N-acétylglucosaminidase (Fig 23), de la cathepsine C (Fig 24).

Fig 23.1- N-Acétylglucosaminidase-Glucose 0,25M

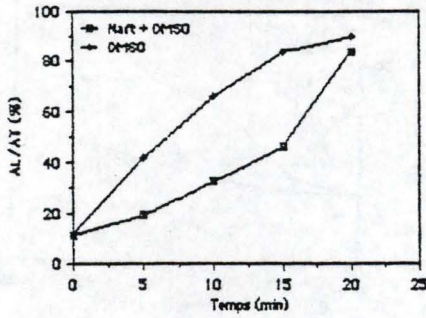


Fig 24.1- Cathepsine C-Glucose 0,25M

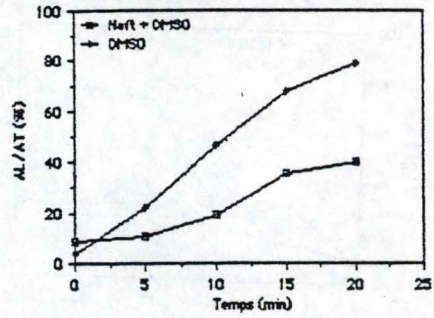


Fig 23.2- N-Acétylglucosaminidase-Glucose 0,25M

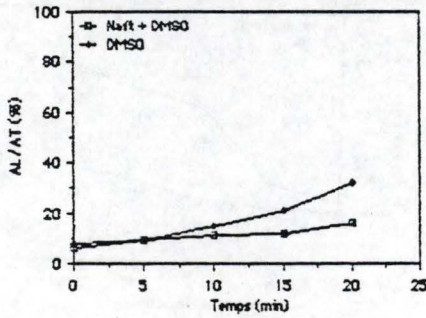


Fig 24.2- Cathepsine C-Glucose 0,25M

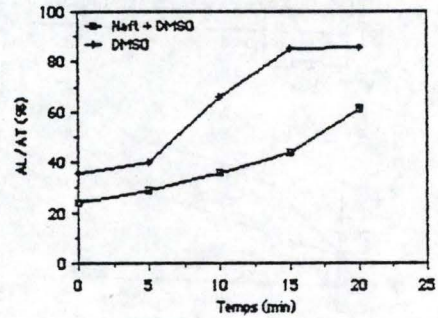


Fig 23.3- N-Acétylglucosaminidase-Glucose 0,25M

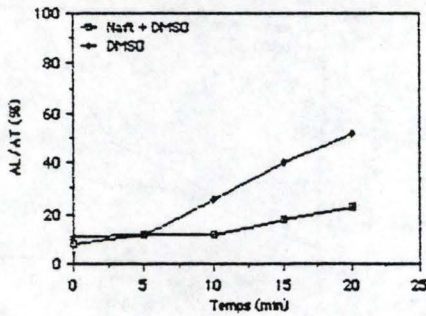


Fig 21, 22, 23, 24 : Evaluation statistique de l'effet de la Naftazone.

Incubation des granules à 25°C en présence de glucose 0,25 M, Tris 5mM , pH 7,5, en absence ou en présence de Naftazone $2,5 \cdot 10^{-4}$ M. L'activation est suivie par la libération de la de la phosphatase acide (Fig 21), le l'arylsulfatase (Fig 22), de la N-acétylglucosaminidase (Fig 23), de la cathepsine C (Fig 24).

En accord avec les résultats précédents, on note d'une manière générale une augmentation de l'activité libre de la phosphatase acide au cours de la préincubation en présence de glucose.

Cette augmentation évolue à partir de $\pm 15\%$ après 0 min de préincubation, s'accroît au cours du temps pour finalement atteindre des valeurs de pourcentage comprises entre 75 et 80 %.

En présence de Naftazone, l'activation par le glucose qu'elle soit forte ou faible est ralentie et après 20 min de préincubation, la proportion de lysosomes détruits est moindre : entre 24 et 63% seulement.

Arylsulfatase (Fig 22)

Dans ce cas, le même effet protecteur de la Naftazone est observé : après 20 min de préincubation en présence de Naftazone, on trouve des valeurs d'activité libres comprises entre 37 et 49 %, contre 71 et 93 % sans Naftazone.

N-acétylglucosaminidase-Cathepsine C (fig 23, 24)

De la même manière, les résultats concernant la N-acétylglucosaminidase et la cathepsine c reproduisent la même séquence d'évènements que celle observée pour les 2 enzymes présentés précédemment.

Que l'activation soit faible ou forte, la Naftazone a une action protectrice retardant la rupture des lysosomes suite à leur gonflement.

A la fig 25 sont reprises les moyennes concernant ces données individuelles. Au tableau I se trouve l'analyse de la variance des activités libres en absence et en présence de Naftazone.

Fig 25.1- N-acétylglucosaminidase-Glucose 0,25M

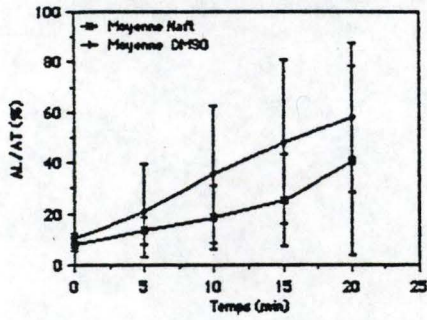


Fig 25.3- Aryl sulfatase-Glucose 0,25M

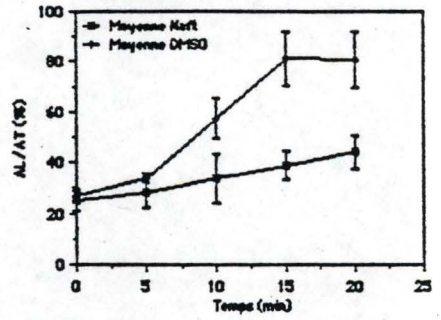


Fig 25.2- Phosphatase acide-Glucose 0,25M

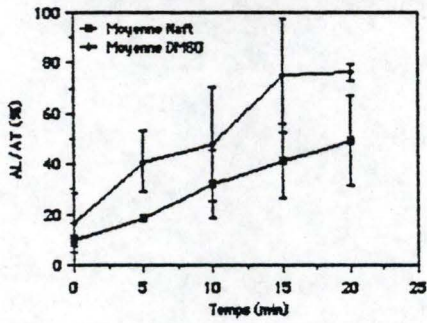


Fig 25.4- Cathepsine C-Glucose 0,25M

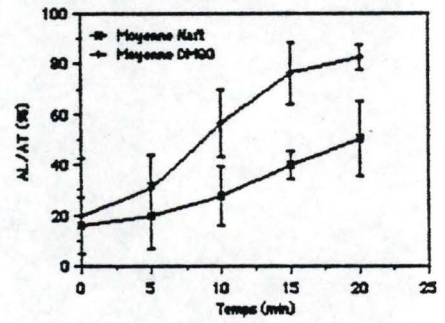


Fig 25 : Courbes moyennes d'activation des lysosomes.

Sont présentées ici les moyennes avec déviations des expériences des figures 21, 22, 23, 24.

Tableau I :

Analyse de la variance des activités libres des différentes enzymes lysosomiaux mesurés après incubation en présence de glucose

PROBABILITES			
Enzyme	Temps	Effet de la Naftazone	Interaction
N-acétylglucosaminidase	0,0233	0,0801	0,2417
Phosphatase acide	0,0002	0,0265	0,2003
AryleSulfatase	0,0000	0,0375	0,0089
Cathepsine c	0,0004	0,0367	0,0501

La fig 25 représente les moyennes des résultats présentés pour chaque enzyme. Rappelons que la préincubation s'est fait en présence ou en absence de Naftazone ($2,5 \cdot 10^{-4}$ M); les contrôles comportent le solvant (DMSO) seul en même proportion.

L'analyse de la variance montre que les écarts entre les moyennes des activités observées en présence de glucose et celles observées en présence de glucose et de Naftazone sont significatifs pour 3 enzymes seulement : la phosphatase acide, l'aryl sulfatase et la cathepsine c.

