



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Étude biochimique de la veine cave inférieure de rat

Delbecque, Frédéric

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.

**Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
Faculté des Sciences**

rue de Bruxelles, 61 B-5000 Namur

Tél. 081/22.90.61 Téléc 59222 facnam-b Téléfax 081/23.03.91

ETUDE BIOCHIMIQUE DE LA VEINE CAVE INFÉRIEURE DE RAT.

DELBECQUE Frédéric

Résumé.

La maladie veineuse est caractérisée, au niveau histologique, par une altération du tissu conjonctif de la média. Cette altération entraîne une perte d'élasticité du vaisseau. On pense que les lysosomes des cellules endothéliales interviendraient dans cette altération du tissu conjonctif par la libération d'hydrolases.

Étant donné le peu d'informations disponibles à propos des lysosomes des parois veineuses, nous avons débuté une étude biochimique centrée sur ces organites mais élargie aux autres organites subcellulaires, à partir de veines caves inférieures de rats et de chiens. Nous avons ainsi tenté de mettre au point le dosage de certaines enzymes de référence de ces organites ainsi que la technique d'homogénéisation la plus adéquate pour préserver leur intégrité. Nous avons ensuite effectué des fractionnements subcellulaires sur des veines caves inférieures de rats. Finalement, nous avons essayé de mettre en évidence l'existence d'une latence lysosomale.

Nous avons montré que les cinétiques enzymatiques pour les enzymes retenues étaient linéaires en général mais que l'écart-type signalant une différence d'activité spécifique pouvait être élevée pour certaines enzymes. Nous avons également montré que l'homogénéisation au Kontes loose était la plus adéquate pour préserver l'intégrité des organites subcellulaires. Ce type d'homogénéiseur peut être repris pour effectuer des fractionnements subcellulaires. Finalement, nous avons montré l'existence d'une latence lysosomale et la possibilité de supprimer cette latence par l'attaque des radicaux libres.

Abstract.

The venous disease is characterized by a deterioration of the connective tissue of the media. This deterioration causes a loss of elasticity of the vessel. It is thought that lysosomes of the endothelial cells could be responsible for this deterioration by the release of hydrolases.

We have done a biochemical study focused on the lysosomes but extended to the other subcellular organelles, by using inferior vena cavæ of rats and dogs. We have tried to establish methods of measure of reference enzymes of these organelles and the most appropriate method of homogenization in sight of preserving their integrity. We also have made subcellular fractionation of rat's inferior vena cavæ. Finally, we have tried to show the existence of a lysosomal latency.

We have shown that enzymatic kinetics for the studied enzymes are generally linear but the standard deviation which indicates a difference of specific activity can be important for some enzymes. We also have shown that homogenization by Kontes (loose) device is the best to preserve the integrity of the subcellular organelles. This homogenizer can be used to obtain subcellular fractionation. Finally, we have shown the existence of lysosomal latency and the suppress of this latency by the attack of free radicals.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques.

Septembre 1989

Laboratoire de Chimie Physiologique

Promoteur : Prof. S. Wattiaux-De Coninck

Qu'il me soit permis tout d'abord de remercier le Professeur R. Wattiaux de m'avoir accueilli dans son département.

Il me faut également remercier le Professeur S. Wattiaux-De Coninck qui, grâce à sa compétence et à son dynamisme, a su m'aider à mener ce travail à bien. Qu'elle veuille bien accepter mes plus vifs remerciements pour ses conseils, ses encouragements et ses critiques constructives.

Je remercie également le Professeur J. Lammerant et son équipe pour l'aide précieuse qu'ils m'ont apporté lors de la réalisation de ce travail.

Du fond du cœur, je voudrais exprimer ma gratitude à monsieur F. Dubois qui a su me guider, non sans humour parfois, à travers les dédales de la biochimie.

Je m'en voudrais d'oublier ici Isabelle Hamer. Pour sa disponibilité de tous les instants, sa bonne humeur et ses conseils lors de la rédaction de ce mémoire, je lui dis un grand MERCI.

Merci à vous aussi, Béné, Pascale et Vincent, pour votre présence et votre soutien. Merci également à toutes les personnes du laboratoire qui, d'une manière ou d'une autre, ont permis la réalisation de ce mémoire.

Enfin, je voudrais remercier mes parents, qui m'ont permis de vivre cette expérience universitaire.

J'ai certainement omis de citer de nombreuses personnes. Parmi elles se retrouvent tous ceux et toutes celles qui, au cours de ces quatre années passées ensemble, ont su faire durer les bons moments et m'aider à surmonter les moins bons. Qu'elles sachent que je ne les oublierai jamais.

TABLE DES MATIERES.

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.	p. 1
I. La maladie veineuse.	p. 1
A. Anatomie et histologie veineuse.	p. 1
1. Anatomie veineuse.	p. 1
2. Histologie veineuse.	p. 2
a) Structure de la paroi veineuse.	p. 2
b) Les cellules endothéliales.	p. 2
c) Les cellules musculaires lisses.	p. 3
B. Structure du tissu conjonctif.	p. 4
1. Structure du matériel extracellulaire.	p. 4
a) La substance fondamentale.	p. 4
b) Les fibres protéiques.	p. 4
*) Les fibres de collagène.	p. 5
*) Les fibres élastiques.	p. 5
*) Les fibres réticuliniques.	p. 6
c) Le fluide tissulaire.	p. 6
2. Cellules du tissu conjonctif.	p. 6
a) Les fibroblastes.	p. 6
b) Les macrophages.	p. 7
c) Les mastocytes.	p. 7
d) Les plasmocytes.	p. 8
e) Les adipocytes.	p. 8
C. Rappels de la physiologie veineuse.	p. 8

D. Pathologie veineuse.	p. 9
1. Définition.	p. 9
2. Facteurs favorisants.	p. 10
a) L'hérédité.	p. 10
b) La surcharge pondérale.	p. 10
c) Autres facteurs de risque.	p. 10
3. Mécanismes conduisant à l'insuffisance veineuse.	p. 11
a) Etudes histologiques et histochimiques.	p. 11
b) Etudes biochimiques.	p. 11
4. Conséquences des perturbations histochimiques au niveau de la paroi veineuse.	p. 13
a) Répercussions au niveau hémodynamique.	p. 13
b) Répercussions au niveau tissulaire.	p. 13
5. Evolution de la maladie veineuse.	p. 14
a) Les complications veineuses.	p. 14
b) Les complications tissulaires.	p. 14
6. Traitement de la maladie veineuse.	p. 15
a) Mesures d'hygiène générales.	p. 15
b) Contention des varices.	p. 15
c) Traitement médical.	p. 15
d) Traitement chirurgical.	p. 15
II. Les lysosomes.	p. 16
A. Découverte.	p. 16
B. Fonctions des lysosomes.	p. 17
1. Fonction hétérophagique.	p. 17
2. Fonction autophagique.	p. 17

C. Types de lysosomes.	p. 18
1. <i>Les lysosomes primaires.</i>	p. 18
2. <i>Les lysosomes secondaires.</i>	p. 18
D. La membrane lysosomale.	p. 18
1. <i>Rappel : constitution des membranes biologiques.</i>	p. 18
2. <i>Structure de la membrane lysosomale.</i>	p. 20
a) Morphologie.	p. 20
b) Composition lipidique et protéique.	p. 20
c) Protection de la structure membranaire contre l'action des hydrolases.	p. 20
d) Stabilité de la membrane lysosomale.	p. 21
3. <i>Action des radicaux libres sur la latence enzymatique.</i>	p. 21
III. Buts du travail.	p. 24
CHAPITRE 2 : TECHNIQUES EXPERIMENTALES.	p. 25
I. Prélèvement de la veine cave inférieure de rat pour dosages enzymatiques.	p. 25
II. Prélèvement de la veine cave inférieure de chien pour dosages enzymatiques.	p. 25
III. Méthodes générales des dosages enzymatiques.	p. 26
IV. Techniques de fractionnement de veine cave inférieure de rat.	p. 26
V. Effets des radicaux libres sur la membrane lysosomale.	p. 28

CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSIONS.	p. 30
I. Etudes des enzymes de la veine cave inférieure.	p. 30
A. Cinétique enzymatique.	p. 30
1. Introduction.	p. 30
2. Cinétique des enzymes marqueurs déterminées sur la veine cave inférieure de rat.	p. 33
a) Les protéines.	p. 33
b) La β -galactosidase.	p. 33
c) La cathepsine C.	p. 33
d) La cytochrome oxydase.	p. 34
e) La dipeptidylpeptidase IV.	p. 34
f) La phosphodiesterase alcaline.	p. 34
g) La catalase.	p. 35
h) La glucose-6-phosphatase.	p. 35
i) La NADPH cytochrome C réductase.	p. 35
3. Cinétique des enzymes marqueurs déterminées sur la veine cave inférieure de chien.	p. 36
a) Les protéines.	p. 36
b) La cathepsine C	p. 36
c) La leucine naphthylamidase.	p. 36
d) L' α -mannosidase.	p. 37
e) La dipeptidylpeptidase IV.	p. 37
4. Conclusions.	p. 37
B. Activités et activités spécifiques des enzymes de la veine cave inférieure de rat.	p. 38
1. Introduction.	p. 38
2. Résultats et discussion.	p. 38
a) Les protéines.	p. 39
b) La β -galactosidase.	p. 39
c) La cathepsine C.	p. 39
d) La cytochrome oxydase.	p. 40
e) La dipeptidylpeptidase IV.	p. 40

f) La phosphodiesterase alcaline.	p. 41
g) La catalase.	p. 41
h) La glucose-6-phosphatase.	p. 42
i) La NADPH cytochrome C réductase.	p. 42
3. Conclusions.	p. 42
II. Homogénéisation et fractionnement subcellulaire de veines caves inférieures de rat.	p. 44
A. Homogénéisation.	p. 44
1. Introduction.	p. 44
a) Définition.	p. 44
b) Milieux d'homogénéisation.	p. 44
c) Les homogénéiseurs.	p. 44
2. Résultats et discussion.	p. 46
a) Homogénéisation au Potter.	p. 46
b) Homogénéisation au Dounce.	p. 46
c) Homogénéisation au Kontes.	p. 48
d) Homogénéisation après incubation à la collagénase.	p. 48
3. Conclusions.	p. 49
B. Fractionnement subcellulaire de veines caves inférieures de rat.	p. 49
1. Introduction.	p. 49
2. Résultats et discussion.	p. 50
a) La cytochrome oxydase.	p. 50
b) La cathepsine C.	p. 51
c) L' α -mannosidase.	p. 52
d) La catalase.	p. 53
e) La NADPH cytochrome C réductase.	p. 53
3. Conclusions.	p. 54

III . Action des radicaux libres sur la latence des enzymes lysosomales.	p. 56
A. Introduction.	p. 56
B. Résultats et discussion.	p. 56
C. Conclusions.	p. 57
CONCLUSIONS GENERALES.	p. 58
ANNEXE.	p. 61
BIBLIOGRAPHIE.	p. 62

CHAPITRE 1 : LA MALADIE VEINEUSE.

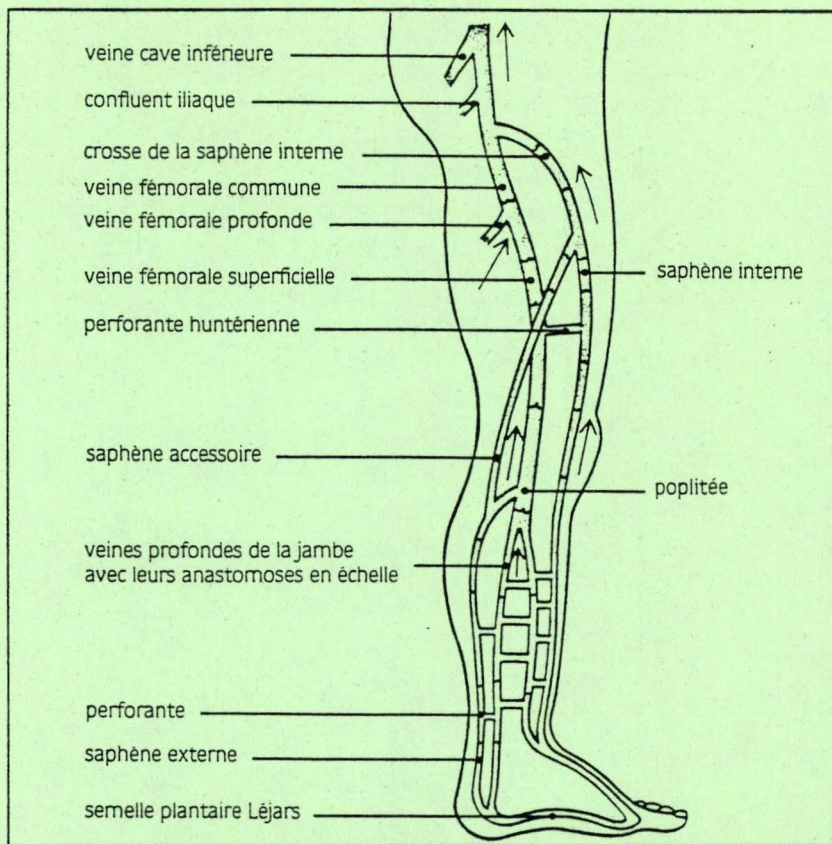


Figure 1. Réseau veineux de la jambe et de la cuisse (d'après Beaufour, 1989).

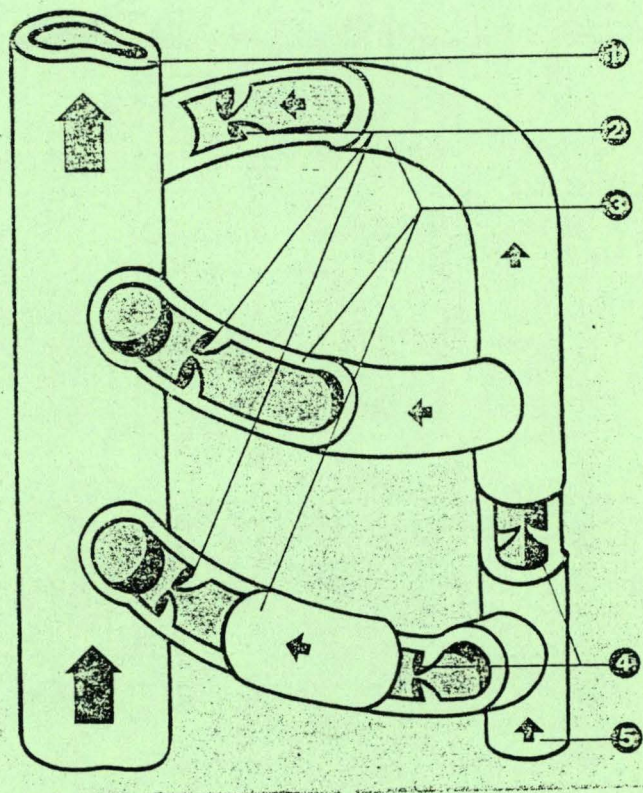


Figure 2. La veine perforante. 1. Veine profonde. 2. Valvules ostiales siégeant à la confluence de deux veines. 3. Veines perforantes. 4. Valvules pariétales siégeant le long des trajets veineux. 5. Veine superficielle (d'après Beaufour, 1989).

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.

I. LA MALADIE VEINEUSE.

A l'opposé de la pathologie artérielle, considérée comme l'un des fléaux de la civilisation moderne, la maladie veineuse a longtemps été considérée comme mineure, de par son évolution plus insidieuse et ses nuisances plus discrètes. Force nous est de revoir aujourd'hui cette affirmation. En effet, les données physiopathologiques les plus récentes et les résultats d'enquête pour en apprécier l'incidence individuelle et sociale nous montrent l'étendue du problème.

A. ANATOMIE ET HISTOLOGIE VEINEUSE.

Pour comprendre les signes cliniques des varices, il est nécessaire de rappeler les principaux éléments de l'anatomie et de l'histologie veineuse.

1. Anatomie veineuse.

La circulation veineuse dans les membres inférieurs est assurée par deux réseaux : le réseau veineux profond et le réseau veineux superficiel (Fig. 1). Le système veineux profond draine les neuf dixièmes du sang veineux des membres inférieurs et comprend, à hauteur de la jambe, les veines tibiales antérieures et postérieures, ainsi que les veines péronières, et, à hauteur de la cuisse, les veines fémorales profondes et communes ainsi que la veine poplitée.

Le réseau veineux superficiel draine un dixième du sang veineux des membres inférieurs et comprend la veine saphène interne et la veine saphène externe.

Les deux réseaux superficiels et profonds sont anastomosés l'un à l'autre par le système veineux perforant. Les veines de ce système perforant sont dotées de deux ou trois valvules imposant une circulation sanguine à sens unique allant de la superficie à la profondeur (Fig. 2).

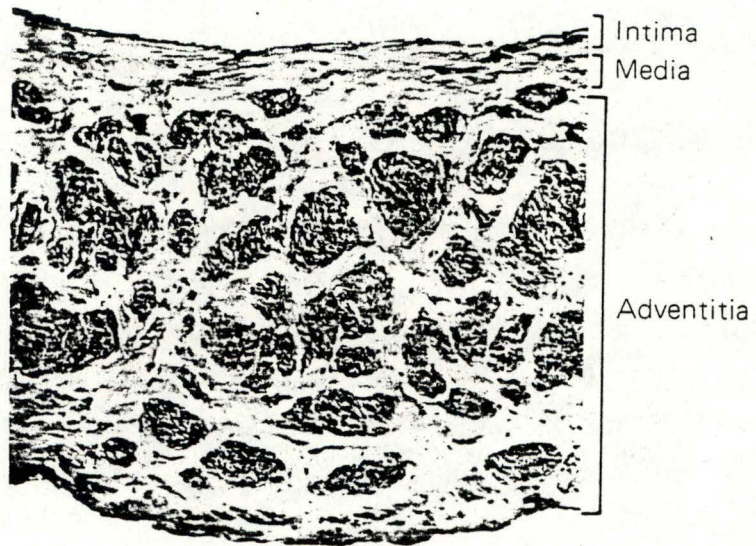


Figure 3. Micrographie représentant une section de veine large. Notez l'adventice bien développée avec des faisceaux longitudinaux de muscles lisses (d'après Junqueira *et al.*, 1986).

2. Histologie veineuse.

a) structure de la paroi veineuse.