En effet, en ce qui concerne la N-acétylglucosaminidase, l'analyse n'a pu mettre en évidence l'effet protecteur de la Naftazone, ce qui ne signifie pas pour autant qu'elle n'a pas d'effet. Ceci serait imputable aux écarts importants qui existent entre les valeurs d'activité libre contrôle de l'expérience à la fig 23-1 et celles des 2 autres expériences (23-2 et 23-3).

Quoiqu'il en soit, globalement, on peut affirmer que la Naftazone protège la membrane lysosomale contre le choc osmotique dû à la pénétration du glucose.

III DISCUSSION

Prise individuellement, chaque expérience montre de grandes fluctuations quant aux valeurs d'activités libres, reflet de l'activation due au glucose. Toutefois prise individuellement chacune montre une protection due à la Naftazone. Cette variabilité peut être attribuée à divers facteurs notamment le foie du rat dont l'âge et le poids influent certainement sur la composition enzymatique, l'âge de la ML,...

Quoiqu'il en soit, globalement, on peut dire qu'à 25 °C, la Naftazone s'oppose à l'activation des lysosomes par le glucose en retardant leur éclatement. Toutefois, son mode d'action est encore inconnu : protège-t-elle la membrane lysosomale en s'insérant dans la bicouche lipidique ou inhibe-t-elle la pénétration du glucose?

C'est à cette question que nous allons essayer de répondre dans la troisième partie du travail.

3 ème partie : Analyse de la fixation de la C¹⁴-Naftazone sur les lysosomes et les membranes des lysosomes *in vitro*

I. INTRODUCTION

En conclusion des expériences d'activation effectuées *in vitro*, il ressort que la Naftazone contrecarre le choc osmotique subi par les lysosomes. Il reste maintenant à essayer de déterminer son mode d'action.

C'est au niveau de la membrane lysosomale que tout semble se jouer. L'activation au glucose est un traitement qui inflige un "stress" à la membrane lysosomiale.

En réalité, il semblerait que la Naftazone ne soit efficace que contre ce genre de stress mécanique. En effet, elle ne protège pas les lysosomes incubés à pH 5 et à 37 °C. Ce type de traitement lèse les lysosomes d'une toute autre manière que ne le fait l'activation au glucose : l'incubation en milieu acide et à 37 °C stimulerait les phospholipases lysosomales notamment qui s'attaquent alors aux lipides de la membrane lysosomale.

La membrane lysosomale est constituée globalement, comme toute membrane biologique d'une bicouche de phospholipides dans laquelle sont enchassées diverses protéines.

Dés lors la Naftazone a la possibilité d'agir à 3 niveaux :

- soit par une interaction avec les lipides;
- soit par une interaction avec les protéines;
- soit par une interaction avec les deux à la fois.

a) Interaction avec les lipides

● 1ère hypothèse :

Une première hypothèse qui pourrait être émise à ce niveau est que la Naftazone étant donné sa nature hydrophobe, s'insérerait dans la membrane lysosomale entre les phospholipides. Elle permettrait ainsi une expansion de la membrane qui pourrait alors subir une distension plus grande retardant ainsi l'éclatement.

Cette idée d'expansion se base, sur des études effectuées avec des anesthésiques (généraux?). En effet, il a été montré que les anesthésiques étendent la membrane biologique. A partir de là, l'hypothèse du volume critique a été développée pour expliquer le mécanisme de l'anesthésie : l'anesthésique entraînerait l'expansion d'une région hydrophobe dans les membranes nerveuses. Cette expansion semble fort probable étant donné qu'une augmentation de pression réduit l'état anesthésique.

● 2^e hypothèse :

L'insertion de la Naftazone dans la membrane lysosomale pourrait également diminuer la fluidité de la membrane et ainsi réduire la diffusion passive d'eau de même que celle du glucose, cela dans l'hypothèse où le transporteur de glucose n'existerait pas dans la membrane lysosomale. Agissant ainsi, la Naftazone réduirait le gonflement du lysosome à la suite d'un choc osmotique.

En ce qui concerne l'eau, cet effet a déjà été mis en évidence pour le cholestérol : l'addition d'une quantité importante de cholestérol aux bicouches de lécithine d'oeuf réduit la perméabilité de cette bicouche à l'eau (Bittman and Blau, 1972). Ce processus serait vraisemblablement la conséquence d'une réduction de la mobilité des chaînes d'acides gras, mais pourrait aussi être dûe aux changements dans l'entassement du glycérol dans la région externe de la bicouche. En réalité la situation est fort complexe.

b) Interaction avec les protéines

On vient de voir précédemment que le fait d'inhiber la pénétration du glucose était un moyen d'éviter le gonflement du lysosome.

Envisageons maintenant le cas où le transporteur de glucose existerait bel et bien dans la membrane lysosomale. Jaillit alors l'idée que la Naftazone pourrait agir par un blocage de ce transporteur en se liant spécifiquement sur certains sites de fixation, voire celui du glucose.

c) Interaction lipides et protéines

Si le transport de glucose existe, c'est vraisemblablement une protéine enchassée dans la matrice lipidique de la membrane du lysosome. Dès lors, elle requiert un environnement de fluidité adéquate pour être capable de transporter le glucose à travers la membrane. La conversion des lipides avoisinants d'une phase liquide à une phase rigide augmente la viscosité de la phase lipidique et réduirait sa compressibilité, réduisant ainsi le transport du glucose à travers la membrane. La Naftazone pourrait agir à ce niveau.

Une action similaire sur le transporteur de glucose de la membrane des globules rouges a déjà été mise en évidence pour les esters de l'acide benzoïque. Ces esters ont été testés en tant qu'inhibiteurs éventuels du transport de glucose dans la membrane des érythrocytes en raison de la similitude de leur structure moléculaire avec les anesthésiques locaux (eux aussi inhibiteurs du transporteur) : en effet, ils possèdent un résidu aromatique

et une chaîne variable de longueur moyenne. Lacko *et al.* (1981) ont montré que tous les esters testés inhibent le transport du glucose d'une manière compétitive.

Il semblerait que la raison principale de l'inhibition soit l'hydrophobicité de la molécule. Par exemple, pour la benzocaïne, le groupement NH_2 n'est pas nécessaire à son inhibition. L'inhibiteur se lierait à la phase apolaire de la membrane augmentant la fluidité globale de la membrane. Cette modification se transmettrait aux lipides de la couronne encerclant les protéines intégrales.

L'augmentation de fluidité aurait comme conséquence un envasement plus marqué des protéines intégrales dans la membrane, comme l'ont montré Shinitzky et Inbar (1976). De cette façon, le site de liaison pour le glucose serait masqué. Le terme de compétition devrait donc être entendu de façon indirecte; la liaison d'un ester benzoïque diminuerait de façon indirecte la liaison du glucose ou d'un hydrate de carbone en général. On peut supposer que le mécanisme d'action de la Naftazone se déroulerait de façon semblable.

In fine, c'est l'interaction de la Naftazone avec la membrane lysosomale que nous avons choisi d'investiguer.