La paroi veineuse est formée de trois tuniques (Fig. 3) :

-l'intima, qui est constituée d'une couche mince de cellules aplaties (les cellules endothéliales) et dont les replis constituent les valvules. Ces valvules ont pour but de s'opposer à un reflux sanguin à contre-courant.

-la média, qui est constituée :

-de fibres musculaires lisses regroupées en faisceaux longitudinaux orientés de façon concentrique,

-de tissu conjonctif contenant des fibres de collagène et d'élastine. C'est une altération de ce tissu conjonctif qui entraîne les complications variqueuses [Niebes, 1977].

-l'adventice, qui est formée d'un tissu conjonctif lâche permettant une adaptation permanente de la veine au débit sanguin par variation de calibre.

b) les cellules endothéliales.

L'endothélium vasculaire occupe une position unique entre le sang circulant et les tissus extravasculaires. On pensait auparavant que la contribution fonctionnelle de l'endothélium à l'homéostasie se limitait à assurer une barrière structurelle, habituellement avec l'aide des cellules musculaires lisses des vaisseaux [Cotran, 1982]. Plus récemment, on a montré que l'endothélium vasculaire comportait un répertoire étendu de propriétés structurelles et fonctionnelles, conséquence de sa localisation anatomique et de sa position le long de l'arbre vasculaire [Moyer *et al.*, 1988]. En général, les cellules endothéliales sont polygonales et ont une taille approximative de $10 * 30 \mu\text{m}$ quand elles sont vues de face. Elles sont allongées dans la direction du flux sanguin. Un complexe de Golgi est présent aux pôles nucléaires. Des mitochondries et ribosomes libres sont visibles ainsi que des citernes du réticulum endoplasmique rugueux. Dans la région périnucléaire se trouvent des filaments intermédiaires d'un diamètre de 9 à 11 nm. On pense que la présence abondante de microfilaments dans le cytoplasme des cellules endothéliales est à relier à une possible capacité contractile de celles-ci. On pense également que la libération des hydrolases contenues dans les lysosomes des cellules

endothéliales serait une des causes de l'altération du tissu conjonctif visible lors de la maladie veineuse.

c) Les cellules musculaires lisses.

La couche de cellules musculaires lisses présente dans la média est composée de cellules allongées non striées. Chacune de ces cellules est limitée par une membrane basale et un réseau de fibres réticuliniques [collagène type III]. Ces deux derniers composants constituent l'endomysium.

Les cellules musculaires lisses sont fusiformes. Elles ont une longueur comprise entre 30 et 200 μm . Chaque cellule a un noyau unique localisé centralement. Concentrés aux pôles des noyaux, on trouve des mitochondries, des ribosomes libres, des citernes du réticulum endoplasmique rugueux et un complexe de Golgi.

Ces fibres musculaires lisses sont innervées par les systèmes sympathique et parasympathique du système nerveux autonome. Leur degré d'innervation dépend de leur taille et de leur fonction. Il faut remarquer qu'on ne retrouve pas de jonctions neuromusculaires élaborées telles que celles présentes au niveau du muscle squelettique. En fait, les terminaisons nerveuses se font sous forme de dilatation au niveau du tissu conjonctif de l'endomysium. Les dilatations contiennent les neuromédiateurs nécessaires à la transmission de l'information.

L'activité contractile des muscles lisses est liée à la structure et à l'organisation de filaments d'actine et de myosine, qui ne présentent pas l'organisation paracristalline des muscles striés. Dans les cellules musculaires lisses, les faisceaux de myofilaments s'enchevêtrent obliquement à travers la cellule, formant un réseau en treillis. Les faisceaux sont formés de filaments minces de 5 à 7 nm contenant l'actine et la tropomyosine, et des filaments épais de 12 à 16 nm formés de myosine. L'organisation moléculaire des filaments de myosine permet un plus grand chevauchement de l'actine et, parallèlement, un plus grand degré de contraction.

Des études structurelles et biochimiques ont révélé que l'actine et la myosine des muscles lisses se contractent par un mécanisme de glissement des filaments semblable à celui qui se produit au niveau des muscles striés.

B. STRUCTURE DU TISSU CONJONCTIF. [Junqueira *et al.*, 1986]

Les tissus conjonctifs ont pour but de maintenir la forme du corps. Leur matrice sert à connecter et à relier les cellules et les organes, en donnant ainsi un support au corps. Mais ils interviennent également dans le stockage, la défense et la réparation. Le tissu conjonctif est constitué du matériel extracellulaire, dans lequel sont inclus les cellules du tissu conjonctif.

1. Structure du matériel extracellulaire.

Le milieu extracellulaire est formée d'une substance fondamentale, de fibres protéiques et d'un fluide tissulaire.

a) La substance fondamentale.

Elle a pour but de remplir les espaces entre les cellules et les fibres du tissu conjonctif. Mais elle est aussi une barrière à la pénétration des tissus par des particules étrangères. Elle est formée principalement par les glycosaminoglycans et des protéines structurelles.

Les glycosaminoglycans sont des polysaccharides linéaires formés par la répétition caractéristique d'unités disaccharidiques composées habituellement d'un acide uronique et d'une hexosamine. Cette dernière peut être la glucosamine ou la galactosamine. L'acide uronique peut être l'acide glucuronique ou iduronique. A l'exception de l'acide hyaluronique, ces chaînes linéaires sont reliées de manière covalente à un "core" de protéines pour former une molécule de protéoglycan.

Les glycoprotéines structurelles sont des composés contenant une protéine à laquelle sont attachés des hydrates de carbone. Ces molécules ne contiennent pas de polysaccharides linéaires. Les hydrates de carbone des glycoprotéines sont fréquemment des structures branchées.

b) Les fibres protéiques.

Elles regroupent les fibres de collagène, les fibres élastiques et les fibres réticuliniques.

Tableau 1. Principales caractéristiques des différents types de collagène (d'après Junqueira *et al.*, 1986).

Collagen Type	Molecular Formula	Tissue Distribution	Optical Microscopy	Ultrastructure	Site of Synthesis	Interaction With Glycosaminoglycans	Function
I	$[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$	Dermis, bone, tendon, dentin, fascias, sclera, organ capsules, fibrous cartilage.	Closely packed, thick, nonargyrophilic, strongly birefringent yellow or red fibers. Collagen fibers.	Densely packed, thick fibrils with marked variation in diameter.	Fibroblast, osteoblast, odontoblast, chondroblast.	Low level of interaction, mainly with dermatan sulfate.	Resistance to tension.
II	$[\alpha 1(II)]_3$	Hyaline and elastic cartilages.	Loose, collagenous network visible only with picro-Sirius stain and polarization microscopy.	No fibers; very thin fibrils embedded in abundant ground substance.	Chondroblast.	High level of interaction, mainly with chondroitin sulfates.	Resistance to intermittent pressure.
III	$[\alpha 1(III)]_3$	Smooth muscle, endoneurium, arteries, uterus, liver, spleen, kidney, lung.	Loose network of thin, argyrophilic, weakly birefringent greenish fibers. Reticular fibers.	Loosely packed thin fibrils with more uniform diameters.	Smooth muscle, fibroblast, reticular cells, Schwann cells, hepatocyte.	Intermediate level of interaction, mainly with heparan sulfate.	Structural maintenance in expandible organs.
IV	$[\text{pro}\alpha 1(IV)]_2\text{pro}\alpha 2(IV)$	Epithelial and endothelial basal laminae and basement membranes.	Thin, amorphous, weakly birefringent membrane.	Neither fibers nor fibrils are detected.	Endothelial and epithelial cells, muscle cells, and Schwann cells.	Interacts with heparan sulfate.	Support and filtration.
V	$[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$	Placental basement membranes.	Insufficient data.	Insufficient data.	Insufficient data.	Insufficient data.	Insufficient data.

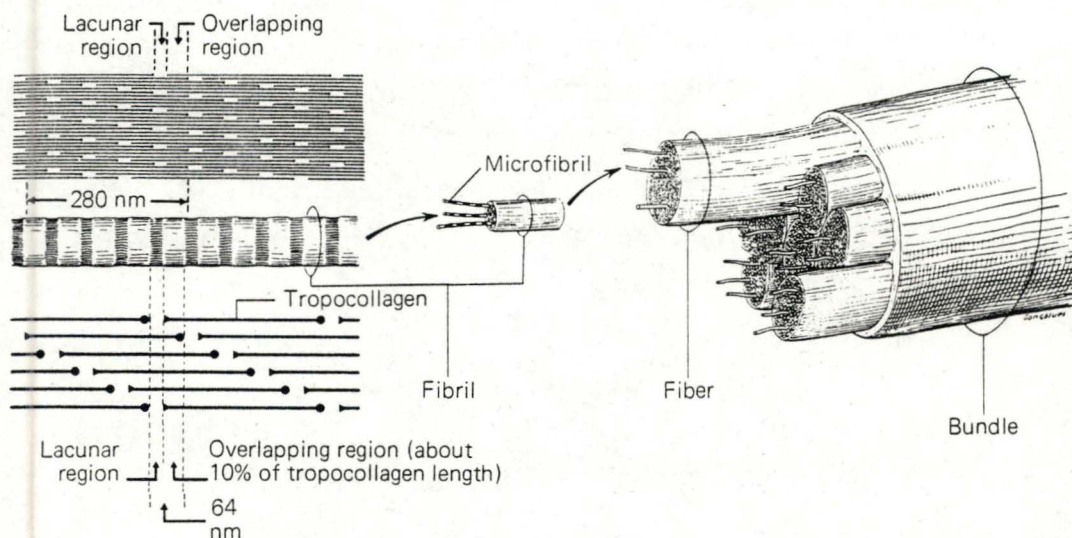


Figure 4. Dans la forme la plus abondante de collagène (le collagène de type I), chaque molécule de tropocollagène est composée de deux chaînes peptidiques $\alpha 1$ et d'une chaîne peptidique $\alpha 2$, chacune d'elles ayant un poids moléculaire approximatif de 100 000. Ces chaînes sont enlacées en une hélice droite et sont maintenues ensemble par des ponts hydrogènes et des interactions hydrophobes. Chaque tour complet de l'hélice a une longueur de 8.6 nm. La longueur totale d'une molécule de tropocollagène est de 280 nm et son diamètre est de 1.5 nm (d'après Junqueira *et al.*, 1986).

*) Les fibres de collagène.

Les collagènes sont une famille de protéines produites par plusieurs types de cellules. Chaque type de collagène est caractérisé par sa composition chimique, sa distribution dans les tissus et ses fonctions. (Tableau 1).

Les collagènes sont constitués principalement de glycine (33,5%), de proline (12%) et d'hydroxyproline (10%). Cette dernière ainsi que l'hydroxylysine sont caractéristiques des fibrilles de collagène.

L'unité protéique qui polymérise pour former les microfibrilles de collagène est appelée le tropocollagène (Fig. 4). Celui-ci est constitué de trois chaînes polypeptidiques enroulées en triple hélice. Les différences au niveau de la structure chimique de ces polypeptides sont responsables des différents types de collagène. Les molécules de tropocollagène s'associent en microfibrilles en produisant des régions lacunaires et des régions de chevauchement visibles au microscope électronique.

Les microfibrilles de collagène s'associent en fibrilles, puis en fibres et, finalement, en faisceaux (Fig. 5).

Le collagène contenu dans les veines peut être de deux types : au niveau de l'adventice, on ne retrouve que le collagène de type I, alors que dans la média, le collagène est principalement de type III. Ces deux types de collagène ont pour but de résister à la tension qui s'exerce sur les parois veineuses.

*) Les fibres élastiques.

Elles nous apparaissent au microscope électronique comme étant formées de deux constituants : une région centrale amorphe contenant de l'élastine, entourée par une gaine de microfibrilles tubulaires. Les microfibrilles sont composées d'une glycoprotéine structurale. L'élastine est une protéine ressemblant au collagène de par sa richesse en glycine et en proline. Elle en diffère cependant de par l'absence d'hydroxylysine, la faible quantité d'hydroxyproline (un ou deux résidus pour cent), et de par la présence de deux ensembles assez particuliers, la desmosine et l'isodesmosine, formés par des liaisons covalentes entre quatre lysines.

Le rôle de ces deux ensembles est de réaliser la jonction entre 4 chaînes polypeptidiques (P₁, P₂, P₃, P₄) de l'élastine (Fig. 6).

La présence de ces fibres élastiques dans les vaisseaux sanguins contribue à l'efficacité de la circulation sanguine.

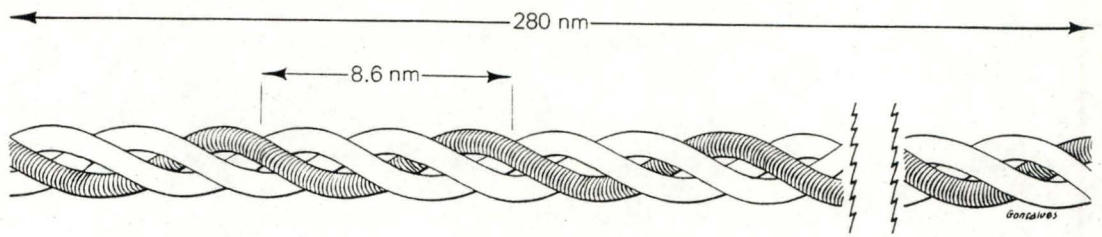


Figure 5. Représentation schématique de fibrilles, de fibres et de faisceaux de collagène. En microscopie électronique, les fibrilles présentent une périodicité de bandes claires et de bandes sombres. Cette périodicité de 64 nm est expliquée par le chevauchement de sous-unités de tropocollagènes (d'après Junqueira *et al.*, 1986).

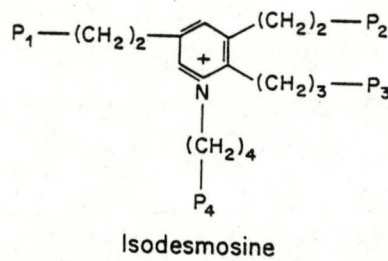
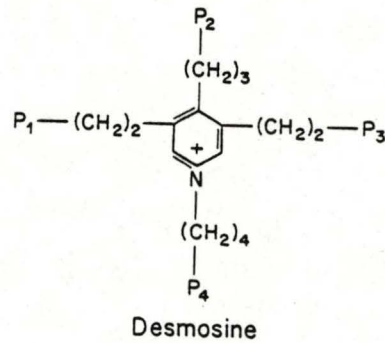


Figure 6. Structure des liens dans l'élastine. P=chaîne polypeptidique (d'après Matthews, 1975).

Tableau 2. Fonctions des cellules du tissu conjonctif (d'après Junqueira *et al.*, 1986).

Cell Type	Main Product or Activity	Main Function
Fibroblast, chondroblast, osteoblast, odontoblast	Fibers and ground substance production	Structural
Plasma cell, lymphocyte, eosinophilic leukocyte	Production of antibodies (humoral immunity) and of immunocompetent cells (cell-mediated immunity), phagocytosis of antigen-antibody complex	Immunologic
Macrophages, neutrophilic leukocyte	Phagocytosis of foreign substances, phagocytosis of bacteria	Defense
Mast cells, basophilic leukocyte	Liberation of pharmacologically active substances (eg, histamine)	Release of pharmacologically active substances
Adipose cell	Storage of neutral fats, heat production	Energy reservoir

*) Les fibres réticuliniques.

Elles sont extrêmement fines, avec un diamètre compris entre 0.5 et 2 micromètres. Ces hétéroprotéines sont constituées de 6 à 12% d'hexoses, contre 1% pour les fibres de collagène, et sont composées de collagène type III (alors que les fibres de collagène sont composées de collagène de type I), en association avec des glycoprotéines et des protéoglycans. Ces fibres réticuliniques sont formées par un empilage assez lâche de petits fibrilles d'un diamètre moyen de 45 nm, reliées entre eux par de nombreux ponts interfibrillaires probablement composés de protéoglycans et de glycoprotéines.

Leur petit diamètre et la disposition lâche des fibres créent un réseau flexible dans les organes sujets à des variations de forme ou de volume, tels que les artères ou les veines, l'utérus, etc... Elles permettent donc le maintien structurel des organes expansibles.

c) Le fluide tissulaire.

Présent en petite quantité, ce fluide a un contenu en ions et en substances diffusibles proche de celui du plasma.

2. Cellules du tissu conjonctif.

Nous nous contenterons d'en décrire ici les principaux types ainsi que les fonctions qui leurs sont rattachées (Tableau 2).

a) les fibroblastes.

Les fibroblastes sont les cellules les plus courantes dans le tissu conjonctif. On en distingue 2 types morphologiquement distincts et de nombreux types intermédiaires. Le fibroblaste jeune a un cytoplasme abondant et irrégulièrement ramifié. Son noyau est ovoïde, large et clair avec une fine chromatine et un nucléole proéminent. Son cytoplasme est riche en réticulum endoplasmique rugueux et le complexe de Golgi est bien développé.

Le fibroblaste mature, parfois appelé fibrocyte, est plus petit que le fibroblaste jeune et a moins de ramifications. Il a un noyau plus petit et plus sombre, allongé, avec un cytoplasme acidophile. Le réticulum endoplasmique rugueux et le complexe de Golgi sont moins développés.

Ces cellules ont pour fonction de synthétiser les fibres de collagène, les fibres élastiques et réticuliniques ainsi que les glycosaminoglycans et les glycoprotéines de la substance de fond.

b) Les macrophages.

Ils proviennent principalement de précurseurs originaires de la moelle osseuse qui se divisent en donnant les monocytes. Ces cellules circulent dans le sang puis dans un deuxième temps, migrent vers les tissus conjonctifs où elles arrivent à maturité et sont dès lors appelées macrophages.

Malgré leur large spectre de caractéristiques morphologiques, en rapport avec leur état fonctionnel et leur localisation tissulaire, les macrophages peuvent être caractérisés par une surface irrégulière avec des protubérances, des invaginations et des replis, signes de leur importante activité phagocytaire et pinocytaire. En général, ils ont un complexe de Golgi bien développé, de nombreux lysosomes et un réticulum endoplasmique rugueux important. Ils ont une taille comprise entre 10 et 30 μm et ont habituellement un noyau ovale ou réniforme excentrique. Lors de la transformation de monocytes en macrophages, on note une augmentation de la taille, de la synthèse protéique, du nombre de lysosomes, de microtubules et de microfilaments.

La fonction principale des macrophages est l'ingestion de particules et leur digestion par les lysosomes. De plus, ils participent à la défense immunitaire de l'organisme.