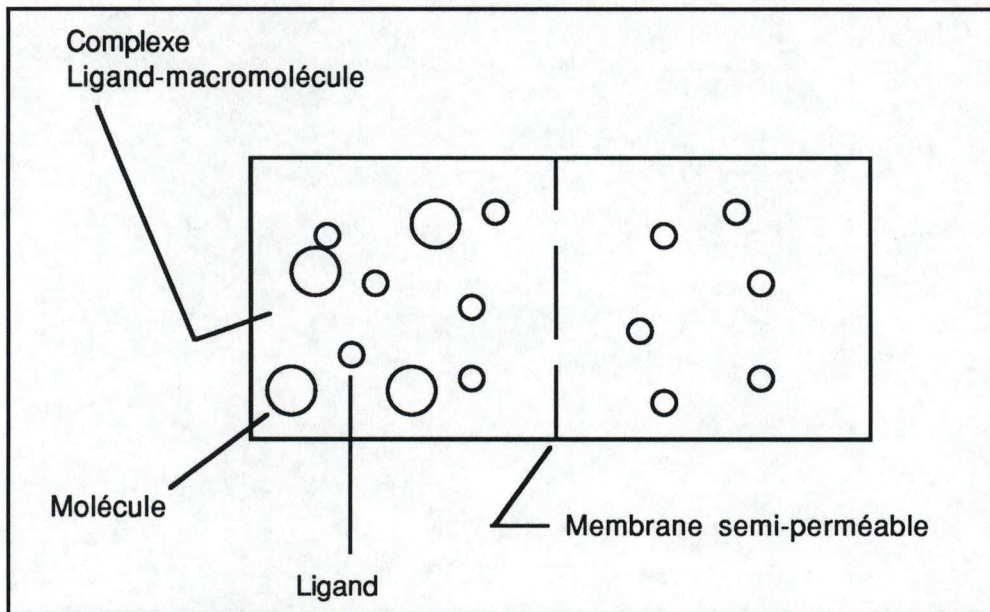
II. TECHNIQUE DE DÉTERMINATION DE LA FIXATION D'UN LIGAND

Différentes techniques ont été mises au point pour étudier la fixation d'un ligand sur les protéines.

Nous allons passer en revue les plus importantes et envisager leur principe, leurs avantages et inconvénients principaux.

1) Dialyse

a) principe : cette méthode fut la plus utilisée pour étudier la liaison des ligands comme médicaments sur les protéines.



Les protéines sont contenues dans un compartiment qui est séparé du second compartiment par une membrane semi-perméable c'est-à-dire perméable à tous les composants du système excepté aux protéines. A l'équilibre, la concentration du ligand libre est la même des deux côtés de la membrane. Il faut toutefois noter que la dilution doit être suffisante pour empêcher toute interaction non-souhaitée entre les molécules. Si la quantité totale du ligand dans le système est connue, la quantité de ligand lié aux protéines peut être facilement calculée. La concentration du ligand libre dans le compartiment dépourvu de protéines peut être mesurée par des techniques d'analyse telles que la mesure de la densité optique, la radioactivité, etc...

b) Désavantages et avantages

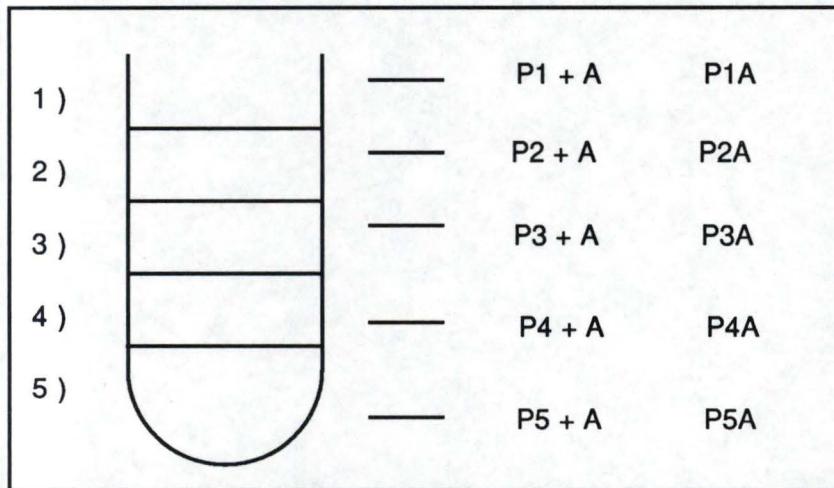
Le principal désavantage de cette technique est le temps nécessaire pour obtenir l'équilibre. Cette durée est de l'ordre de 48 h. Cette méthode demande également l'utilisation d'une grande quantité de protéines. Mais la plupart des ces désavantages peuvent être évités par l'utilisation de microsystème à dialyse. Le grand avantage de ce procédé est son aspect relativement simple et peu onéreux.

2°) La centrifugation partielle

a) principe:

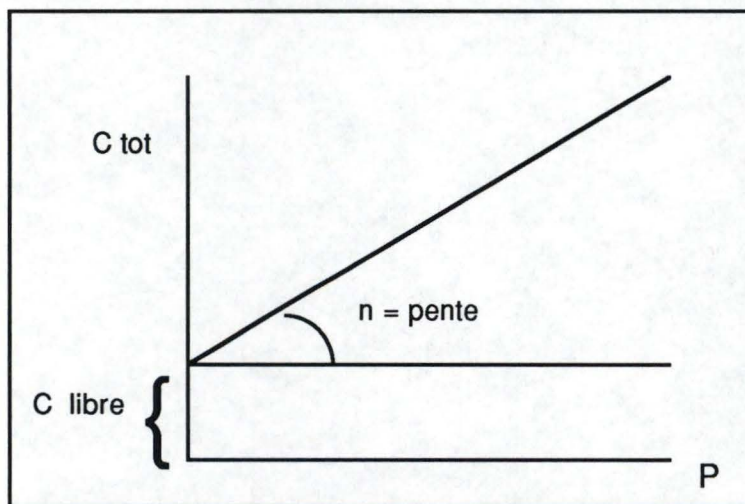
Cette méthode consiste à soumettre un tube contenant une solution de protéine et de ligand à la centrifugation pendant un certain temps de manière à obtenir un gradient de

protéines tel que dans chacune des couches représentées ci-dessous les relations suivantes se vérifient :



$$P_5 > P_4 > P_3 > P_2 > P_1$$

Dans chaque compartiment, P et PA varient tandis que A libre reste constant. Pour calculer la concentration libre de ligand, on procède comme suit :



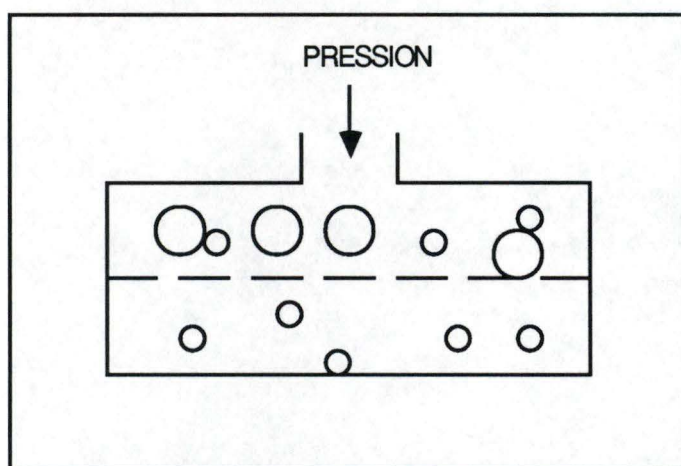
$$C \text{ total} = C \text{ libre} + n P$$

ou n = nombre de sites de fixation

3) Ultrafiltration

a) principe

L'ultrafiltration diffère de la dialyse à l'équilibre par le simple fait que la phase dépourvue de protéines est totalement séparée de la phase contenant les protéines, car celles-ci sont retenues par une membrane semi-perméable dont les pores ne permettent pas leur passage.



La pression exerce une force telle que les molécules de la solution qui ont un diamètre inférieur à la dimension des pores, traversent la membrane. Les autres seront évidemment retenues par la membrane.

b) Remarques

La méthode est valable pour autant qu'on n'ultrafiltre pas plus de 1/10 du volume de départ, sinon, les équilibres seraient modifiés.

Pratiquement, les membranes ou les cellules contenant les récepteurs (R) sont équilibrées avec le ligand (L) radioactif qui est amené à la température désirée. Ensuite la mixture est filtrée.

Cette technique peut être utilisée seulement si la durée de vie du complexe est significativement plus longue que le temps requis pour la filtration et le lavage. Pour ralentir le taux de dissociation du ligand, le lavage du complexe RL est réalisé avec du tampon glacé.

En général, l'expérience de "binding" par la méthode de filtration n'est pas conseillée pour les ligands qui possèdent une constante de dissociation supérieure à 5 nM. Par rapport à la dialyse, cette technique nécessite beaucoup moins de temps et utilise de plus petites quantités de protéines.