Lorsqu'ils sont stimulés, les macrophages modifient leur morphologie et leur métabolisme. Ils sont alors appelés macrophages activés et montrent une activité métabolique et lysosomale plus élevée.

c) Les mastocytes.

Les mastocytes sont des cellules de forme ovale ou arrondie, d'un diamètre de 20 à 30 μm , dont le cytoplasme est rempli de granules basophiles. Le noyau est relativement petit, sphérique et situé centralement. Le cytoplasme comprend quelques petites mitochondries sphériques, de courtes citernes de réticulum endoplasmique rugueux et un complexe de Golgi bien développé. La surface des mastocytes contient des récepteurs pour les IgE. Les granules basophiles contenus dans le cytoplasme des mastocytes ont un diamètre de 0.3 à 0.5 μm et sont limités

par une membrane. Ils renferment des médiateurs chimiques tels que l'héparine et l'histamine. La libération de ces médiateurs lors de la fixation d'antigène sur les IgE membranaires provoque les réactions allergiques connues sous le terme de réactions d'hypersensibilité immédiates car elles se développent dans les quelques minutes suivant la pénétration par un antigène d'un organisme préalablement sensibilisé à cet antigène ou à un antigène voisin.

d) Les plasmocytes.

Les plasmocytes sont des cellules larges, ovoïdes, avec un cytoplasme dont la basophilie est due à l'abondance de réticulum endoplasmique rugueux. Le complexe de Golgi et les centrioles occupent une région plus pâle. Le noyau est sphérique et excentrique. Il contient des zones compactes d'hétérochromatine en alternance avec des zones plus claires de même taille.

Les plasmocytes sont responsables de la synthèse des anticorps retrouvés dans le sang. Les anticorps sont des globulines produites par l'organisme en réponse à la pénétration d'antigènes.

e) Les adipocytes.

Les adipocytes sont des cellules du tissu conjonctif qui se sont spécialisées dans le stockage de graisses neutres ou la production de chaleur. Ce sont de volumineuses cellules arrondies, avec un noyau aplati situé en périphérie de la cellule. Seule une fine bandelette de cytoplasme est visible en périphérie, refoulée par une grosse goutte grasseuse. Les adipocytes se rencontrent soit isolés, soit groupés en lobules graisseux.

C. RAPPELS DE LA PHYSIOLOGIE VEINEUSE.

Le fait dominant dans la physiopathologie des varices est l'incontinence valvulaire des veines, permettant un reflux sanguin à contre-courant. En effet, dans les cas normaux, plusieurs mécanismes permettent un retour veineux normal de la périphérie vers le cœur :

- les valvules s'opposent au reflux du sang vers les extrémités;
 - la force résiduelle exercée par le ventricule gauche après passage du sang à travers les capillaires donne une impulsion à l'ondée sanguine;
 - la dépression systolique au niveau de l'oreillette et la dépression thoracique au cours de la respiration créent un vide aspiratif qui attire le sang veineux périphérique;
 - la contraction musculaire des fibres lisses chasse la sang;
 - l'écrasement de l'important réseau veineux de la plante des pieds (semelle de Lejars) au cours de la marche propulse vers le haut le sang des extrémités des membres inférieurs;
 - la contraction du mollet et l'alternance contraction-dilatation de l'artère la plus proche de la veine provoque dans celle-ci des mouvements qui, grâce à l'action des valvules, ont un effet propulsif.
- Il faut remarquer que ces mécanismes doivent agir de manière simultanée. En effet, chacun de ces mécanismes pris isolément est incapable d'assurer un retour veineux normal.

D. PATHOLOGIE VEINEUSE.

1. Définitions.

Les varices sont des altérations des veines superficielles qui entraînent leur dilatation permanente. Elles sont à distinguer de l'hypertrophie normale des veines que l'on peut observer chez les individus normaux. Suivant la localisation des valvules déficientes qui les provoquent, on peut distinguer deux types de varices :

- les varices primaires ou essentielles, sont dues à une incompétence ou à une incapacité des valves aux jonctions saphéno-fémorales ou saphéno-popliétales, ou moins fréquemment, à une incompétence valvulaire dans une des veines perforantes.
- les varices secondaires sont à associer à des incompétences valvulaires du système veineux profond [Perdue Jr, 1985].

2. Facteurs favorisants.

La cause profonde des varices est encore inconnue à l'heure actuelle. On a pu malgré tout montrer l'importance de certains facteurs dans la survenue de la maladie veineuse.

a) L'hérédité.

B. Haardt cite les taux suivants :

- chez des individus dont les parents ne présentent pas de signes cliniques de varices, on observe une atteinte dans plus ou moins 27% des cas.
- chez des sujets dont un des parents est porteur de varices, le taux passe à environ 40% des cas.
- chez des sujets dont les deux parents sont porteurs de varices, la fréquence de ces dernières atteint jusqu'à 86% des cas. [Niermann, 1970, cité par Haardt, 1982].

On n'a pas encore pu déterminer s'il s'agissait d'un type d'hérédité dominante ou récessive mais on s'accorde à dire que le facteur hérédité est plus marqué en ce qui concerne le sexe féminin.

b) La surcharge pondérale.

Dans le cas de l'obésité, il importe de tenir compte des conséquences hémodynamiques. En effet, l'accroissement du volume sanguin de l'obèse peut atteindre 40%. Compte tenu de la tendance simultanée à la rétention d'eau, le retour veineux insatisfaisant détermine une insuffisance veineuse.

c) Autres facteurs de risque.

- la station debout ou assise prolongée.
- la grossesse.
- l'âge.
- les contraceptifs oraux.
- la chaleur excessive.
- l'alimentation (alcool, épices).
- certains sports (tennis et jogging sur terrain dur, équitation, ski).

3. Mécanismes conduisant à l'insuffisance veineuse.

Les connaissances physiopathologiques, histologiques et biochimiques concernant la maladie veineuse ont considérablement évolué ces deux dernières décennies, permettant une approche plus précise des troubles qui seraient à l'origine des varices.

a) Etudes histologiques et histochimiques.

En 1963 déjà, Svejcar avait montré une diminution du collagène normal et une augmentation du contenu en élastine et en hexosamine dans les veines variqueuses. Zwillenberg *et al.* [1971] constatèrent en microscopie électronique une dégradation du tissu conjonctif et plus spécialement une atteinte des fibres de collagène. Parfois également, on observe des dépôts adipeux [Leu, 1971].

Ces premiers résultats ont été confirmés et renforcés par ceux obtenus par Grobéty et Bouvier en 1977. Au cours d'une étude histochimique, ces auteurs montrent un accroissement anormal du tissu conjonctif interstitiel, provoquant un épaissement de l'intima et de la média de la paroi veineuse.

De plus, il apparaît que ce tissu conjonctif anormal s'accumule d'abord autour des cellules musculaires lisses.

En plus de l'accumulation de collagène anormal, Grobéty et Bouvier ont constaté une fragmentation et une désorganisation partielle des fibres d'élastine.

b) Etudes biochimiques.

Parallèlement à ces études histologiques et histochimiques se sont développés des travaux essayant de mettre en évidence l'influence d'une activité enzymatique anormalement élevée sur l'apparition de ces désordres tissulaires. Déjà en 1971, Niebes avait montré une augmentation des taux sériques de certains produits de dégradations des glycosaminoglycans dans le cas de patients variqueux. Cet auteur a également montré une augmentation de l'activité de trois enzymes lysosomales (la β -glucuronidase, la β N-acétyl glucosaminidase et l'arylsulfatase) dans le sérum de tels patients [Niebes, 1972]. Par la suite, une augmentation des taux sériques de la β N-acétyl glucosaminidase et de la β -glucuronidase a été confirmée [Thulésius *et al.*, 1974 et 1977].

Tableau 3. Quantité de collagène, glycosaminoglycans, acide hexuronique, hexosamines et sucres neutres pour des veines saphènes saines et variqueuses. Entre parenthèses se trouve le nombre de veines étudiées (d'après Niebes, 1977).

% of dry weight of vein	Healthy veins	Varicose veins	t-Test
Collagen, insoluble	53.3 ± 9.9 (5)	32.5 ± 9.5 (9)	- 64%, p < 0.005
Chondroitin sulphate	0.46 ± 0.11 (7)	0.56 ± 0.22 (12)	+ 23%, N.S.
Dermatan sulphate	0.18 ± 0.09	0.20 ± 0.06	+ 9%, N.S.
Heparan sulphate	0.41 ± 0.10	0.48 ± 0.15	+ 18%, N.S.
Hyaluronic acid	0.21 ± 0.12	0.37 ± 0.12	+ 76%, p < 0.005
Total GAG	1.26 ± 0.34	1.61 ± 0.36	+ 29%, p < 0.005
Hexuronic acids	0.38 ± 0.08 (7)	0.60 ± 0.11 (14)	+ 56%, p < 0.005
Glucosamine	0.09 ± 0.04 (7)	0.16 ± 0.08 (14)	+ 68%, p < 0.05
Galactosamine	0.19 ± 0.07	0.34 ± 0.10	+ 81%, p < 0.005
Total hexosamines	0.28 ± 0.09	0.50 ± 0.15	+ 80%, p < 0.005
Rhamnose	0.004 ± 0.002 (7)	0.007 ± 0.004 (14)	+ 75%, p < 0.05
Lyxose	0.004 ± 0.002	0.009 ± 0.008	+ 125%, p < 0.05
Fucose	0.009 ± 0.008	0.012 ± 0.018	+ 33%, N.S.
Ribose	0.007 ± 0.002	0.008 ± 0.010	+ 14%, N.S.
Xylose	0.019 ± 0.010	0.019 ± 0.019	N.S.
Mannose	0.039 ± 0.020	0.037 ± 0.023	N.S.
Galactose	0.131 ± 0.054	0.129 ± 0.043	N.S.
Glucose	0.064 ± 0.047	0.183 ± 0.127	+ 186%, p < 0.01
Total neutral sugars	0.272 ± 0.086	0.394 ± 0.169	+ 45%, p < 0.05

N.S. = not significant.

Tableau 4. Activités moyennes et déviations standards des enzymes lysosomiales dans les veines saphènes humaines saines et variqueuses (uM/min/g de DNA). Entre parenthèses se trouvent le nombre de veines étudiées (d'après Niebes, 1977).

Enzyme	Healthy veins	Varicose veins	t-Test
β -Glucuronidase	11.5 ± 2.6 (13)	16.1 ± 5.2 (25) (+ 40%)	p < 0.01
β -N-Acetylglucosaminidase	866 ± 254 (13)	1129 ± 269 (24) (+ 30%)	p < 0.01
Arylsulphatase	2.12 ± 0.78 (11)	2.54 ± 0.57 (8) (+ 19%)	p ≤ 0.05
Acid phosphatase	1.67 ± 1.09 (7)	4.65 ± 2.33 (24) (+ 178%)	p < 0.001
Hyaluronidase	0 (5)	0.47 ± 0.50 (9) (U/g fresh weight)	p ≤ 0.001

Par contre, on n'a pas constaté d'augmentation significative du taux sérique de la cathepsine D [Thulésius *et al.*, 1977]. Cela est dû au fait que cette enzyme protéolytique dangereuse pour l'organisme est neutralisée dans le sérum par des inhibiteurs de protéases tels que l' α 1-antitrypsine et l' α 2-macroglobuline.

Finalement, Niebes publiait une étude récapitulative [1977] montrant:

- une augmentation de l'activité des enzymes lysosomales et du contenu de nombreux polysaccharides et de leurs monosaccharides constitutifs au niveau des veines variqueuses (Tableaux 3 et 4);
- une augmentation des taux sériques d'enzymes lysosomales, de glycosaminoglycans et de sucres constituant les glycoprotéines (Tableau 5);
- une augmentation des hydroxylysines glycosides au niveau des urines de patients variqueux, signes d'une dégradation ou d'une biosynthèse anormale des fibres de collagène (Tableau 6).

Une étude biochimique menée de front avec une étude histochimique a permis de localiser et de caractériser les variations du profil enzymatique au niveau de la veine variqueuse [Haardt, 1982]. Il a ainsi pu être démontré qu'il se produisait une diminution de l'activité des enzymes intervenant dans le métabolisme énergétique au niveau de la paroi de la veine malade (Tableau 7). Cette baisse est plus marquée dans l'intima que dans la média, et s'est avérée particulièrement prononcée pour l'ATPase Ca^{2+} dépendante, typique de la myosine. Il en va de même mais dans une moindre mesure pour la phosphatase alcaline (dont la présence est associée aux zones de transport actif de la membrane cellulaire) et pour les isoenzymes de la lactico-déshydrogénase (enzyme terminale de la glycolyse). Cette diminution de l'activité des enzymes lié au métabolisme énergétique se traduit par une diminution de la capacité de contraction de la veine variqueuse.

Un comportement contraire a été observé pour les enzymes lysosomales (Tableau 7). Ici, l'accroissement de l'activité est plus marqué au niveau de la média que de l'intima, aussi bien pour la β -glucuronidase que pour la phosphatase acide ou pour les estérases non spécifiques. On peut considérer cet accroissement de l'activité enzymatique comme

Tableau 5. Activités moyennes et déviations standards d'enzymes MPS dans le sérum de sujets sains et variqueux (uM/min/L de sérum)(d'après Niebes, 1977).

Enzyme	Healthy subjects (26)	Varicose subjects (24)	t-Test Probability coefficient
β -Glucuronidase	0.92 \pm 0.25	1.55 \pm 0.71 (+ 70%)	t = 4.26 p < 0.001
β -N-Acetylgluco- aminidase	14.28 \pm 2.11	22.58 \pm 9.15 (+ 60%)	t = 4.47 p < 0.001
Arylsulphatase	0.035 \pm 0.008	0.069 \pm 0.038 (+ 100%)	t = 4.67 p < 0.001

Tableau 5' : Quantité de constituants de glycoprotéines (moyennes \pm déviations standards) dans le sérum de patients sains et variqueux (mg/100 ml). Entre parenthèses se trouve le nombre de veines étudiées(d'après Niebes, 1977).

constituent	Healthy subjects	Varicose subjects	t-Test Probability coefficient
sialic acid	46.3 \pm 4.2 (27)	51.8 \pm 3.5 (+13%) (25)	t = 5.09 p < 0.001
polysaccharides	98.2 \pm 5.8 (24)	110.8 \pm 7.5 (+13%) (25)	t = 6.48 p < 0.001
sulphates	5.05 \pm 0.49 (14)	6.03 \pm 1.06 (+19%) (11)	t = 3.03 p < 0.01
hexosamines	80.9 \pm 9.7 (26)	86.7 \pm 6.5 (+8%) (22)	t = 2.38 p < 0.02
hexoses	114.3 \pm 6.7 (25)	121.3 \pm 11.2 (+7%) (25)	t = 2.67 p < 0.02
fucose	16.0 \pm 2.4 (27)	17.7 \pm 2.4 (+12%) (25)	t = 2.43 p < 0.02

Tableau 6. Quantité d'hydroxylysine di- et monoglycosides (moyennes \pm déviations standards) dans l'urine de femmes saines et variqueuses (uM/g de créatinine)(d'après Niebes, 1977).

Glycoside	Healthy women (8)	Varicose women (8)	t-Test
Glucosylgalac- tosylhydroxylysine	20.5 \pm 6.2	38.3 \pm 7.7 (+87%)	p < 0.005
Galactosyl- hydroxylysine	11.9 \pm 4	20.3 \pm 3 (+71%)	p < 0.005
Glucosylgalactosyl- Hyl	1.55 \pm 0.33	1.88 \pm 0.4 (+18%)	not significant
Galactosyl-Hyl			

Tableau 7. Distribution de l'activité enzymatique au niveau de la paroi veineuse à dégénération variqueuse (d'après Haardt, 1982).

N° du patient		β -glucuronidase	Phosphatase acide	Estérases non-spécifiques	Lactico-déshydrogénase	Phosphatase alcaline	Acide adénosine-triphosphorique Ca ⁺⁺
1	Intima	-	+	+	-	-	-
	Média	++	+	++	+	-	+
2	Intima	-	+	+	-	-	-
	Média	+	+	++	+	-	+
3	Intima	-	-	+	-	-	+
	Média	+	++	++	+	-	++
4	Intima	+	++	+	-	-	-
	Média	+	++	+	+	-	+
5	Intima	++	++	++	-	-	-
	Média	++	++	+	++	-	+
6	Intima	+	++	+	-	-	+
	Média	+	++	+	++	-	++
7	Intima	++	++	++	-	-	-
	Média	+	++	++	++	-	++
8	Intima	+	+	+	-	-	+
	Média	+	++	+	+	-	++
Contrôle	Intima	-	+	+	++	++	+++
	Média	-	+	+	++	-	+++

+++ = activité très forte
 ++ = activité forte
 + = activité faible
 - = aucune activité

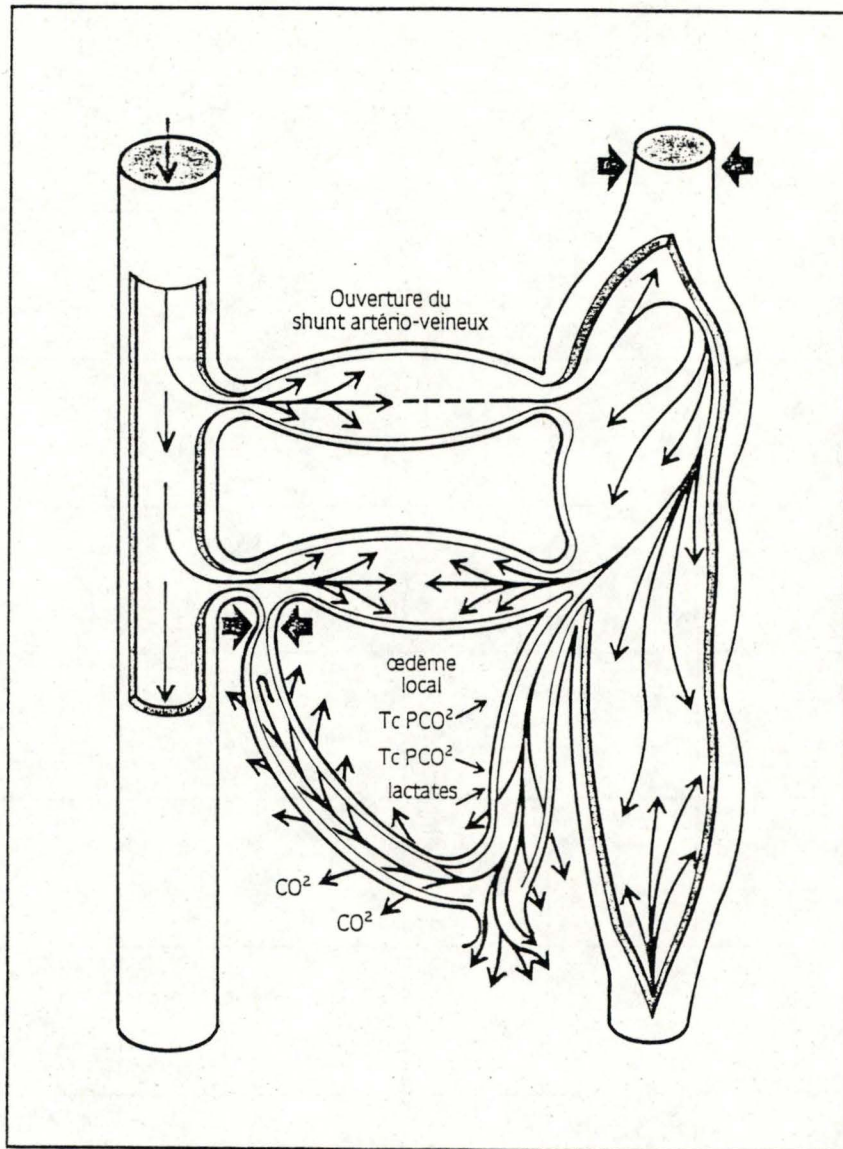


Figure 7. Mécanismes capillaires conduisant à la formation d'œdème (d'après Beaufour, 1989).

l'expression d'une lésion cellulaire accompagnée d'une altération de la membrane lysosomale.