4) Centrifugation

a) Principe:

Dans un premier temps, la mixture récepteur-ligand est équilibrée à température désirée. Ensuite, cette mixture est transférée dans un bain glacé pendant quelques minutes, suit alors la centrifugation qui a pour but de sédimenter le ligand lié à son récepteur ou une protéine en général de celui qui est libre dans la solution. Le culot peut ensuite être lavé.

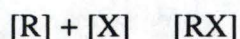
b) Désavantage et avantages

Une telle méthode permet si le culot de sédimentation n'est pas lavé, le maintien du complexe ligand-récepteur (L-R) de rester en équilibre avec le ligand libre qui reste présent dans le liquide inclus dans le culot ou le volume du liquide inclus dans le culot. Pour mesurer le volume ligand libre, on ajoute à la mixture L-R (du culot) un composé marqué tel de l'insuline C¹⁴, du sucrose C¹⁴, de la glycine C¹⁴ ou tout autre composé dénué de toute affinité pour la membrane. La quantité "captée" de composé représente une mesure du volume "inclus".

C'est cette dernière technique que nous avons utilisée dans nos expériences. Toutefois, le "volume inclus" n'a pas été mesuré à l'aide d'un composé radioactif, mais son volume a été évalué et retranché des valeurs du culot. La technique de filtration a également été essayée; mais des problèmes d'étanchéité et de contamination nous ont forcés à l'abandonner.

III CONSIDERATIONS THEORIQUES

Il existe toute une dynamique d'interaction entre un ligand [X] et son récepteur [R] ou la protéine sur laquelle il se fixe. En effet on peut écrire l'équation suivante :



avec $K_d = \text{constante de dissociation} = \frac{[R] \cdot [X]}{[RX]}$

$$nP = [RX] + [R]$$

où n = nombre de sites de fixation par protéine;

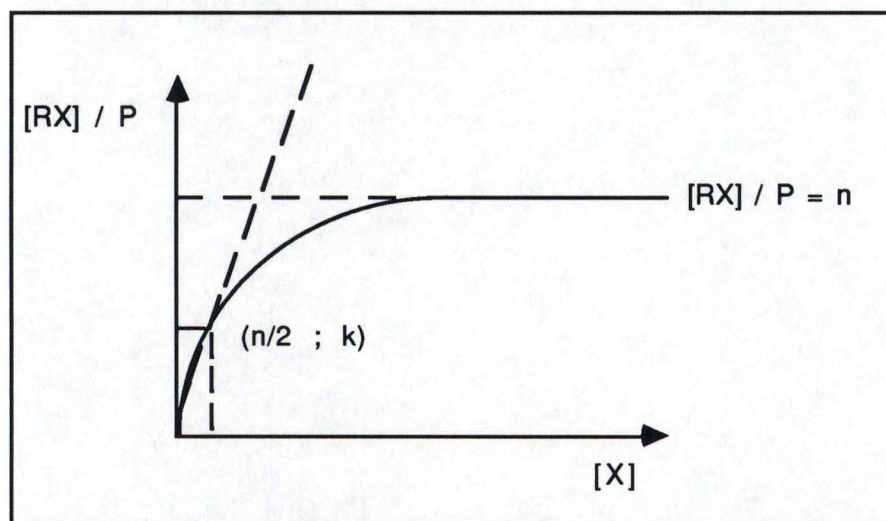
P = concentration molaire en protéine;

nP = concentration des sites de fixation.

L'expression précédente peut s'exprimer après transformation sous la forme suivante :

$\frac{[RX]}{P} = \frac{nX}{K_d + [X]}$

Une telle expression lorsqu'elle est mise en graphique avec $[X]$ en abscisse et le rapport $[RX] / P$ en ordonnée donne une courbe qui est une hyperbole rectangulaire du type d'une courbe de saturation de Michaelis-Mentem. Elle tend asymptotiquement vers n



Les concentrations $[X]$ peuvent être déterminées expérimentalement. Il en est de même pour la détermination de $[RX] / P$. Les valeurs de K_d et n , seront obtenues de la manière suivante : à demi-saturation, $K_d = [X]$.

Cependant, la valeur asymptotique reste difficile à mesurer ainsi que la pente à l'origine. La cause en est le manque de précision des mesures à des concentrations très faibles ou très fortes. Par conséquent, dans un tel processus saturable, on utilisera plutôt le procédé de Scatchard :

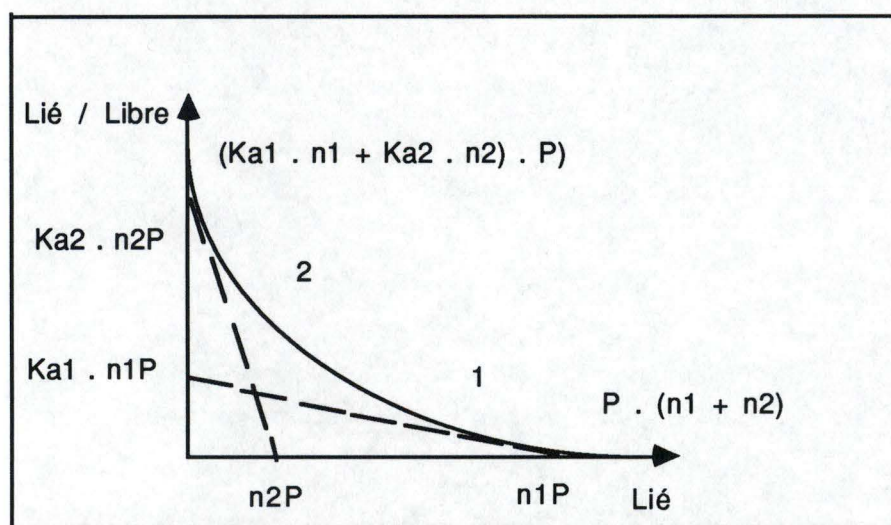
$$\frac{[RX]}{[X]} = K_a \cdot nP - K_a \cdot [RX]$$

Si l'on porte en graphique $[RX] / [X]$ en fonction de $[RX]$, on obtient dans le cas d'un processus simple une droite qui permet de déterminer avec plus ou moins de précision, les paramètres n , le nombre de sites de fixation et K_a , la constante de association ou K_d , la constante d'association vaut $1/K_a$.

Dés que le processus n'est plus simple, on obtient une courbe et non plus une droite.

Nous venons d'envisager un processus simple mais la fixation d'un ligand sur une macromolécule peut se réaliser suivant la somme de 2 ou plusieurs phénomènes.

Dans le cas d'un double processus, le graphique de Scatchard se présente sous la forme d'une courbe qui sera la somme de 2 droites ayant chacune leurs caractéristiques propres. On détermine facilement les K_a en appliquant la méthode des résiduels.



On trace une droite à travers les points qui correspondent au phénomène de faible affinité (région 1). Le produit de la concentration en protéine par n_1 (nombre de sites de fixation de faible affinité) est obtenu à l'intersection avec l'axe des abscisses et la pente de la droite nous donne la constante ka_1 . Pour caractériser le phénomène de forte affinité (région 2), on soustrait pour chaque point de la courbe ce qui correspond au phénomène lent. Il en résulte une deuxième droite dont l'intersection avec l'axe des ordonnées indique le $Ka_2.n_2.2P$ et la pente Ka_2 .

RESULTATS

Protocole

Nous utilisons dans un premier type d'expériences des lysosomes entiers. Dans ce cas ces granules sont purifiés par free flow electrophoresis. La purification est de l'ordre de 45 sur base de l'activité spécifique relative (ASR) de la cathepsine c; dans un deuxième type d'expérience nous utiliserons des membranes de lysosomes isolées après un traitement hypotonique de ces granules purifiés au préalable sur gradient de métrizamide. La purification des lysosomes dans ce cas sur base de l'ASR de la cathepsine c est en moyenne de 60.

Les lysosomes ou les membranes de lysosomes sont incubés durant 10 min en présence de Naftazone marquée au carbone 14 dans les limites de concentration qui sont détaillées plus loin. Ce laps de temps écoulé, le tout est placé à 0°C afin d'arrêter ou tout du moins ralentir les réactions. L'ensemble est ensuite centrifugé durant 1 h 30 à 30 000 rpm (Beckman) à 0°C . Une partie du surnageant est prélevé et mis à compter ainsi que le culot.

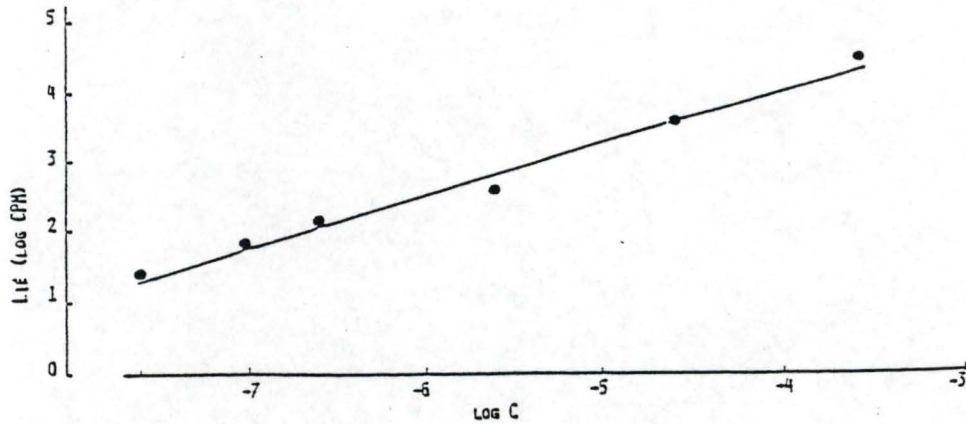


Fig 26 : Fixation de la Naftazone sur les lysosomes entiers.

Les résultats sont obtenus en incubant , pendant 10 minutes et à une température de 25°C , des lysosomes entiers purifiés par "free flow electrophoresis" en présence de C 14-Naftazone Après centrifugation de l'ensemble 1h30 à 30 000 rpm à 0°C , le surnageant est prélevé et mis à compter ainsi que le culot. En ordonnée , se trouve le logarithme des valeurs de radioactivité des culots ; en abscisse , le logarithme de la concentration en Naftazone.

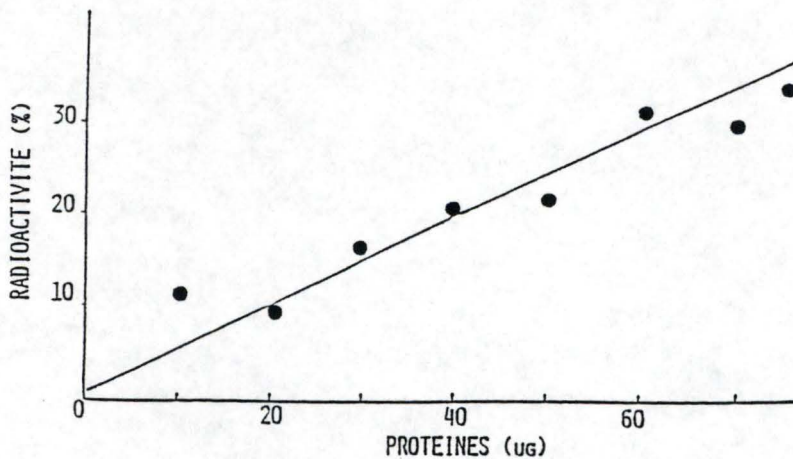


Fig 27 : Fixation de la Naftazone sur les membranes purifiées de lysosomes.

Les résultats sont obtenus en maintenant constante la concentration en Naftazone ($2,5 \cdot 10^{-5}$ M) , tout en faisant varier la quantité de membranes lysosomales. Cette expérience a été réalisée dans les mêmes conditions de départ que celles appliquées pour la réalisation de la figure 26 , à savoir , une incubation de 10 minutes à une température de 25°C en présence de C 14-Naftazone.

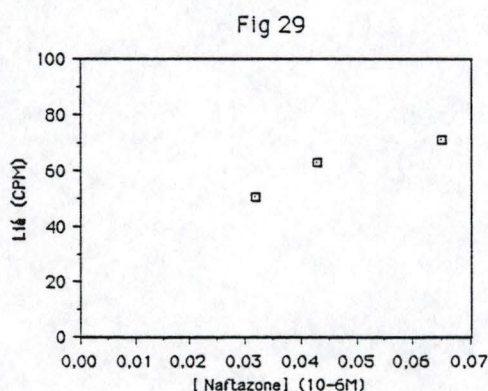
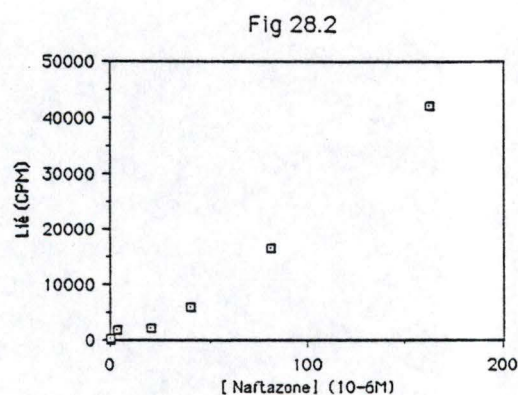
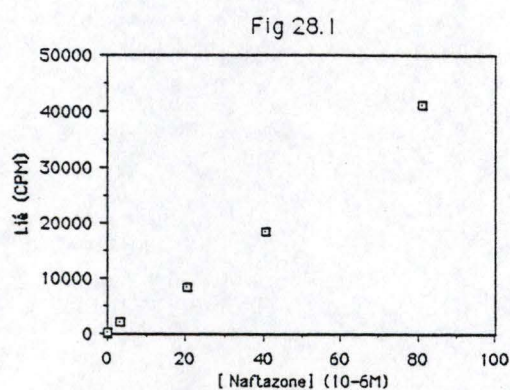


Fig 28 et 29: Fixation de la Naftazone sur les membranes purifiées de lysosomes.

Les résultats sont obtenus en maintenant constante la concentration de membranes lysosomales, tout en faisant varier la concentration de C 14-Naftazone de $3,2 \cdot 10^{-8}$ M à $3,2 \cdot 10^{-4}$ M. Cette expérience a été réalisée dans les mêmes conditions de départ que celles appliquées pour la réalisation de la figure 26, à savoir, une incubation de 10 minutes à une température de 25°C

A la figure 28-1, la quantité en protéines de membranes lysosomales est de 0,211 mg/test

A la figure 28-2, la quantité en protéines de membranes lysosomales est de 0,1095 mg/test.

A la figure 29, sont repris les 3 premiers points de la figure 28-2 qui rendent compte de la fixation de la Naftazone pour les faibles concentrations en Naftazone dans le milieu.

Des contrôles sont effectués en mesurant la radioactivité fixée dans des conditions en tout point identiques excepté qu'il sont dépourvus de membranes lysosomales.

Fixation de la Naftazone sur les lysosomes entiers

La fig 26 montre une relation linéaire entre la quantité de Naftazone liée et la quantité de lysosomes entiers. Il est à remarquer que des lysosomes sont vu l'ASR de la catpesine c certainement contaminés par des mitochondries ce qui expliquerait partiellement la relation linéaire observée. En effet, les résultats obtenus après injection de Naftazone suggèrent une fixation spécifique sur les mitochondries.

Fixation de la Naftazone sur les membranes purifiées de lysosomes

Dans l'expérience décrite à la fig 27, la concentration en Naftazone a été maintenue constante ($2,5 \cdot 10^{-5}$ M) tandis que la quantité de membrane variait. Le graphique montre que la quantité fixée de Naftazone en fonction de la quantité de membrane est linéairement proportionnelle.

La figure 28 illustre les résultats obtenus à concentration fixe de membranes de lysosomes et à concentration de C^{14} -Naftazone variable. Pour la fig 1A la quantité en protéines de membrane lysosomale est de 0,1095 mg/test; pour la fig 28-1 de 0,211 mg/test.