C'est cette modification du profil enzymatique qui serait responsable des modifications histologiques au niveau de la paroi veineuse.

4. Conséquences des perturbations histochimiques au niveau de la paroi veineuse.

Dans un premier temps, on verra apparaître une hypotonie pariétale. En s'aggravant, celle-ci aura des répercussions au niveau hémodynamique et au niveau tissulaire.

a) Répercussions au niveau hémodynamique.

La stase veineuse consécutive à l'hypotonie pariétale va provoquer l'ouverture de canaux dérivatifs. Quand ce phénomène deviendra insuffisant, on assistera à une augmentation de la perméabilité capillaire, avec fuite plasmatique.

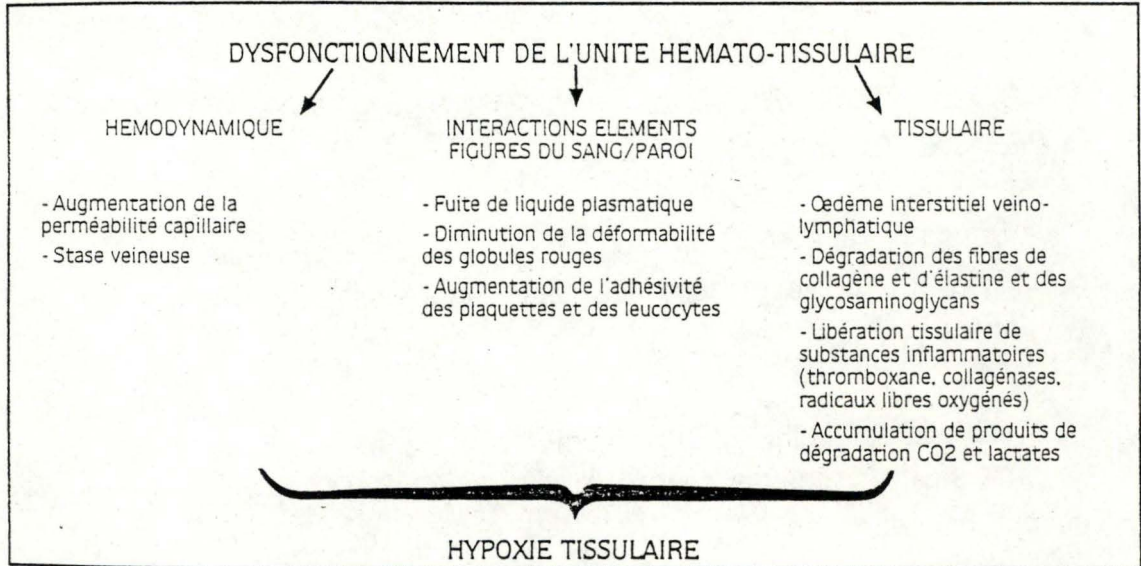
De plus, le ralentissement de l'écoulement sanguin va entraîner une augmentation de la viscosité sanguine. On note également une perte de la capacité d'écoulement des globules rouges et leur agrégation. L'acidose résultant de l'hypoxie locale majore cet état, ce qui ne fera qu'aggraver l'hypoxie.

b) Répercussions au niveau tissulaire.

Lorsque le phénomène compensatoire dû à l'ouverture des canaux dérivatifs est débordé, nous avons vu qu'il se produisait une augmentation de la perméabilité capillaire et une fuite plasmatique (Fig.7). L'œdème interstitiel veino-lymphatique qui en résulte est initialement réversible mais il évoluera vers la fibrose. Celle-ci sera entretenue et majorée par d'autres phénomènes :

- activation des polymorphonucléaires et des macrophages, avec libération de protéases qui sont à l'origine de la destruction du collagène, de l'élastine et des glycosaminoglycans;
- éclatement des mastocytes, avec libération d'histamine, de sérotonine et de bradykinine qui aggravent l'œdème;

Tableau 8. Tableau précisant les trois catégories de désordres qui, en cas de dysfonctionnement de l'unité hémato-tissulaire, intriquent leurs actions à l'origine de l'hypoxie tissulaire (d'après Beaufour, 1989).



- issu de l'activation de la cascade arachidonique consécutive aux altérations membranaires, le thromboxane, agrégant plaquettaire et facteur de spasme et d'œdème, accroît les désordres;
- altération du métabolisme tissulaire, accompagnée d'une perturbation de la dynamique des échanges veines-tissus : on constate une baisse de la consommation en O₂ et en glucose ainsi qu'une accumulation de CO₂ et de déchets métaboliques, dont le lactate. La pression tissulaire en O₂ diminue alors que la pression tissulaire en CO₂ augmente, ce qui produit une hypoxie sévère;
- conséquence des perturbations métaboliques : des radicaux libres apparaissent, notamment des radicaux superoxydes O₂⁻. Ces anions très réactionnels vont désorganiser de nombreuses structures cellulaires (dont les mitochondries), accentuer l'augmentation pathologique de la perméabilité capillaire, et s'attaquer aux phospholipides membranaires.

L'altération tissulaire entraîne par le biais de l'hypoxie une sclérose progressive des tissus périveineux. Les valvules perdent leur étanchéité et les varices apparaissent. La maladie va s'auto-entretenir par le maintien ou l'aggravation des conditions d'hypoxie tissulaire. Au tableau 8 sont résumés les désordres à l'origine de l'hypoxie tissulaire.

5. Evolution de la maladie veineuse. [Perdue Jr, 1985]

a) Les complications veineuses.

Les hémorragies externes spontanées sont rares mais elles peuvent survenir suite à un choc. Dans ce cas, l'hémorragie est brutale, indolore et s'arrête rapidement à la surélévation des membres inférieurs. De petites hémorragies souscutanées sont plus courantes.

Une phlébite superficielle peut apparaître sous la forme d'un cordon veineux dur et douloureux. L'extension au tronc veineux profond et la survenue d'une embolie pulmonaire sont à redouter.

b) Les complications tissulaires.

Des troubles cutanés peuvent se développer sous forme de dermatoses diverses : dermite, prurit, eczéma. Dans certains cas, l'œdème veino-lymphatique peut être à l'origine de troubles sous-cutanés.

Au stade ultime de la maladie peut apparaître l'ulcère variqueux, qui se localise au niveau de la partie supérieure interne de la cheville, et qui est caractérisé par sa tendance à la récurrence. Il a l'aspect d'une lésion arrondie ou ovale, entourée par une zone d'œdème dur.

6. Traitement de la maladie veineuse.

a) Mesures d'hygiène générale.

La station debout prolongée, les changements brusques de température, les excitants (café, alcool) sont déconseillés. Un exercice modéré à type de marche régulière et cadencée, des périodes de repos allongé avec membres supérieurs surélevés et un régime contre l'obésité sont par contre conseillés.

b) Contention des varices.

Des bandes élastiques apposées avant le lever favorisent le retour du sang veineux dans les veines profondes, s'opposent à la dilatation des varices et à la formation d'œdème.

c) Traitement médical.

Un traitement pharmacologique peut se faire sous différentes formes :

- utilisation de scavengers pour neutraliser les radicaux libres (ex : extrait de Ginkgo biloba);
- utilisation de toniques veineux (à base d'hamamélis, de marron d'Inde,...); les bases moléculaires en sont mal définies.
- traitement sclérosant, qui consiste à injecter dans la veine un produit sclérosant qui va entraîner une transformation fibreuse des parois veineuses. Celles-ci vont finir par s'accoler. Pour que ce traitement soit applicable, il faut que les veines profondes ne soient pas oblitérées, qu'il s'agisse des varices essentielles, que le sujet ne soit pas porteur d'une artérite oblitérante des membres inférieurs ou d'une hypertension artérielle grave.

d) Traitement chirurgical.

Il est indiqué en cas de varices importantes ou lorsque les méthodes sclérosantes n'ont pas donné de bons résultats. La méthode la plus

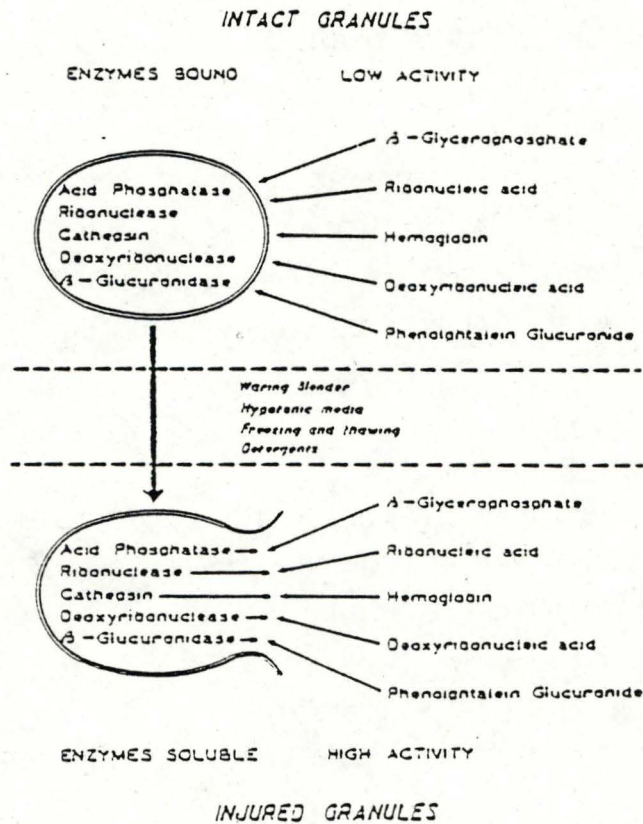


Figure 8. Modèle biochimique représentant les lysosomes de foie de rat décrits par de Duve *et al.* en 1955. On sait actuellement que les lysosomes contiennent au moins 50 hydrolases, qui peuvent agir sur les diverses macromolécules telles que les acides nucléiques, les protéines, les glycoprotéines, les polysaccharides et divers lipides (d'après Bainton, 1981).

employée est celle du "stripping", c'est-à-dire l'enlèvement de la veine impliquée et de ces principaux affluents dilatés [Lofgren et Lofgren, 1971]. Après le "stripping", les branches veineuses résiduelles sont oblitérées par une injection d'un agent sclérosant [Hobbs, 1978]. Les résultats du traitement chirurgical sont généralement satisfaisants, bien qu'une sclérothérapie soit parfois requise pour certains patients.

II. LES LYSOSOMES.

Nous avons vu plus haut que les lysosomes semblent être un des éléments de base intervenant dans la maladie veineuse. C'est pourquoi il nous a paru intéressant d'en rappeler ici les principales caractéristiques.

A. DECOUVERTE.

Les lysosomes ont été découverts de manière tout à fait fortuite en 1949, par C. de Duve et ses collaborateurs. En effet, lors d'études enzymatiques du métabolisme des carbohydrates dans des homogénats de foie, certaines irrégularités sont apparues dans les essais de la phosphatase acide. Ainsi, l'activité hydrolytique était plus élevée dans des extraits préparés avec de l'eau distillée qu'avec du sucrose osmotiquement équilibré. De même, l'activité était plus haute dans des préparations âgées que dans des préparations fraîches (Fig. 8).

Les résultats étaient suffisamment significatifs pour permettre à de Duve de proposer l'existence d'un nouveau groupe de particules ayant des propriétés lytiques, les lysosomes [de Duve *et al.*, 1955; de Duve, 1975].

de Duve et Wattiaux [1966] définissent le lysosome comme une vésicule contenant toute une série d'hydrolases acides, et limitée par une membrane empêchant les enzymes de s'échapper.

Actuellement, on connaît au moins 50 enzymes contenues dans les lysosomes [Holtzman, 1976]. Ce sont des protéases, des sulfatases, des lipases, des phospholipases, des glycosidases, des nucléases, etc... Toutes ces enzymes sont des hydrolases acides ayant une activité optimale aux environs de pH 5, ce qui correspond à celui existant dans l'organite [Reijngoud et Tager, 1973]. Le maintien de ce pH se fait grâce à une protéine de transport spéciale, qui utilise l'énergie procurée par

l'hydrolyse de l'ATP pour pomper des protons dans la lumière lysosomale [Mego, 1979].

B. FONCTIONS DES LYSOSOMES.

On distingue une fonction hétérophagique et une fonction autophagique.

1. Fonction hétérophagique.

Elle a pour but la digestion intracellulaire de substances exogènes captées par endocytose. Les implications de cette fonction hétérophagique sont multiples puisqu'elle intervient au niveau :

- de la nutrition hétérophagique;
- de la défense contre des bactéries, des virus, des macromolécules toxiques;
- du remodelage de certains tissus, suite à un déversement de leurs enzymes. Ex : ostéoclastes [Vaes, 1965 et 1969].

2. Fonction autophagique.

Elle a pour but la digestion de parties du cytoplasme de la cellule. Des régions de cytoplasme seront isolés par une membrane et leur contenu sera digéré après fusion avec des lysosomes.

Ce phénomène peut apparaître dans des conditions normales, en assurant un renouvellement des constituants cellulaires, ou en intervenant dans la différenciation cellulaire ou dans la métamorphose : kératinisation de la peau, métamorphose des têtards [Eeckhout, 1965; Fox, 1973].

Il peut aussi intervenir dans la nutrition dans des conditions défavorables d'apports de nutriments.

Enfin, il joue un rôle d'éboueur en nettoyant la cellule de protéines dénaturées, de débris cellulaires, etc...

Rem : il peut parfois persister des résidus indigestes à l'intérieur des lysosomes. Un processus d'exocytose permettra aux lysosomes surchargés d'éjecter leurs déchets à l'extérieur de la cellule.

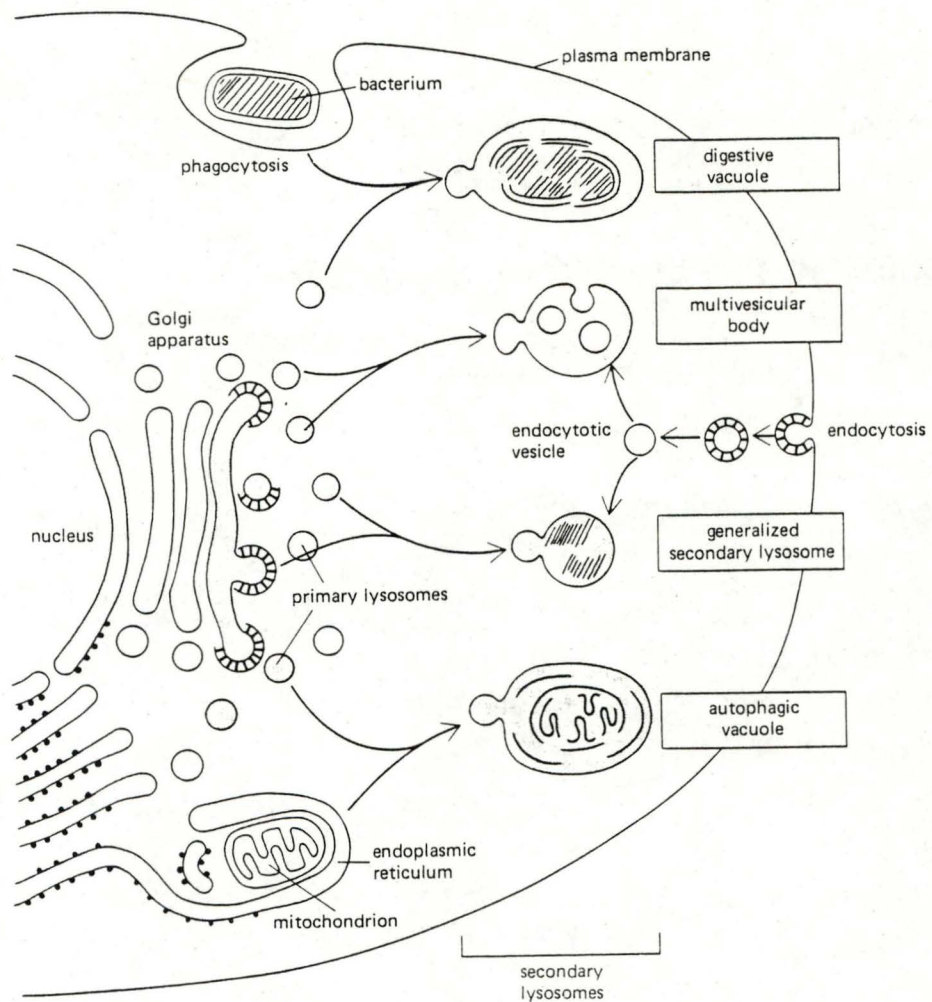


Figure 9. Représentation schématique de quelques-unes des voies par lesquelles les lysosomes secondaires sont supposés être formés par la fusion de vésicules cibles avec une série de petits lysosomes primaires contenant des enzymes hydrolytiques nouvellement synthétisés (d'après Alberts *et al.*, 1983).

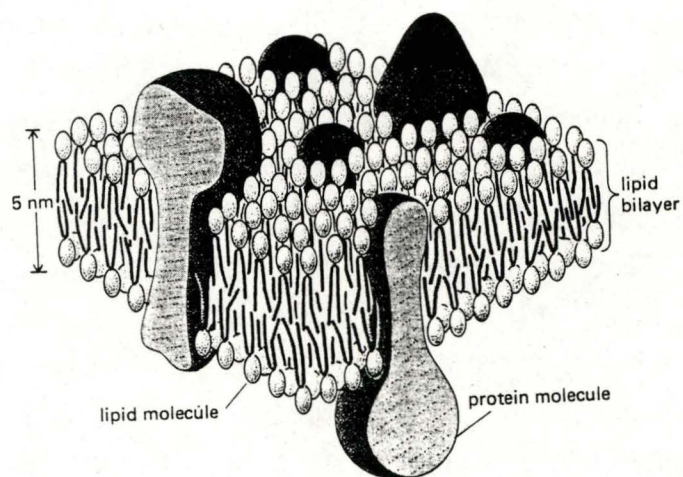


Figure 10. Constitution de la membrane biologique (d'après Alberts *et al.*, 1983).

C. TYPES DE LYSOSOMES.

A partir de cette fonction digestive propre aux lysosomes, on peut distinguer deux classes :

1. Les lysosomes primaires.

Ce sont qui sont nouvellement formés. Ils n'ont donc pas encore rencontré leur substrat et n'ont jamais été engagés dans un processus de digestion. Ils sont formés par bourgeonnement de la face TRANS de l'appareil de Golgi. Les hydrolases qu'ils contiennent ont été synthétisées au niveau du reticulum endoplasmique puis transférées jusqu'à l'appareil de Golgi.

2. Les lysosomes secondaires.

Ce sont des sacs membranaires de morphologie variable, contenant des substrats et leurs hydrolases [de Duve et Wattiaux, 1966]. Ils ont déjà été le siège d'hydrolyses. Ils résultent de la fusion répétée de lysosomes primaires avec divers substrats limités par une membrane. La morphologie des lysosomes secondaires sera donc très variable en fonction des différents substrats internalisés. On leur a parfois donné des noms spéciaux :

- vacuole digestive, résultant de la phagocytose de particules de grande taille (comme une bactérie, par exemple);
- multivesicular body (MVB), sac membranaire contenant de nombreuses vésicules d'un diamètre approximatif de 50 nm;
- vacuoles autophagiques, qui sont des structures lysosomales contenant des organites ou des vésicules de sécrétion (Fig. 9).

D. LA MEMBRANE LYSOSOMALE.

1. Rappel : constitution des membranes biologiques.

Les membranes biologiques sont constituées d'une double couche continue de lipides dans laquelle diverses protéines membranaires sont insérées (Fig. 10).

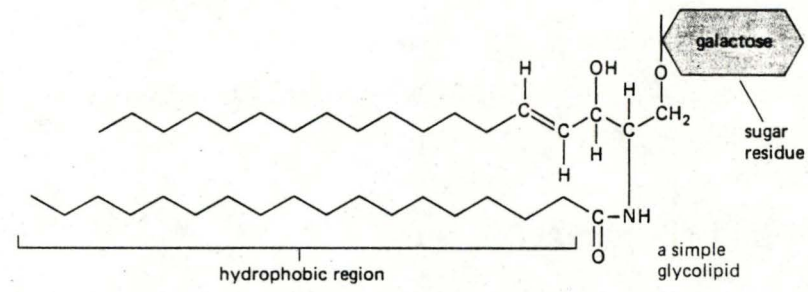
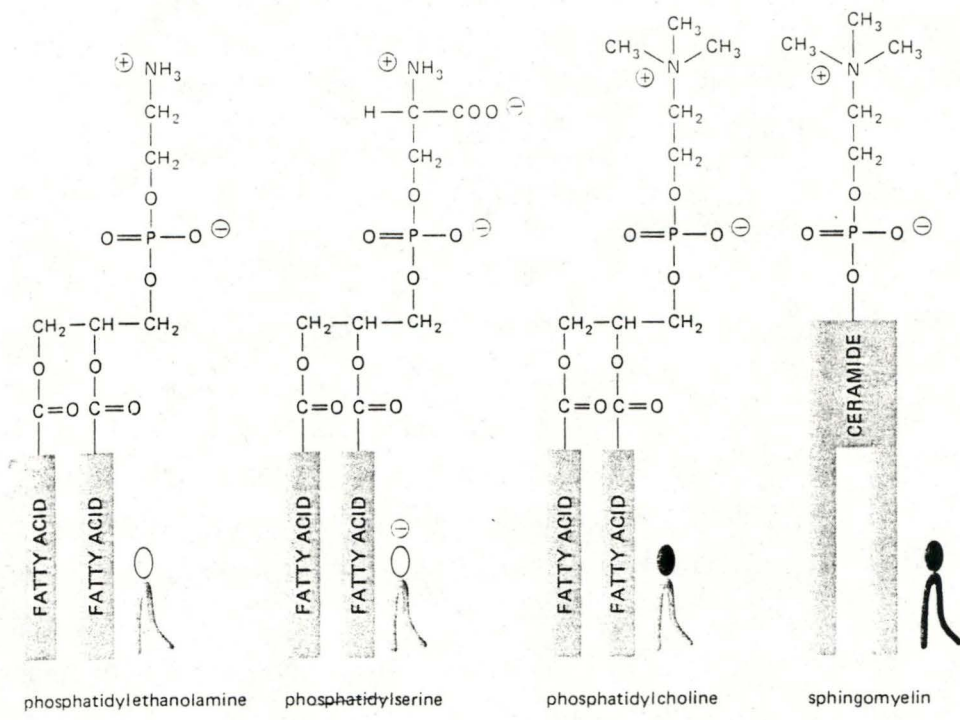
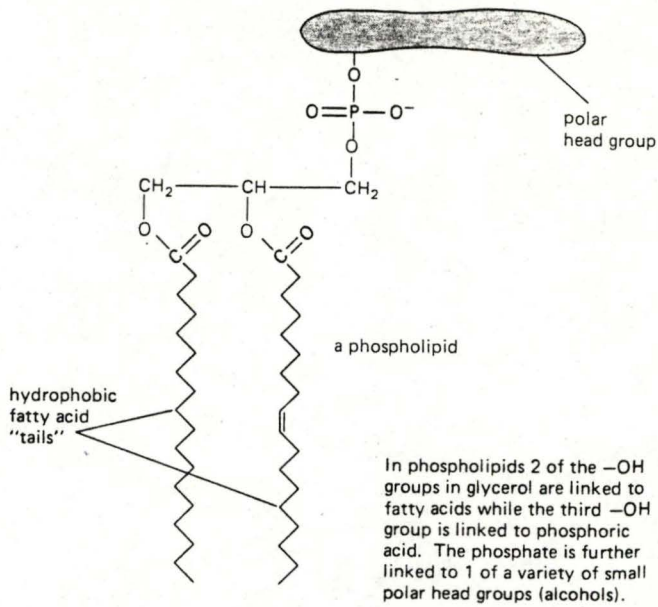


Figure 11a. Structure chimique des phospholipides (d'après Alberts *et al.*, 1983).

Figure 11b. Formules et symboles des quatre phospholipides majeurs retrouvés dans les membranes plasmiques de mammifères. Toutes les molécules lipidiques sont dérivées du glycérol, à l'exception de la molécule lipidique de la sphingomyéline, qui est dérivée de la sérine (d'après Alberts *et al.*, 1983).

Figure 11c. Structure chimique des glycolipides (d'après Alberts *et al.*, 1983).

La bicouche lipidique est fluide et les molécules lipidiques peuvent diffuser individuellement à travers leur propre monocouche. De plus, dans certains cas, des molécules de lipides peuvent passer d'une monocouche à l'autre (flip-flop), mais généralement, ce passage est extrêmement lent. On distingue principalement trois types de lipides constitutifs des membranes biologiques : les phospholipides (Fig. 11a et 11b), les glycolipides (Fig. 11c) et le cholestérol (Fig. 12). Il est à remarquer que les compositions lipidiques des monocouches externe ou interne sont différentes.

Les protéines membranaires peuvent être de deux types. Dans certains cas, elles peuvent s'étendre à travers la bicouche lipidique (protéines intrinsèques). D'autres protéines associées à la membrane ne traversent pas la bicouche mais sont attachées à l'un ou l'autre côté de la membrane (protéines extrinsèques). Ces dernières sont soit reliées par des interactions non covalentes avec les protéines transmembranaires, soit aux molécules lipidiques. Comme les molécules de lipides de la bicouche, de nombreuses protéines membranaires sont capables de diffuser dans le plan de la membrane.

La bicouche lipidique étant fortement imperméable à la plupart des molécules polaires, il doit exister des systèmes permettant le passage de petites molécules hydrosolubles vers l'extérieur ou vers l'intérieur de la cellule. En fait, ce transport se réalise grâce à des protéines contenues dans la membrane. Il en existe deux classes, les "carrier proteins" et les "channel proteins". Celles de la membrane plasmique sont particulièrement bien étudiés.

Les "carrier proteins" se fixent à des solutés spécifiques et traversent la bicouche en subissant un changement conformationnel qui provoque le passage du site de liaison avec le soluté d'un côté de la membrane à l'autre.

Les "channel proteins" forment des pores à travers la bicouche et permettent le passage d'ions de taille et de charge appropriées suivant le gradient électrochimique, à un rythme au moins cent fois plus rapide que le transfert par n'importe quel transporteur connu. Ces canaux sont généralement fermés et s'ouvrent en réponse à une perturbation spécifique de la membrane (changement du potentiel membranaire, fixation d'un neurotransmetteur sur un récepteur).

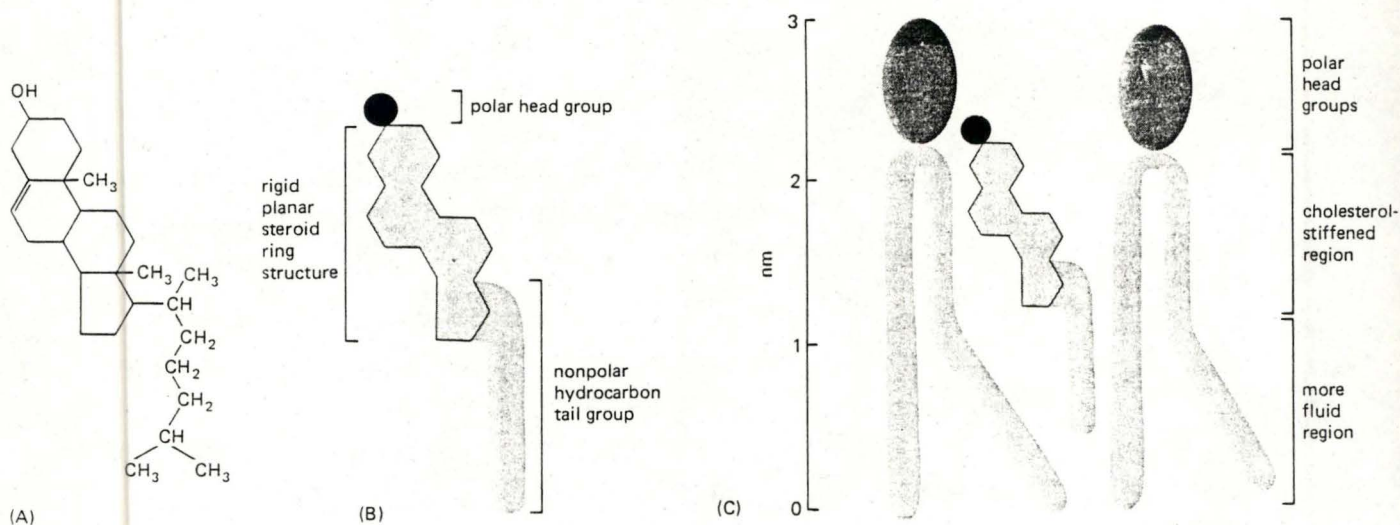


Figure 12. Cholestérol représenté par une formule (A) et par un dessin schématique (B), et décrit en interaction avec deux phospholipides dans une monocouche (d'après Alberts *et al.*, 1983).

Tableau 9. Composition lipidique de membranes purifiées de foie de rat.

La composition de la membrane lysosomale de foie de rat a été établie à partir de lysosomes de foie de rat purifiés à partir de rats injectés de Triton WR 1339, 4 jours avant le sacrifice (a) ou à partir de foie de rats normaux (b). (d'après Henning R., 1974; cité par Gonze, 1989)

Lipides	membrane plasmique	membrane lysosomale (a)	membrane lysosomale (b)	membrane mitochondriale
cholestérol/phospholipides matériel au front du solvant	0.9% 2.3%	0.52% 6.8%	0.27% 4.6%	0.06%
cardiolipine			4.6%	11.2%
phosphatidyl-éthanolamine (PE)	22.4%	17.9%	26%	31%
phosphatidyl-inositol (PI)	17.4%	9.9%	9.7%	7.5%
phosphatidyl-sérine (PS)			3%	
phosphatidyl-choline (PC)	34.8%	33.5%	41.1%	50.5%
sphingomyéline	20.5%	32.9%	7.6%	0%
lyso. dérivés de (PE)			2.9%	0%
lyso. dérivés de (PC)	2.6%	0%	2.9%	0%

2. Structure de la membrane lysosomale.

a) Morphologie.

Les lysosomes sont limités par une membrane dont la constitution est basée sur le même schéma que celui de toute membrane biologique : on y observe une bicouche lipidique dans laquelle sont insérées des protéines.

En microscopie électronique, on distingue un halo clair caractéristique, formant un "coat" séparant la membrane de l'espace lysosomal [Daens *et al.*, 1969]. Ce "coat" est riche en hydrates de carbone et jouerait un rôle dans la protection de la membrane face à l'agression des hydrolases lysosomales (cfr. plus loin).

b) Composition lipidique et protéique.

Les lipides de la membrane lysosomale sont essentiellement représentés par la phosphatidyl choline, la phosphatidyl éthanolamine, la sphingomyéline et le cholestérol. Des lipides neutres sont également présents (Tableau 9).

Les protéines de la membrane lysosomale sont, en général, fortement glycosylées [Schneider *et al.*, 1978]. Elles contiennent des sucres neutres, des hexosamines telles que la galactosamine ou la glucosamine, et des résidus d'acides sialiques, représentant 10% des sucres totaux. Cette abondance d'hydrates de carbone se justifierait par un rôle de protection de la membrane lysosomale (cfr. plus loin).

Les protéines de cette membrane seraient également impliquées dans le maintien du pH intralysosomal, le transport de certains métabolites vers l'intérieur ou vers l'extérieur des lysosomes et la reconnaissance des différents compartiments subcellulaires de la cellule.

c) Protection de la structure membranaire contre l'action des hydrolases.

Un rôle essentiel de la membrane lysosomale est de protéger le cytoplasme contre l'action des hydrolases acides. Mais cette membrane doit, elle aussi, résister aux enzymes lysosomales. Cette protection est assurée essentiellement par le "coat" interne, constitué d'hydrates de carbone greffés sur les protéines ou les lipides de la membrane lysosomale. Cette couche d'hydrates de carbone se termine par de nombreux acides sialiques chargés négativement. Ceux-ci contribuent à la protection

des liaisons sensibles aux enzymes lysosomales [Neiss, 1984; cité par Gonze, 1989]. De plus, il existerait un processus de réparation au niveau membranaire. En effet, un contact prolongé des glycoprotéines et des lipides avec les hydrolases provoquera finalement leur destruction, mais ce phénomène est rapidement compensé par une néosynthèse membranaire.

d) Stabilité de la membrane lysosomale.

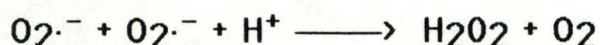
Aussi bien lors de la maladie veineuse que lors de l'arthrite ou lors d'une réponse inflammatoire à une blessure tissulaire ou à un agent irritant, on note une libération pathologique d'enzymes lysosomales dans les tissus. Les causes de cette libération ne sont pas toujours connues avec précision mais on a pu montrer qu'il existe des substances stabilisant ou déstabilisant la membrane. Ainsi on a montré *in vitro* que des formes liposolubles de la vitamine A tel que le rétinol ont un effet stimulateur important sur les processus dans lesquels participent les lysosomes [Vaes, 1969; Weissman, 1969]. D'autres composés tels que les corticostéroïdes semblent avoir un effet inhibiteur sur les processus dépendant des lysosomes [Vaes, 1969; Weissman, 1969]. En fait, tout se passe comme si certaines substances rendaient les membranes lysosomales plus fragiles alors que d'autres les stabiliseraient.

3. Action des radicaux libres sur la latence des enzymes lysosomales.

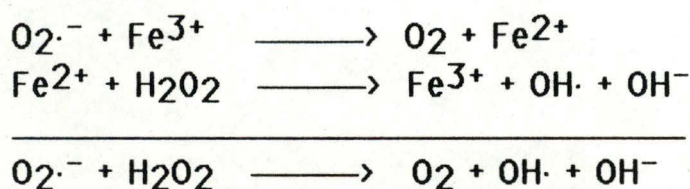
Un radical libre est une espèce chimique capable de mener une existence indépendante, contenant un ou plusieurs électrons non appariés et étant dès lors très réactionnelle [Halliwell & Gutteridge, 1985].

Dans l'organisme, l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ provenant de l'oxygène moléculaire peut être formé suite à l'activité de la NADPH cytochrome P 450 réductase ou suite à l'activité catalytique de certaines enzymes telle que la xanthine oxydase. Il peut également y avoir production d' $O_2^{\cdot-}$ au niveau de la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie. Ces anions superoxydes peuvent réagir avec une molécule non radicalaire et initier ainsi une réaction en chaîne. Ils peuvent également

subir une dismutation spontanée :



Le peroxyde d'hydrogène produit constitue un danger pour la cellule car il serait à l'origine de la production de radicaux hydroxyles $\text{OH}\cdot$, par le biais de $\text{O}_2\cdot^-$ et de Fe^{3+} . En effet, la réaction directe de $\text{O}_2\cdot^-$ sur H_2O_2 est impossible pour des raisons thermodynamiques mais la présence de Fe^{3+} dans le milieu permet à la réaction de se dérouler (réaction de Fenton) :

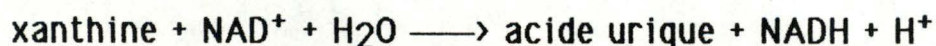


Les radicaux hydroxyles ainsi formés sont beaucoup plus réactionnels que les radicaux superoxydes et peuvent attaquer les protéines, les acides nucléiques et les phospholipides membranaires.