On remarque sur ces graphiques présentant la radioactivité du culot en ordonnée (en CPM et corrigée pour la radioactivité mesurée en absence de membranes) et la concentration en Naftazone en abscisse, qu'il y a bel et bien fixation de la Naftazone. Cependant la relation est linéaire et ne semble donc pas être une courbe de saturation.

Cependant la fig 29 reprend les premiers points de la fig 28 qui rendent compte de la fixation de la Naftazone pour les faibles concentrations en Naftazone dans le milieu. Les points évoquent malgré leur nombre trop restreint un phénomène de saturation.

Nature de la fixation de la Naftazone

Nous avons ensuite tenté de déceler une éventuelle fixation spécifique de la Naftazone.

Les résultats de ces expériences sont, en réalité, des fig 27 et 28 qui ont été traités de manière à établir un graphique de Scatchard qui permet de déterminer avec plus de précision certains paramètres du processus de fixation.

Pour ce faire, tout en maintenant constante la quantité de membrane nous avons fait varier la concentration en Naftazone d'une valeur de $3,2 \cdot 10^{-8}$ à $3,2 \cdot 10^{-4}$ M.

Fig 30- Graphique de Scatchard (0,1095mg P/test)

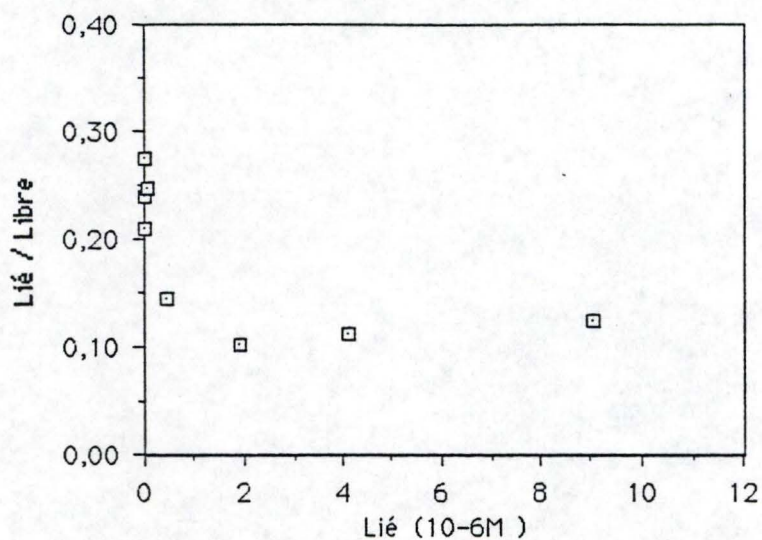


Fig 31- Graphique de Scatchard (0,211 mg P/test)

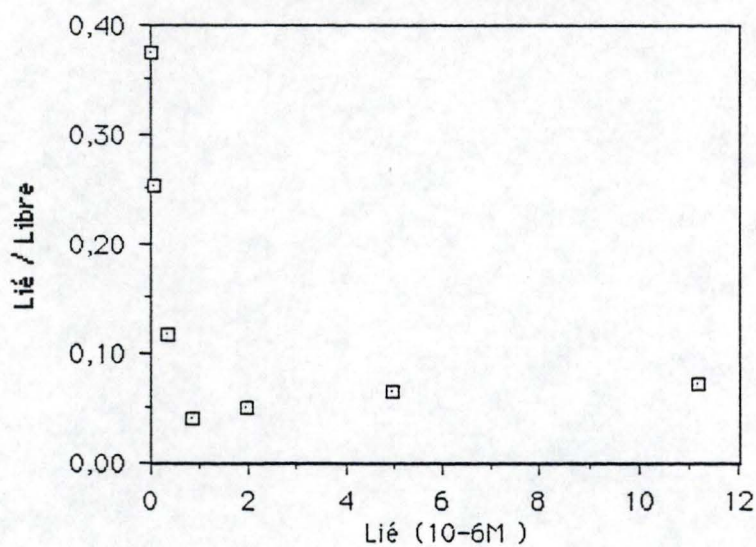


Fig 30 et 31 : Nature de la fixation de la Naftazone.

Sont présentés ici les résultats des figures 28-1 et 28-2 traités de manière à en établir un graphique de Scatchard.

Les conditions détaillées de l'expérience sont les suivantes. Nous avons centrifugé des membranes qui avaient été incubées durant 10 min avec la Naftazone radioactive en concentration variable (de $3,2 \cdot 10^{-8}$ à $3,2 \cdot 10^{-4}$ M). Ensuite nous avons prélevé une partie du surnageant mais non l'entiéreté pour maintenir l'équilibre de la fixation grâce à la Naftazone incluse dans le petit volume de surnageant restant en présence du culot. Enfin, surnageant et culot ont été comptés. Les résultats de radioactivité ainsi obtenus ont été traités de la manière suivante : des valeurs du culots des membranes lysosomales ont été retranchées la radioactivité du petit volume inclus (que nous avons estimé) ainsi que la radioactivité des contrôles (contrôles qui ont été effectués en mesurant la radioactivité fixée sur des tubes en tout point identiques exceptés qu'ils étaient dépourvus de membranes lysosomales).

Nous obtenons ainsi la quantité de Naftazone liée aux membranes et cela exprimé en cpm. Par traitement de ces valeurs de radioactivité, nous pouvons obtenir leur correspondance en nombre de moles fixées de Naftazone. Connaissant le total de cpm qui a été ajouté (culot + surnageant), il est possible de connaître la radioactivité résiduelle dans le surnageant, à savoir la Naftazone non liée (libre) en soustrayant les valeurs en cpm du culot.

Le rapport lié/libre est calculé en nombre de moles de Naftazone. Le tout est ensuite porté en graphique de manière à permettre une analyse de Scatchard (voir introduction). L'aspect des graphiques ainsi obtenus est probablement curviligne (voir figs 30-31). Théoriquement, ceci peut s'interpréter de deux façons :

- soit par l'existence de deux populations de site de fixation;
- soit par l'existence d'une population subissant lors de la fixation, une transition allostérique.

Si l'on se place dans l'optique de la première hypothèse à savoir celle de 2 populations de points de fixation différentes, on devrait constater pour autant que la liaison soit spécifique, l'existence d'un système caractérisé par une constante de faible affinité et de haute capacité et d'un système d'affinité élevée et de basse capacité.

Pour calculer ces constantes d'affinité et ces capacités de liaison, il convient de retrancher les valeurs de la droite des sites de faible affinité des valeurs de celle des sites de haute affinité avant de pouvoir estimer de manière valable la droite et par conséquent l'intersection avec l'abscisse pour le site de haute affinité

Ces constantes d'affinité ont été calculées de la manière précédemment décrite. Toutefois, nous ne donnerons qu'un ordre de grandeur de ces valeurs car des problèmes d'ordre techniques et théoriques ne confèrent pas à nos résultats la précision requise.

En ce qui concerne les problèmes "théoriques", citons d'abord le fait que nous obtenons pas de courbe de saturation avec un nombre de points suffisants en portant en

graphique la quantité de Naftazone fixée exprimée en cpm (en ordonnée) contre la concentration en Naftazone présente dans le milieu (en abscisse). (voir fig 29).

Deuxièmement, le nombre de mesures est largement insuffisant. Ce fait ne nous a pas permis de réaliser les calculs concernant la deuxième hypothèse à savoir celle de la coopération négative, c'est -à-dire le problème de la transition allostérique. C'est pourquoi ne seront exposés ici que les données traitées dans l'optique de la première hypothèse.

Troisièmement, nous ne pouvons pas être sûr que la molécule de Nafazone radioactive conserve les mêmes caractéristiques que la molécule non marquée. Il se pourrait très bien que la Naftazone marquée ait une affinité différente de la Naftazone non marquée.

Passons maintenant aux problèmes d'ordre technique.

Premièrement, la Naftazone est un composé insoluble dans l'eau, c'est pourquoi nous l'avons dissout dans du DMSO. Or pour réaliser une étude de "binding" dans les règles de l'art, il convient, pour visualier la part du spécifique, d'essayer de délocaliser le ligand radioactif fixé en utilisant une concentration 100 fois supérieure à celle du même composé non marqué. Nous avons essayé de réaliser cette expérience mais nous avons été confronté au problème d'une concentration en DMSO qui devenait trop élevée vu la faible solubilité de la Naftazone dans l'eau. Or on ne connaît pas avec exactitude l'effet du solvant sur les membranes.