L'organisme se protège contre les dérivés actifs de l'oxygène par deux types de défense :

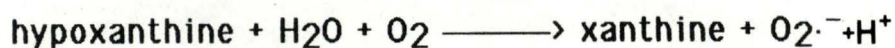
- défense enzymatique par la catalase, la superoxyde dismutase et la glutathion peroxydase;
- défense par des molécules lipophiles ou hydrophiles de faible PM (a-tocophérol, acide ascorbique) qui neutralisent l'activité des radicaux libres.

Il semble que dans la maladie veineuse, la principale source de radicaux superoxydes survenant lors de l'hypoxie soit due à l'activité de la xanthine oxydase. Habituellement, cette enzyme se trouve essentiellement (90%) sous une forme déshydrogénase dont l'activité nécessite la présence de NAD^+ . Dans ce cas, elle transfère les électrons sur NAD^+ en formant de l'acide urique et $\text{NADH} + \text{H}^+$ suivant :



Mais dans certains cas, on peut avoir une conversion de cette enzyme en sa forme oxydase. Elle transforme alors l'hypoxanthine en xanthine et la

xanthine en acide urique [Fisher, 1988], suivant :



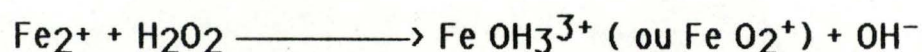
Stirpe *et al.* [1969] ont montré que ce phénomène pouvait se produire *in vitro* après une protéolyse, une incubation à 37°C ou encore un traitement aux solvants organiques. On pense actuellement que cette conversion pourrait se produire *in vivo* lors de l'hypoxie.

Les radicaux superoxydes produits pourraient alors subir une réaction de dismutation pour former H₂O₂ et O₂. Selon Fridovich [1985], la production d'O₂^{·-} dépend du pH et de la pression partielle en O₂ : à pH 7.8, il y aurait seulement 15% d'O₂^{·-} produits. A pH 10 et pour une pO₂ de 1 atmosphère, la production de radicaux superoxydes serait de 100%.

Les radicaux superoxydes et le peroxyde d'hydrogène ont une réactivité limitée. De ce fait, ils peuvent diffuser sur une certaine distance [Fisher, 1988]. De cette manière, la production de radicaux libres dans un compartiment subcellulaire peut s'étendre à toute la cellule.

Nous avons vu plus haut que O₂^{·-} et H₂O₂ pouvaient former, en présence de Fe³⁺, des radicaux OH[·]. Dans les cellules, le stockage du fer peut se faire sous différentes formes mais on a montré l'existence de ferritine dans les lysosomes [Halliwell & Gutteridge, 1986]. Le fer qui y est inclus peut être mobilisé grâce à l'action d'O₂^{·-} sur la protéine de transport. Le fer ainsi libéré devient utilisable pour la production d'OH[·]. Ces radicaux sont beaucoup plus réactionnels que les radicaux superoxydes ou le peroxyde d'hydrogène, ce qui leur procure une durée de vie assez courte. Ils n'induisent donc des dégâts qu'à proximité immédiate de leur site de production. Ces OH[·] peuvent réagir avec presque tous les types de molécules présentes dans les cellules vivantes (sucres, acides aminés, DNA, phospholipides,...).

D'après certains auteurs, les radicaux OH[·] ne seraient pas les seuls radicaux libres à être produits dans la réaction de Fenton. Ainsi, des radicaux ferryls pourraient être formés suivant :



De même, un autre radical parfois mentionné est le radical perferryl FeO^+ ou $\text{Fe}^{3+}\text{O}_2^-$. Ces deux radicaux sont nettement moins toxiques que OH^\cdot mais pourraient malgré tout amener une certaine altération de la membrane.

Il est possible (et des résultats obtenus par I. Hamer en 1988 sur des membranes lysosomales de foie de rat vont dans ce sens) que les dérivés toxiques de l'oxygène puissent léser la membrane lysosomale. Ceci serait à mettre en relation avec l'augmentation des activités des enzymes lysosomales dans le plasma sanguin décrite par Niebes.

III. BUT DU TRAVAIL.

Les lysosomes sont un des éléments importants intervenant dans la pathologie veineuse. Cependant, le peu d'information recueilli au sujet des lysosomes de la paroi veineuse nous a poussé à entamer une étude biochimique de ces organites. Mais nous avons voulu cette étude plus large, aussi y avons nous associé les autres principaux organites subcellulaires.

Dans un premier temps, nous mettrons au point la technique d'homogénéisation la plus adéquate pour préserver l'intégrité des organites subcellulaires ainsi que le dosage de certaines enzymes de référence des lysosomes, des peroxysomes, des mitochondries, du réticulum endoplasmique et de la membrane plasmique au niveau de la paroi de veines caves inférieures de rat. Nous comparerons les résultats obtenus à ceux observés pour les veines caves inférieures de chien.

Par après, nous effectuerons des fractionnements subcellulaires sur des veines caves inférieures de rats en essayant de dégager un schéma expérimental propre à ce tissu. Nous essayerons également de mettre en évidence l'existence d'une latence des enzymes lysosomales.

Finalement, nous montrerons les résultats préliminaires obtenus lors d'essais de labilisation de la membrane lysosomale de veine cave inférieure de rat par les radicaux libres.

CHAPITRE 2 : TECHNIQUES EXPERIMENTALES.

AORTE ABDOMINALE

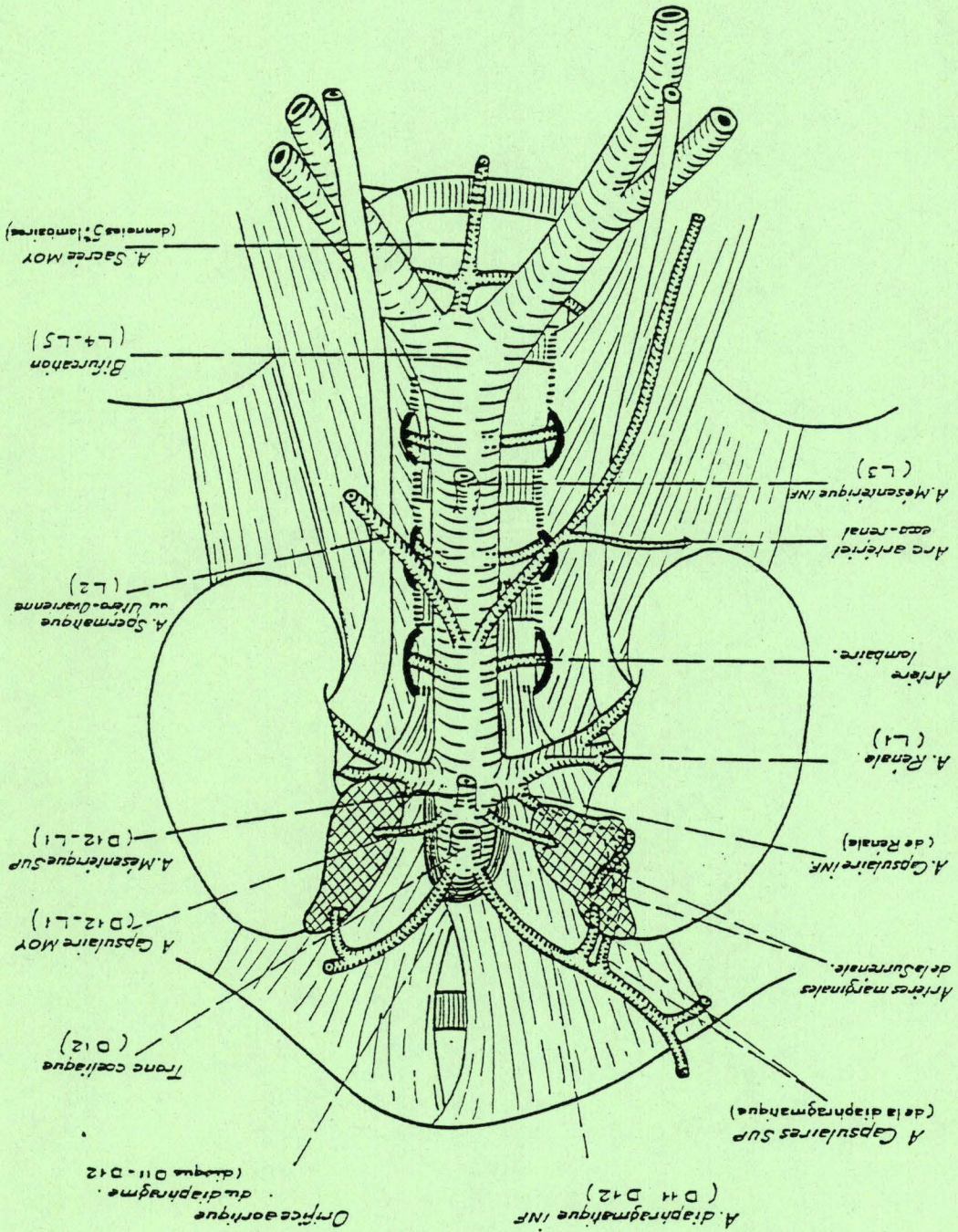


Figure 13a.

CHAPITRE 2 : TECHNIQUES EXPERIMENTALES.

I. PRELEVEMENT DE LA VEINE CAVE INFÉRIEURE (VCI) DE RAT POUR DOSAGES ENZYMATIQUES.

La VCI est prélevée sur rat mâle Wistar immédiatement après sacrifice. Après sectionnement de l'aorte abdominale (Fig. 13a), on voit apparaître la VCI. Celle-ci doit être prélevée sur la plus grande longueur possible, entre la jonction avec les veines sus-hépatiques et la ramifications en veines iliaques (Fig. 13b). Après avoir enlevé les graisses et mésentère et éliminé le sang dans du saccharose 0.25 M, les VCI sont pesées. Puis, elles sont grossièrement découpées et passées 5 fois 15 secondes à l'ultraturrax (il faut veiller à maintenir les veines dans la glace durant l'opération). Ensuite, on filtre sur gaze et la partie liquide qui est conservée et éventuellement congelée.

II. PRELEVEMENT DE LA VEINE CAVE INFÉRIEURE DE CHIEN POUR DOSAGE ENZYMATIQUE.

Les VCI de chien ont été prélevées à notre intention par l'équipe du Professeur J.Lammerant (Physiologie générale). Les traitements préalablement subis par ces chiens avant ablation de la VCI sont rapportés en annexe.

Après nettoyage du sang dans du saccharose 0.25 M glacé, la veine est ouverte longitudinalement puis étalée. On la découpe alors en petits morceaux de 1 à 2 mm de côté, qu'on plonge dans le saccharose 0.25 M glacé.

Un tiers de la veine est ensuite placé dans 8 ml d'une solution Hépès-EGTA et portée à 37°C pendant une heure, sous agitation lente et constante. Un deuxième tiers est placé dans 8 ml d'une solution Hépès et portée à 37°C pendant une heure, sous agitation lente et constante. Ensuite, chacune de ces deux portions est lavée deux fois au saccharose 0.25 M puis placée dans 7 ml de collagénase (48 mg collagénase/100 ml Tampon Hépès pH 7.85) pendant 2 heures à 37°C, sous agitation lente et continue.

Par après, chacune des deux parties est lavée trois fois au saccharose 0.25 M.

VEINE CAVE INFÉRIEURE

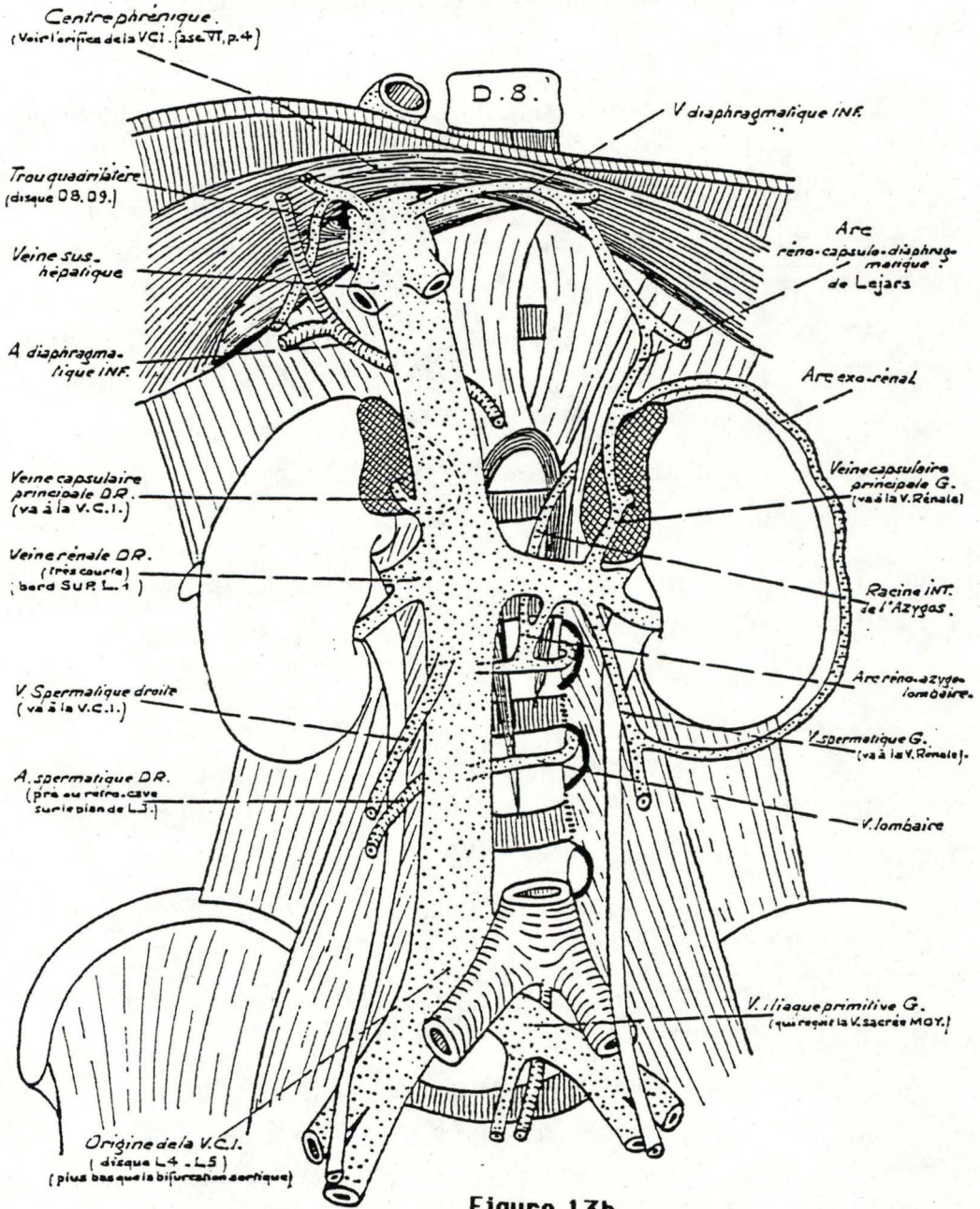


Figure 13b.

Tableau 10 : Résumé des conditions expérimentales des dosages enzymatiques.

Organites subcellulaires	Enzymes	Substrat	Concentration	pH	Mesure	Références
Lysosomes	cathepsine C	glycyl-L-arginine β-naphtylamide	0.5 mM	5	colorimétrique la naphtylamine	Jadot <i>et al.</i> , 1984
	cathepsine C	glycyl-L-arginine β-naphtylamide	0.5 mM	5	fluorimétrique de la naphtylamine	Jadot <i>et al.</i> , 1984
	α-mannosidase	méthyl umbelliferyl α-D-mannoside	4 mM	4.5	fluorimétrique de la 4-méthyl- umbelliferone	Peters <i>et al.</i> , 1972
	β-galactosidase	para-nitrophényl galactoside	3.75 mM	3.6	colorimétrique du galactose	Sellinger <i>et al.</i> , 1960
Peroxisomes	catalase	peroxyde d'hydrogène	1.5mM	7	colorimétrique du peroxyde d'hydrogène	Bauduin <i>et al.</i> , 1964
Mitochondries	cytochrome oxydase	cytochrome C	0.017 mM	7.4	spectrophotométrique du cytochrome réduit	de Duve <i>et al.</i> , 1955
Membrane plasmique	peptidase IV	glycyl-proline β-naphtylamide	4.5 mM	8	colorimétrique de la naphtylamine	Nagatsu <i>et al.</i> , 1976
	peptidase IV	glycyl-proline β-naphtylamide	0.25 mM	7.5	fluorimétrique de la naphtylamine	Goldberg <i>et al.</i> , 1958
	phospho diestérase alcaline	thymidine 5' monophosphate para nitrophényl ester	5 mM	9.6	colorimétrique du para-nitrophényl	Wattiaux <i>et al.</i> , 1969
	leucine naphtyl amidase	L-leucyl-2-naphtyl amide	4 mM	6.75	fluorimétrique de la naphtylamine	Peters <i>et al.</i> , 1972
Réticulum endoplasmique	NADPH cytochrome C réductase	cytochrome C/NADPH	4.5 μM	7.4	spectrophotométrique du cytochrome réduit	Beaufay <i>et al.</i> , 1974
	glucose-6- phosphatase	glucose-6-phosphate	0.24 M	6.5	colorimétrique du phosphate	de Duve <i>et al.</i> , 1955

Finalement, chacune des deux portions de veines subit 4 passages au Kontes type A (Loose) puis une centrifugation pendant 10 minutes à 1500 RPM. Les surnageants obtenus sont congelés.

Le tiers restant de VCI subit 5 passages de 15 secondes à l'ultraturax puis est filtrée sur gaze. Le filtrat est alors congelé (voir 2A).

III. METHODES GENERALES DES DOSAGES ENZYMATIQUES.

Le tableau 10 donne un résumé des conditions expérimentales requises pour chacun des différents dosages enzymatiques, ainsi que les références correspondantes décrivant plus en détails les méthodes employées.

Le dosage des protéines s'effectue suivant la méthode de Folin [Lowry *et al.*, 1951].

IV. TECHNIQUE DE FRACTIONNEMENT DE VEINE CAVE INFÉRIEURE (VCI) DE RAT.

Le processus de fractionnement de VCI de rats suit le schéma proposés par Wibo *et al.* en 1980, avec quelques modifications.

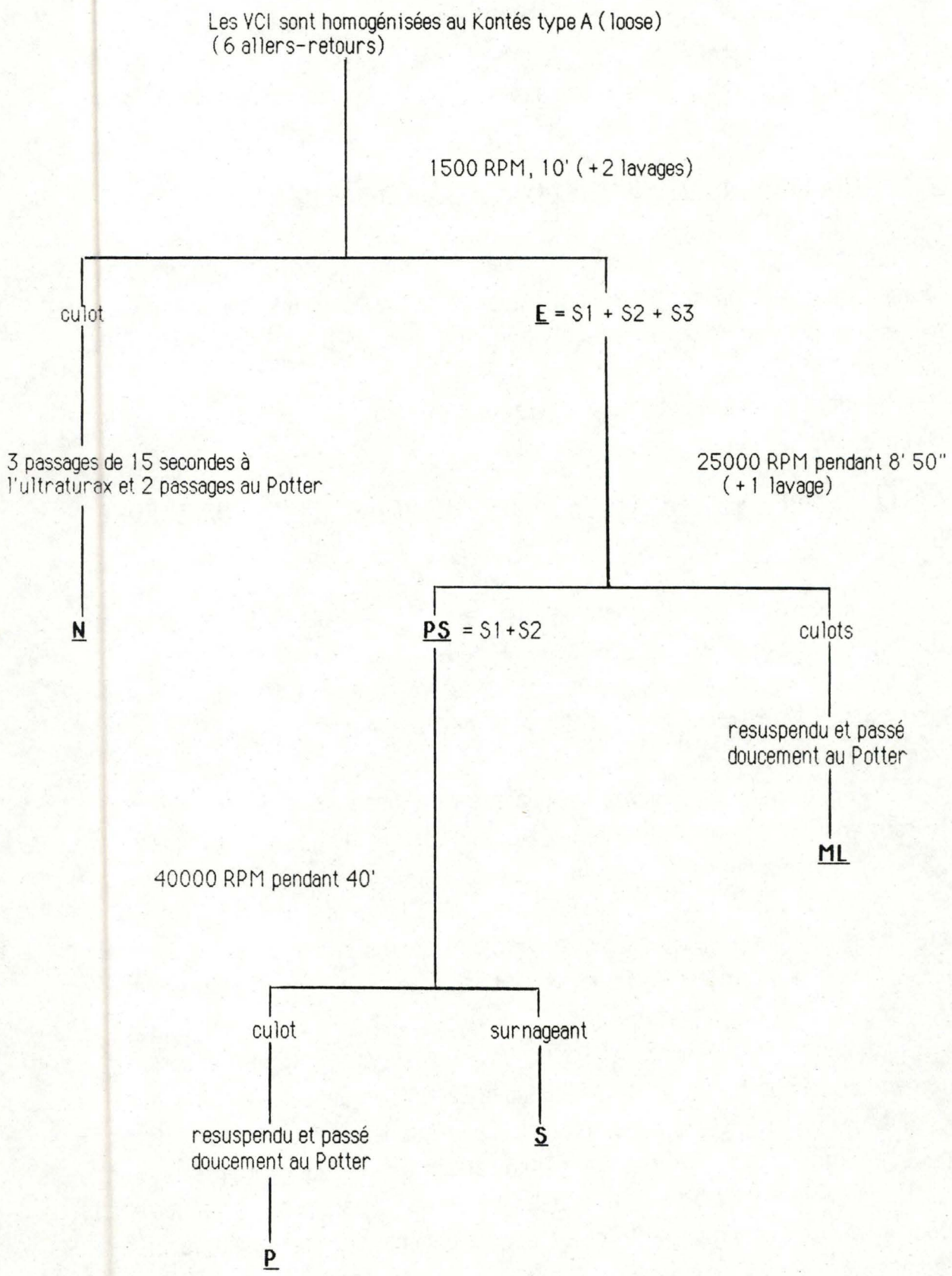
Les VCI sont prélevées sur rats mâles Wistar immédiatement après sacrifice, de la même manière que lors des prélèvements pour dosages enzymatiques.

Les VCI sont nettoyées des graisses et mésentère qui y adhèrent. Elle sont ensuite débarrassées du sang en les plongeant dans du saccharose 0.25 M tamponné avec de l'imidazol 3 mM PH 7.4 et maintenu dans la glace.

Une fois réunie la quantité adéquate de VCI, on sèche celles-ci puis on les pèse sur papier filtre. Ensuite, on les découpe une à une en petits morceaux de 1 à 2 mm. La découpe se fait sur une plaque de cire posée sur de la glace.

L'homogénéisation se fait avec un Kontes type A (Loose), dans un volume approximatif de 5 ml de saccharose tamponné avec de l'imidazol pH 7.4. Afin de faciliter l'homogénéisation, le passage au Kontes se fait par groupe de cinq ou six veines. Après 6 allers et retours du piston, on centrifuge l'homogénat à 1500 RPM pendant 10 minutes. Le surnageant sera décanté dans un tube taré et le culot subira encore deux homogénéisations et deux centrifugations à 1500 RPM pendant 10 minutes.

Schéma de fractionnement subcellulaire de VCI de rat, d'après Wibo *et al* [1980], modifié.



Les trois surnageants sont rassemblés dans un même tube pour donner la fraction **E**.

Le culot restant est resuspendu dans un volume approximatif de 2 ml de saccharose tamponné et glacé et puis passé à l'ultraturrax (3 fois 15 secondes) et enfin broyé dans un homogénéiseur co-axial de Potter. On obtient ainsi la fraction **N**.

Une partie de la fraction **E** est conservée pour des dosages ultérieurs. Le reste est centrifugé au rotor 40 à 25 000 RPM pendant 8 minutes 50 secondes (55 000 g pendant 6 minutes). Le surnageant est décanté dans un tube taré. Le culot est resuspendu dans un volume approximatif de 5ml de saccharose tamponné et glacé et est à nouveau centrifugé à 25 000 RPM pendant 8 minutes 50 secondes (lavage du culot). Le surnageant obtenu est ajouté au premier pour obtenir ainsi la fraction **PS**.

Le culot est resuspendu dans 1 ou 2 ml de saccharose tamponné et glacé puis passé doucement au petit Potter. On obtient ainsi la fraction **ML**.

La totalité de la fraction **PS** est reprise et centrifugée à 40 000 RPM pendant 40 minutes. Le surnageant donne la fraction **S**. Le culot est resuspendu dans 1 à 2 ml de saccharose tamponné et glacé puis passé doucement au petit Potter pour donner la fraction **P**.

On obtient de cette manière 4 fractions hétérogènes mais enrichies en certains organelles :

- la **fraction N** contient essentiellement des noyaux, des débris cellulaires et un certain nombre de cellules intactes ayant résisté à l'homogénéisation;
- la **fraction ML** est enrichie en mitochondries, en lysosomes et en peroxyosomes;
- la **fraction P**, microsomale, contient la plus grande partie du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi, ainsi que des fragments de la membrane plasmique;
- la **fraction S**, ou "fraction soluble", renferme tous les éléments non sédimentables.

Sur chacune de ces fractions, différents dosages enzymatiques ainsi que le dosage des protéines seront effectués. En effet, le contenu en différents types de granules dans chacune des fractions peut-être estimé en mesurant l'activité d'enzymes marqueurs spécifiquement associées à un type de granules déterminé (de Duve *et al*, 1955).

Les enzymes marqueurs utilisés dans les expériences de fractionnement sont les suivantes : la cathepsine C (et dans certains cas l' α -mannosidase) pour repérer les lysosomes, la cytochrome oxydase pour repérer les mitochondries, la catalase pour les peroxysomes, la NADPH cytochrome C réductase pour le réticulum endoplasmique. La représentation graphique des résultats est celle préconisée par de Duve *et al.* (1955) sous forme d'histogramme, où chacune des fractions est représentée par un rectangle bien défini. La hauteur de chaque rectangle représente l'activité spécifique relative, c'est-à-dire le rapport de l'activité spécifique dans la fraction déterminée sur l'activité spécifique dans l'homogénat. Ceci symbolise en fait la purification. La base de chaque rectangle correspond à la quantité de protéines présentes dans la fraction en question. La surface représente le pourcentage d'activité retrouvé dans la fraction. Pour les dosages enzymatiques comme pour les dosages protéiques, on réalise un calcul de récupération sur le fractionnement, qui correspond à la somme des valeurs d'activité enzymatique trouvées dans les fractions **N**, **ML**, **P** et **S** rapportée à l'activité de l'homogénat, qui équivaut à **E+N**.

V. EFFETS DES RADICAUX LIBRES SUR LA MEMBRANE LYSOSOMALE.

Afin de déterminer l'action des radicaux libres sur la latence enzymatique lysosomale, nous emploierons une technique mise au point par I. Hamer [1988]. Ce procédé se déroule en deux étapes :

- 250 μ l d'une fraction ML préparée suivant le procédé de fractionnement subcellulaire décrit plus haut sont préincubés 20 minutes en présence de l'un ou plusieurs des constituants repris ci-dessous, tel qu'indiqué dans les résultats :

- xanthine 250 μ M
- xanthine oxydase 18 mU/ml (Sigma, Grade III)
- saccharose 0.25 M
- FeCl₃ 0.2 mM
- ADP 2 mM (Sigma, Grade IX)

-200 μ l de la mixture de préincubation sont repris et incubés 10 minutes à 37°C afin de doser la cathepsine C libre ou totale.

Après 10 minutes d'incubation, la réaction est arrêtée en ajoutant 1 ml de tampon glycine/NaOH (50 mM)-EDTA (5 mM) pH 10.5. La lecture se fait au spectrofluorimètre SLM Aminco SPF 500 (λ excitation = 338 nm, λ émission = 415 nm).

CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSIONS.

CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSIONS.

I. ETUDE DES ENZYMES DE VEINE CAVE INFERIEURE.

A. CINETIQUE ENZYMATIQUE.

1. Introduction.

Une des fonctions les plus importantes des protéines est leur rôle de catalyseur enzymatique vis-à-vis de réactions chimiques spécifiques. Dans ce cas, le ligand est la molécule de substrat et la liaison de l'enzyme au substrat est une étape essentielle pour le déroulement de la réaction chimique.

En fait cette liaison enzyme-substrat est un facteur limitant. En effet, il existe pour chaque enzyme une limite quant à la quantité de substrat pouvant être transformé en un temps donné. Si la concentration en substrat augmente, la vitesse de production augmente également, jusqu'à atteindre une **vitesse maximale**. A ce point, l'enzyme est saturée par le substrat et le taux de réaction dépend seulement de la vitesse à laquelle le substrat peut être transformé. Cette vitesse est appelée le turnover et est d'environ 1000 molécules de substrat par seconde pour la plupart des enzymes.

L'autre paramètre cinétique fréquemment employé pour caractériser une enzyme est le **K_M**, ou **constante de Michaelis-Menten**. Elle représente la concentration en substrat qui permet d'atteindre la moitié de la vitesse de réaction maximale. Un K_M faible indique que l'enzyme atteint son taux catalytique maximal à une faible concentration en substrat et indique généralement une liaison très forte entre l'enzyme et le substrat.

La forme caractéristique de la courbe de saturation en substrat d'une enzyme peut s'exprimer mathématiquement par l'équation de Michaelis-Menten :

$$V_0 = \frac{V_{\max} (S)}{K_M + (S)}$$

ou V_0 = vitesse initiale à la concentration en substrat (S).

V_{max} = vitesse maximale.

K_M = constante de Michaelis-Menten.

En connaissant K_M et V_{max} d'une enzyme, on peut calculer la vitesse de réaction d'une enzyme pour n'importe quelle concentration en substrat. La plupart des réactions enzymatiques, y compris celles faisant intervenir deux ou plusieurs substrats, peuvent être analysées quantitativement par la théorie de Michaelis-Menten, ce qui prouve que les enzymes catalysent les réactions en se combinant transitoirement avec leur substrat pour abaisser ainsi l'énergie d'activation de l'ensemble de la réaction.

Dans notre cas, les cinétiques des enzymes étudiées ont été examinées afin de trouver les conditions expérimentales optimales et en particulier l'intervalle pour lequel les vitesses mesurées sont proportionnelles au temps ou à la concentration en enzyme, ceci afin de permettre l'établissement des paramètres cinétiques.

Pour la plupart des enzymes mesurées, la réaction est d'ordre zéro par rapport au substrat, c'est-à-dire que la vitesse augmente de façon linéaire en fonction de la concentration en enzyme. La concentration en substrat est donc suffisante pour assurer la vitesse maximale de l'activité enzymatique. Nous n'avons pas déterminé chaque fois le K_M , nous référant aux normes de la littérature pour le foie de rat.

La mise au point de ces différents dosages enzymatiques verra son application pratique lors des fractionnements subcellulaires qui seront entrepris ultérieurement.

Chaque échantillon est constitué d'un prélèvement de 8 à 10 veines caves inférieures de rat ou d'1 veine cave inférieure de chien. L'homogénéisation se fait à l'ultraturrax de façon à obtenir une homogénéisation maximale, sauf pour le dosage de l' α -mannosidase et de la peptidase IV de veine cave inférieure de chien, où l'homogénéisation est réalisée après digestion par la collagénase pendant 2 heures, à 37°C.

La quantité de matériel dont nous disposons est limitée. Le nombre de déterminations que nous avons pu faire est donc restreint. Les résultats pour chaque enzyme sont exprimés en μ moles de substrat transformé par mg de protéines en fonction du temps ou en μ moles de substrat transformé par minute en fonction de la quantité de protéines ou du volume

d'homogénat incubé, et ceci pour deux à quatre échantillons différents à chaque fois (n=2, 3 ou 4). Seule l'activité de la NADPH cytochrome c réductase est donnée en nanomoles de substrat transformé car elle est très faible.

Les blancs des activités enzymatiques sont dans tous les cas, hormis la catalase, la cytochrome oxydase et la NADPH cytochrome c réductase, mesurés en incubant la mixture contenant le substrat dans des conditions de température et de temps identiques à celle du test. Cette mixture est ensuite additionnée de fixateur puis l'enzyme est ajoutée. Pour la catalase, l'incubation se fait en absence de substrat. Pour la NADPH cytochrome c réductase, la mesure du test se fait en continu et la différence d'absorbance est mesurée pendant un laps de temps bien déterminé. On s'est assuré par ailleurs que le cytochrome ne subit pas de réduction en absence du deuxième substrat, à savoir le NADPH. En ce qui concerne la cytochrome oxydase, le cytochrome, en absence de préparation enzymatique, ne subit pas d'oxydation spontanée et le blanc est nul.

Tous les résultats sont repris sous deux formes :

- sous forme de graphiques (Fig. 14 à 18). Les ordonnées à l'origine donnent les blancs calculés. Les blancs mesurés sont repris dans ces mêmes figures sous forme de ● . Il en découle que les activités spécifiques (1) et (2) (voir tableau 11a et b) seront semblables si les deux types de blancs concordent mais divergeront dans le cas contraire. Lorsque les activités spécifiques sont faibles (ce qui est le cas de la veine cave inférieure), ce contrôle est important. Les droites ont été calculées systématiquement même quand il n'y avait que deux mesures, ce qui permet de vérifier les valeurs des blancs calculés.

- sous forme de tableau (Tab. 11a,b et 12). Dans les tableaux 11a et b sont rassemblés les activités et activités spécifiques (1) en tenant compte du blanc mesuré. L'activité spécifique (2) calculée à partir des figures 14 à 18 y est reprise aussi. Dans le tableau 12 sont repris les paramètres des droites calculées des figures 14 à 18.

Quoique les descriptions de la veine variqueuse mettent l'accent sur une altération touchant principalement les lysosomes, nous avons voulu cette approche la plus large possible. Des modifications autres que celles discutées dans la littérature, et qui seraient passées inaperçues, pourraient ainsi être détectées.