Deuxièmement, nous avons aussi essayé la technique de filtration qui normalement convient parfaitement à ce genre d'études. Toutefois des problèmes d'étanchéité et de contamination nous ont contraint à l'abandonner.

Troisièmement, en travaillant avec des membranes de lysosomes purifiés, nous sommes toujours limités par le nombre de points réalisables.

Quatrièmement, nous sommes limité dans les dilutions (la plus grande est de l'ordre de 10000) car la Naftazone marquée ne possède pas une radioactivité spécifique suffisamment élevée.

In fine, l'allure globalement curviligne des deux graphiques laissent supposer l'existence de 2 populations de site de fixation. Les estimations faites à propos des constantes de dissociation donnent des valeurs approximatives de l'ordre de :

- 10^{-3} à 10^{-4} pour la constante de faible affinité (non-spécifique).
- 10^{-6} à 10^{-7} pour la constante de haute affinité (spécifique).

Ces résultats sont bien entendu uniquement une piste ouverte et en aucun cas n'autorisent l'affirmation que les deux populations existent.

CONCLUSIONS

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la maladie veineuse. Nous avons vu que cette maladie est caractérisée par un tissu veineux et périveineux de médiocre qualité qui confère aux vaisseaux une baisse du tonus, une vulnérabilité extrême ce qui empêche l'unité microcirculatoire d'assurer une bonne circulation de retour.

Dans ce contexte, l'hypoxie survient, résultat de la stase veineuse, et influence l'état de la paroi des veines au niveau des cellules endothéliales, des fibres musculaires lisses et du tissu conjonctif (fibroblastes). Ces cellules souffrent et cette souffrance a des répercussions au niveau subcellulaire, notamment au niveau des lysosomes. Ceux-ci libèrent de façon accrue leurs hydrolases, conséquence d'une altération de leur membrane : on constate alors une augmentation très nette de différentes enzymes dans le tissu veineux variqueux ainsi que dans le plasma et les urines des patients atteints de la maladie veineuse.

Or, il a été mis en évidence, chez des sujets variqueux, que la Naftazone réduit l'activité enzymatique du plasma de plus ou moins 50 %, ce qui indique clairement que l'activité enzymatique lysosomale est diminuée sous l'influence de la Naftazone.

Cette conjoncture : augmentation des activités des enzymes lysosomales dans la maladie et effet bénéfique de la Naftazone veineuse nous a incité à investiguer le mécanisme d'action de ce composé.

Dans un premier temps, nous avons étudié *in vivo*, la distribution intracellulaire de la C-14 Naftazone dans le foie de rat à la fois par centrifugation différentielle et par centrifugation isopycnique.

La distribution de la radioactivité obtenue par centrifugation différentielle après injection d'une faible dose de C-14 Naftazone révèle qu'aux temps 1 et 10 min, la C-14 Naftazone se localise préférentiellement dans les fractions N et P à savoir deux fractions contenant des fragments de la membrane plasmique en quantité importante. Au temps 30 min, la distribution est légèrement différente et ferait penser à un "transfert" de la Naftazone de la membrane plasmique vers les lysosomes. Si on augmente fortement la quantité de Naftazone, il est malaisé d'identifier le profil de distribution de la radioactivité à l'un ou l'autre profil de distribution des enzymes de référence.

In vivo, la distribution en centrifugation isopycnique nous apprend que la C-14 Naftazone à forte dose semble se lier préférentiellement à la membrane plasmique et aux mitochondries et non plus aux lysosomes ni au réticulum endoplasmique.

Les cibles intracellulaires de la Naftazone semblent donc dépendre de la dose injectée :

- membrane plasmique et lysosomes à faible dose;
- membrane plasmique et mitochondries à forte dose.

Toutefois, *in vitro*, lorsqu'on incube une fraction mitochondriale totale contenant 70 % des lysosomes du foie, en présence de C-¹⁴ Naftazone, l'analyse des gradients après centrifugation isopycniqne montre que la Naftazone se fixe sur les lysosomes en quantité appréciable.

Nous voyons donc que l'inéquation de notre protocole expérimental est peut-être à l'origine des résultats "mitigés" obtenu *in vivo*. Le temps d'injection pour l'analyse en gradients isopycniqnes devrait sans doute être porté de 10 min à 30 min et la quantité de Naftazone radioactive injectée diminue. Par ailleurs, la présence de Naftazone non marquée est aussi à débattre.

Dans un deuxième temps, nous avons évalué l'effet protecteur de la Naftazone sur la membrane lysosomale soumise à un choc.

Les résultats de ces expériences montrent que la Naftazone contrecarre l'activation isotonique des lysosomes de foie de rat incubés en présence de glucose 0,25 M. Toutefois, elle reste sans effet contre le traumatisme subi par des lysosomes préincubés à pH 5 et à 37 °C ou contre le gonflement puis la rupture des lysosomes induits par un choc osmotique : en présence de saccharose hypotonique ou de NaCl isotonique.

On aurait pu imaginer que la Naftazone agissent en augmentant la résistance mécanique de la membrane lysosomale contre une poussée de pression interne; toutefois, son inefficacité à contrecarrer la débalance osmotique en présence de saccharose hypotonique et donc l'entrée d'eau contredit cette hypothèse. Une autre explication serait la protection par une inhibition de la pénétration de glucose à travers la membrane lysosomale. L'existence controversée d'un transporteur du glucose se voit donc posée. En effet, si la translocation du glucose et d'autres monosaccharides se réalise par une diffusion passive comme le proposent Bird *et al.* (1987), par contre Maguire *et al.* (1988) font intervenir un transporteur spécifique.

Quoiqu'il en soit, étant donné que :

- 1) *in vivo*, les résultats de l'injection de Naftazone à faible dose tendent à montrer que la Naftazone se fixe sur les lysosomes;
- 2) *in vitro*, la préincubation d'une fraction ML en présence de Naftazone confirme la fixation de celle-ci sur les lysosomes;
- 3) les expériences d'activation révèlent une inhibition par la Naftazone de l'entrée de glucose mais non pas d'eau;

Nous avons essayé par la technique du "binding" de mettre en évidence la nature de la liaison de la Naftazone sur la membrane lysosomale, afin de préciser l'existence éventuelle d'une protéine transporteur du glucose.

En raison des difficultés théoriques et pratiques rencontrées dans ce type d'expériences, une courbe de saturation n'a pu être clairement obtenue en raison du nombre de mesures trop peu élevés, du marquage spécifique trop faible de la C-¹⁴ Naftazone et de son insolubilité dans des solutions aqueuses.

Cependant, nos résultats préliminaires nous font penser en l'existence de deux types de liaisons "spécifique" de forte affinité et faible capacité possédant une constante de dissociation approximée à 10⁻⁶ ou 10⁻⁷ M et "non spécifique" de faible affinité mais de forte capacité avec une constante de dissociation de l'ordre de 10⁻⁴ à 10⁻³ M. Ces résultats seront à confirmer en utilisant de la C-¹⁴ Naftazone possédant une activité spécifique plus élevée.

Nous pensons que la masse lipidique de la membrane pourrait être ces sites de faible affinité et qu'une protéine hypothétique représenterait ceux de forte affinité. Cette protéine pourrait être en réalité constitutive d'un transporteur du glucose. En effet, des esters de l'acide benzoïque, possédant des structures moléculaires similaires à celle de la Naftazone inhibent aussi le transport du glucose dans la membrane d'érythrocytes. Ils agiraient principalement en raison de leur caractère hydrophobe en augmentant la fluidité globale de la membrane, ce qui enchasserait davantage le transporteur du glucose au sein de la membrane masquant ainsi son site de liaison au glucose.

Finalement on peut se demander quelle relation il est possible d'établir entre ce qui vient d'être présenté et la maladie veineuse?

Nous avons vu que la Naftazone se fixe sur les lysosomes et qu'il pourrait y avoir plusieurs sites de fixation différents. L'un de ces sites pourrait ou non être le transporteur de glucose; nous observons d'autre part une fixation globale de la Naftazone sur la membrane lysosomale. Cette insertion dans la masse lipidique pourrait alors modifier la perméabilité de la membrane à un éventail de substances de faible poids moléculaire (dont le glucose).

Dans le cas de la maladie veineuse, la dynamique des échanges est compromise voire inversée au niveau de la cellule. Il se produit un blocage de l'élimination des déchets métaboliques, conséquence de la stase veineuse. Par ailleurs, si la membrane plasmique est altérée, notamment en raison de l'hypoxie (voir introduction), des substances de faible poids moléculaire peuvent entrer dans le cytoplasme cellulaire et delà traverser la membrane lysosomale par diffusion passive ou facilitée pour s'accumuler dans les lysosomes et les faire éclater par un appel d'eau.

On voit qu'un mécanisme possible de protection de la Naftazone serait de stabiliser la membrane des lysosomes afin d'éviter leur rupture d'où son application thérapeutique dans le cas de la maladie veineuse.

BIBLIOGRAPHIE

BEAUFAY, H., JACQUES, P., BAUDHUIN, P., SELLINGER, O.Z., BERTHET, J. ET DE DUVE (1964)

Tissue fractionation studies, 18. Resolution of mitochondrial fractions from rat liver into three distinct populations of cytoplasmic particles by means of density equilibration in various gradients.

Biochem. J. **92**, 184-205.

BEAUFOUR (1989)

Maladie veineuse. Maladie de tous les tissus "Ginkor®fort"

Laboratoires Beaufour S.A. Dreux.

BIRD S.J., FORSTER S., LLOYD J.B. (1987)

Translocation of sugars into rat liver lysosomes. Evidence against a common carrier for D-glucose and D-ribose.

Biochem. J. **245**, 929-931.

BITTMAN, R AND BLAU, L. (1972)

The phospholipid-cholesterol interaction. Kinetics of water permeability in liposomes.

Biochem. **11**, 4831.

BOGGS, J.M., YOONG, T. ET HSIA, J.C. (1976)

Site and mechanism of anesthetic action. 1. Effect of anesthetics and pressure on fluidity of spin-labeled lipid vesicles.

Mol. Pharmacol. **12**, 127-135.

BOUVIER, C-A., ENGELS, E., GROBETY, J., NIEBES, P. (1978)

Aspects métaboliques de la maladie variqueuse. Etude structurale, histochimique et chimique. *Médecine et Hygiène* **36**, 1141-1150.

BOWERS, W.E., FLINKENSTAEDT, J.T. ET DE DUVE, C. (1967)

Lysosomes in lymphoid tissue. The measurement of hydrolytic activities in whole homogenates.

J. Cell Biol. **32**, 325-337.

- DE DUVE, C, PRESSMAN, B.C, GIANNETTO, R.AND APPELMANS, F. (1955)
Tissue fractionation studies.6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue.
Biochem. J. **60**,604-617.
- DE DUVE, C.ET WATTIAUX, R. (1966)
Functions of lysosomes
Ann. Rev. Physiol. **28**, 435-492.
- DELWAIDE, P.A., DEROUAUX, G., HEUSGHEM, C. (1974)
Données sur la pharmacocinétique de la Naftazone-3H.
Arch. Int. Pharmacodyn. **208**, 357-361.
- DOCHERTY, K., BRECHLEY, G.V., HALES, C.N. (1979)
The permeability of rat liver lysosomes to sugars. Evidence for carrier-mediated facilitated diffusion.
Biochem. J. **3**, 361-366.
- DOSSIN E. (1986)
Rapport d'activités - Laboratoire de Physiologie spéciale (Professeur C.de Schrijver)
Facultés Universitaires ND de la Paix Namur.
- GERMAUT, G., GILSON, M. (1963)
Arch. Int. Pharmacodyn. **146**, 517.
- HANNIG,K., HEIDRICH, H.-G. (1974)
Methods Enzymol. **31**, 746-761.
- JADOT, M., COMANT, C., WATTIAUX-DE CONINCK, S., ET WATTIAUX, R.
(1984)
Intralysosomal hydrolysis of glycyl-L-phenylalanine 2 Naphtylamide.
Biochem. J. **219**, 965-970.
- LABORIT, H., BARON, C. (1971)
Effets de la monosemicarbazone de la β -naphtoquinone dans le choc hémorragique expérimental *Agressologie* **12**, 25-31.

LACKO, L. WITTKE, B., LACKO, I. (1977)

Interaction of local anesthetics with the transport system of glucose in human erythrocytes. *J. Cell. Physiol.* **92**, 257.

LACKO, L., WITTKE, B., AND ZIMMER, G. (1981)

Interactions of benzoic acid derivatives with the transport system of glucose in human erythrocytes.

Biochem. Pharmacol. **30**, 1425.

LEVITZKI, A. (1985)

Receptors, Endocytosis edited by Willingham, M.C., Pastan, I.H. Plenum Press- New York and London.

MEGO, J.L. (1979)

The ATP-dependant proton pump in lysosome membrane. Still a valid hypothesis.

FEBS, **107**, 113-116.

NAGATSU, T., HINO, M., FUYAMADA, H., HAYAKAWA, T., SAKABARA, S., NAKAGAWA, Y. ET TAKEMOTO, T. (1976)

New chromogenic substrates for X-Prolyl Dipetidyl-aminopeptidase.

Anal. Biochem. **74**, 466-476.

NIEBES, P. (1983)

Structure biochimique de la paroi veineuse chez les porteurs de varices.

Phlébologie, **36** (1), 55-56.

NIEBES, P. (1987)

Physiopathologie de la veine variqueuse.

Act. Int. Angiologie

NIEBES, P. ET LASZT, L. (1971)

Recherches sur l'activité des enzymes dans le métabolisme des mucopolysaccharides de veines saphènes humaines saines et variqueuses.

Angiologica. **8**, 7.

- PISONI, R.L., FLICKINGER, K.S., THOENE, J.G., CHRISTENSEN, H.N. (1987)
Characterization of carrier-mediated transport systems for small neutral amino acids in human fibroblast lysosomes.
J. Biol. Chem. **262**, 6010-6017.
- REIJNGOUD, D.J. ET TAGER J.M. (1973)
Measurement of intralysosomal pH. *Biochem. Biophys. Acta* **297**, 174-478.
- ROBERT, L. (1975)
Le tissu conjonctif et la médecine moderne.
Concours Méd. 25.1.1975. p3.
- TRUMP, B.F. AND ARSTILA, A.V. (1975)
Cellular reaction to injury in "Principles of Pathobiology" (La Via M.F. et Hill, R.B., J.R. eds) New York, Oxford University Press.
- VAES, G. (1966)
Subcellular localization of glycosidases in lysosomes.
Methods Enzymol. **8**, 509-514.
- WATTIAUX, R., WATTIAUX-DE-CONINCK, S (1969)
Nucleoside diphosphatase activity in plasma membrane of rat liver.
Biochem. Biophys. Acta **183**, 118-128.
- WATTIAUX, R., WATTIAUX-DE-CONINCK, S., RONVEAUX-DUPAL, M.F., DUBOIS, F. (1978)
Isolation of rat liver lysosomes by isopycnic centrifugation in a metrizamide gradient.
J. Cell. Biol. **78**, 349-368.
- WHEATER, P.R., BURKITT, H.G. , DANIELS, V.G. (1979)
Histologie fonctionnelle (Manuel et Atlas) MEDSI, Médecine et sciences internationales.
- WINAND, R.(1977)
La mono-semicarbazone-2 de la β -naphtoquinone (DCI Naftazone) dans la maladie variqueuse. *Revue Médicale de Liège*, **32**, 429-431.

ZWILLENBERG, L-O., LASZT, L. ET ZWILLENBERG, H. (1971)

Die Feinstruktur der Venenwand bei Varikose

Angiologica, **8**, 318.