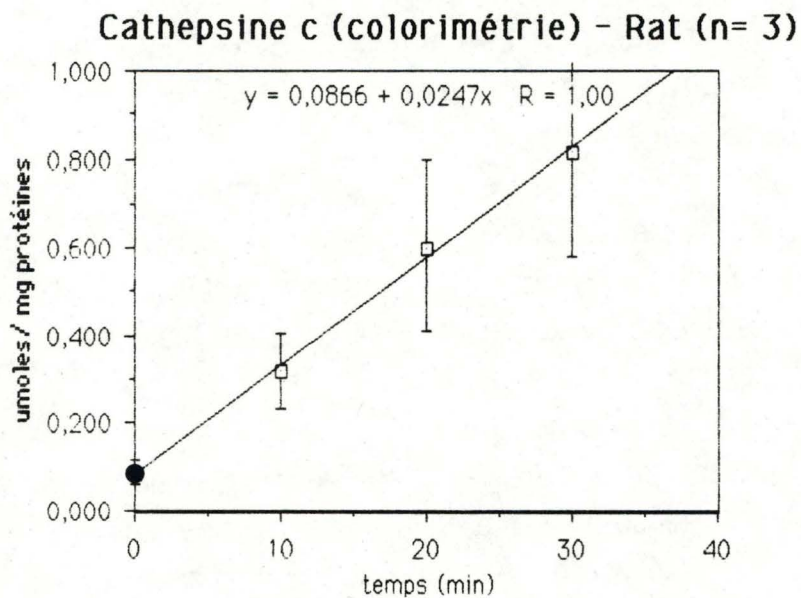
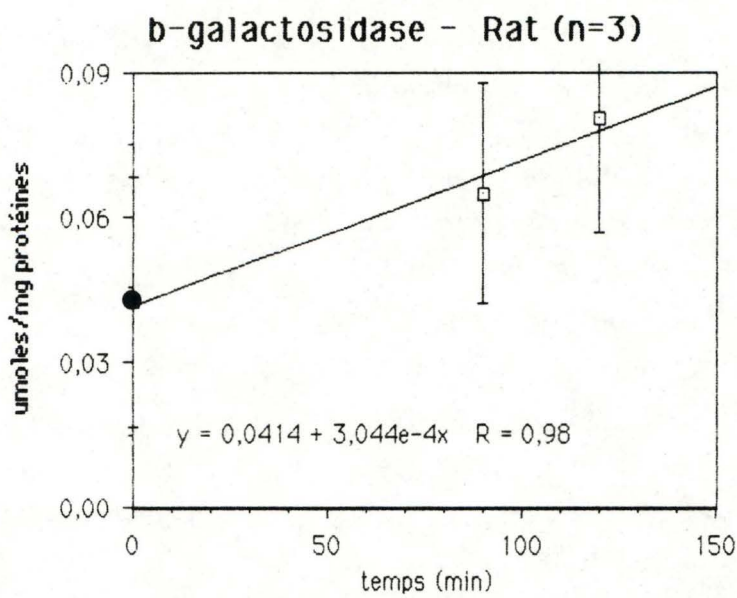
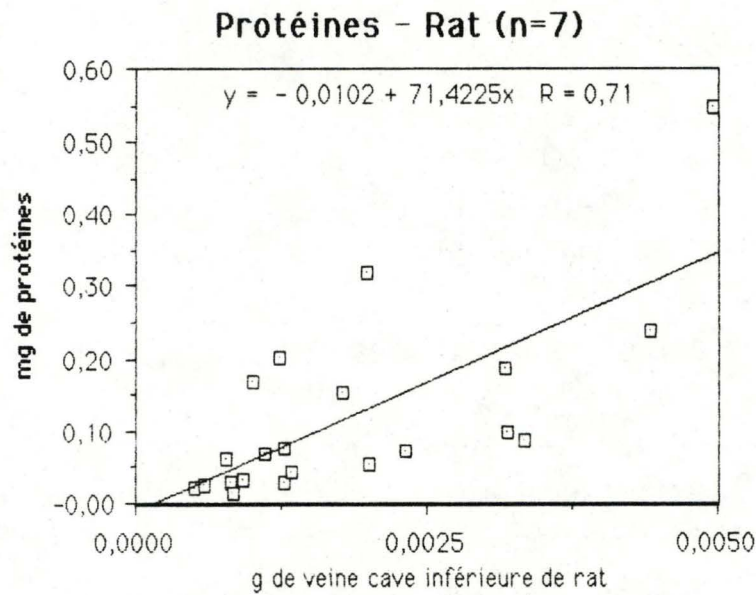


Figure 14. Calcul des droites de régression des dosages de protéines, β -galactosidase et cathepsine c de veine cave inférieure de rat. Les blancs mesurés sont indiqués par un rond plein. Le nombre d'échantillons constitués chacun de 8 à 10 veines caves inférieures de rat est indiqué entre parenthèses.

2. Cinétique des enzymes marqueurs déterminées sur la VCI de rat. (Fig. 14 à 16, Tab. 11a,b, 12)

a) Les protéines.

La dispersion des points montre la variabilité du contenu en protéines d'un échantillon de veines caves inférieures de rat à l'autre. C'est pourquoi toutes les activités enzymatiques seront exprimées en $\mu\text{moles/mg}$ de protéines.

b) La β -galactosidase.

L'activité par mg de protéines de cette enzyme est faible. De plus, la précision de la mesure est très faible (voir tableau 12). Le blanc calculé (ordonnée à l'origine) est de 0.0414. Le blanc mesuré est de 0.0423 ± 0.002 . La correspondance est donc assez bonne.

Le substrat utilisé ici est le para nitrophényl β -D-galactoside. Il y aurait donc avantage à utiliser le méthylumbelliferyl β -D-galactoside dont le produit d'hydrolyse est fluorescent pour obtenir une plus grande sensibilité. Cependant, à cause du caractère hydrophobe du résidu méthylumbelliferyl, ce substrat est peu adéquat pour les mesures d'activités libres.

La β -galactosidase semble donc peu indiquée pour servir d'enzyme marqueur des lysosomes vu la faible sensibilité de la mesure.

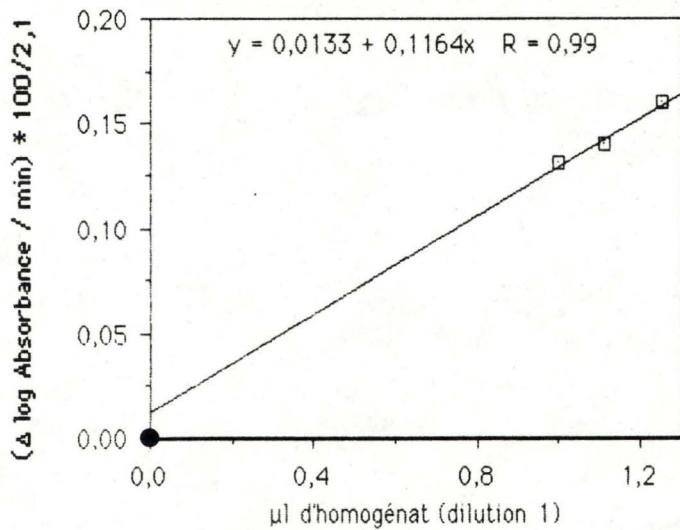
c) La cathepsine C.

Contrairement à la β -galactosidase, le dosage de la cathepsine C par la méthode colorimétrique montre une précision nettement meilleure (voir tableau 12). Il faut également faire remarquer que les différences d'activité d'un échantillon à l'autre sont relativement limitées. Les blancs mesurés (0.0880 ± 0.029) et calculés correspondent bien.

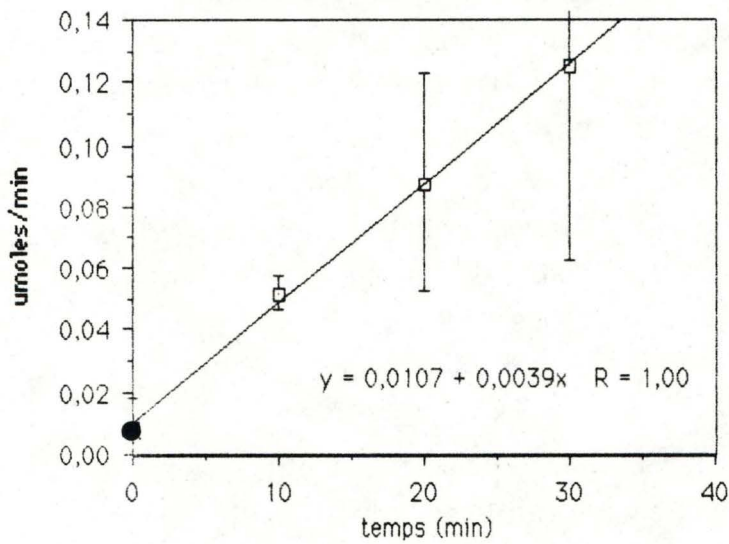
Le substrat glycyl-arginine-naphtylamide est fortement chargé à pH 5 et ne traverse donc pas la membrane lysosomale, ce qui en fait un bon substrat pour les mesures d'activités libres et la mise en évidence de l'intégrité de la membrane lysosomale.

La cathepsine C sera donc choisie de préférence à la β -galactosidase pour servir d'enzyme de référence des lysosomes.

Cytochrome oxydase - Rat (n=1)



Dipeptidylpeptidase IV - Rat (n= 3)



Phosphodiesterase alcaline - Rat (n=3)

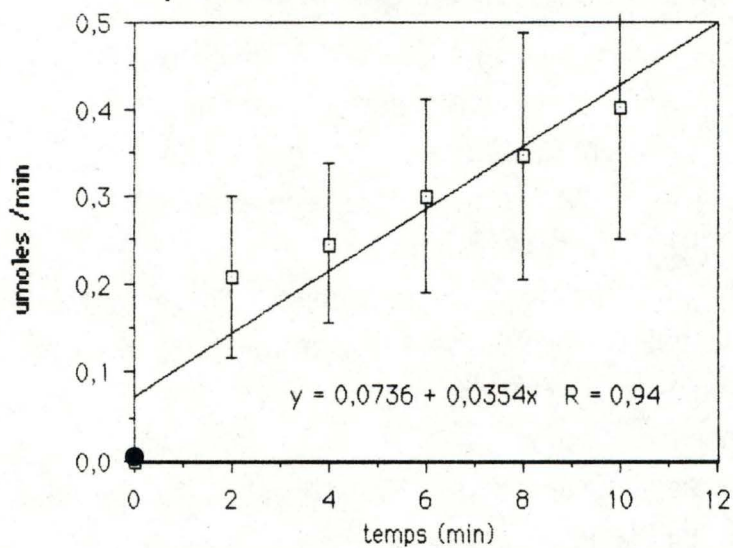


Figure 15 Calcul des droites de régression des dosages de cytochrome oxydase, dipeptidylpeptidase IV et phosphodiesterase alcaline de veine cave inférieure de rat. Les blancs mesurés sont indiqués par un rond plein. Le nombre d'échantillons constitués chacun de 8 à 10 veines caves inférieures de rat est indiqué entre parenthèses.

d) La cytochrome oxydase.

Pour la cytochrome oxydase (enzyme de référence de la membrane mitochondriale interne), le blanc est théoriquement de 0, ainsi que nous l'avons décrit plus haut et on remarque que l'ordonnée à l'origine est proche de 0. On peut cependant reprocher l'absence de points dans la première partie de la droite. En effet, on court le risque de passer à côté de certains points qui pourraient modifier le profil de celle-ci. De plus, une seule expérience a été réalisée.

La veine étant riche en cellules musculaires contenant elles-mêmes des mitochondries en abondance, il est normal que la cytochrome oxydase soit bien représentée.

La cytochrome oxydase est une enzyme de référence adéquate en ce qui concerne les mitochondries.

e) La dipeptidylpeptidase IV.

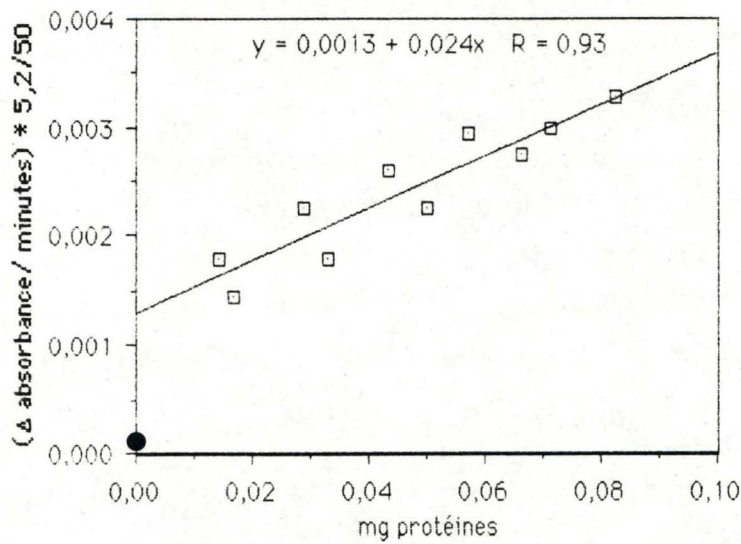
Dans le cas de la veine cave inférieure de rat, l'activité par mg de protéines est faible. La sensibilité de la mesure est acceptable. On observe que la concordance entre blancs calculés (0.0107) et blancs mesurés (0.0090 ± 0.0009) est excellente. Les écarts-types sont importants, ce qui traduit une nette différence d'activité spécifique d'un échantillon à l'autre.

On peut se demander s'il ne serait pas préférable de se tourner vers une autre enzyme pour servir de marqueur pour la membrane plasmique.

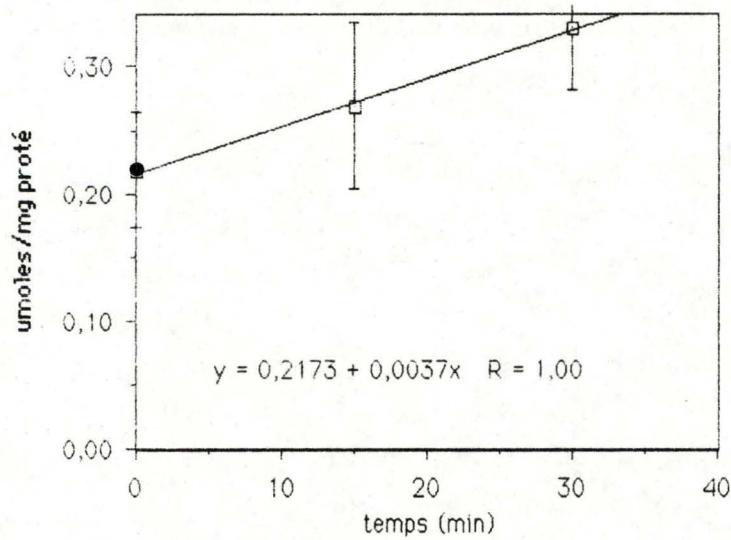
f) La phosphodiesterase alcaline.

La phosphodiesterase alcaline est une autre enzyme de référence de la membrane plasmique. La précision est du même ordre de grandeur que pour la dipeptidylpeptidase IV. On remarque également que le blanc mesuré (0.0025 ± 0.004) est plus faible que le blanc calculé (0,0736). Comment expliquer ce résultat? La mesure du blanc se fait en incubant le substrat pendant une durée correspondante à celle du test. Après avoir ajouté le fixateur, l'enzyme est rajouté. Dans ce cas, on ne tient pas compte des modifications subies par la préparation enzymatique à 37°C. Les lectures du test et du blanc se font à 400 nm et pourraient donc, en ce qui concerne les blancs mesurés, ne pas tenir compte des composés solubilisés pendant l'incubation et qui absorbent à cette longueur d'onde. Ceci expliquerait la différence d'activité observée par les deux méthodes de calcul.

Catalase - Rat (n = 2)



Glucose-6-phosphatase - Rat (n=3)



NADPH cytochrome c Réductase - Rat (n=3)

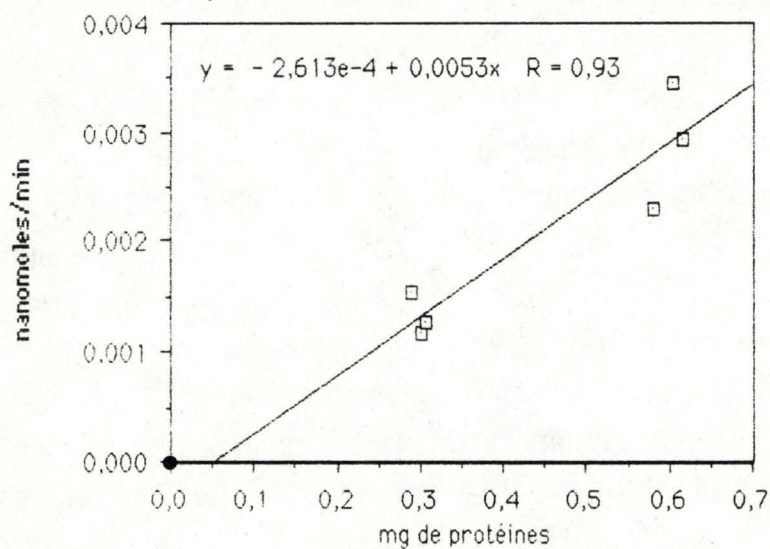


Figure 16 Calcul des droites de régression des dosages de catalase, glucose-6-phosphatase et NADPH cytochrome c réductase de veine cave inférieure de rat. Les blancs mesurés sont indiqués par un rond plein. Le nombre d'échantillons constitués chacun de 8 à 10 veines caves inférieures de rat est indiqué entre parenthèses.

La phosphodiesterase alcaline est une enzyme qui exige le zinc comme cofacteur. De ce fait, un contrôle doit être effectué lors du dosage de l'enzyme. En effet, une concentration en EDTA de $1 \mu\text{M}$ dans le milieu suffit à faire chuter le pourcentage d'activité de 100 à 16 dans la fraction microsomale [Beaufay *et al*, 1974]. C'est pourquoi il est nécessaire d'ajouter au milieu d'incubation de l'acétate de Zinc, qui a pour rôle de réactiver la phosphodiesterase alcaline.

La phosphodiesterase alcaline pourrait donc servir d'enzyme de référence pour la membrane plasmique, mais en veillant à assurer une activité maximale de l'enzyme par la présence de zinc.

g) La catalase.

L'analyse cinétique de la catalase en fonction de la quantité de protéines incubées montre une bonne précision de la mesure. Il persiste cependant une différence très réelle entre le blanc mesuré (0.00010 ± 0.00005) et le blanc calculé (0,00130). Nous n'avons pas pu en déceler la cause. Il est donc indispensable d'effectuer à chaque fois 2 ou 3 mesures au moins pour calculer la droite et le blanc correspondant. Cette restriction faite, la catalase peut être utilisée comme enzyme de référence pour la veine cave inférieure de rat.

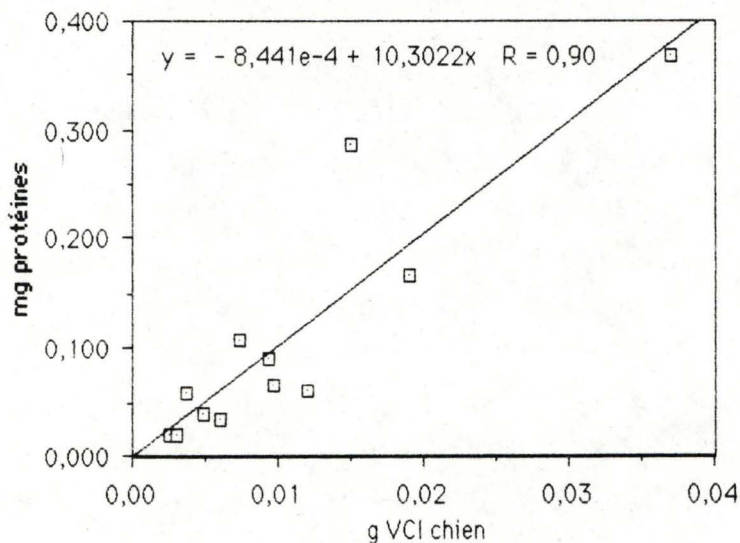
h) La glucose-6-phosphatase.

L'activité par mg de protéines pour la glucose-6-phosphatase semble assez importante mais au vu de la faible précision de la mesure, on devrait rejeter cette enzyme comme marqueur du réticulum endoplasmique en ce qui concerne la veine cave inférieure de rat, d'autant plus que l'activité néoglucogénique de cet organe est très faible.

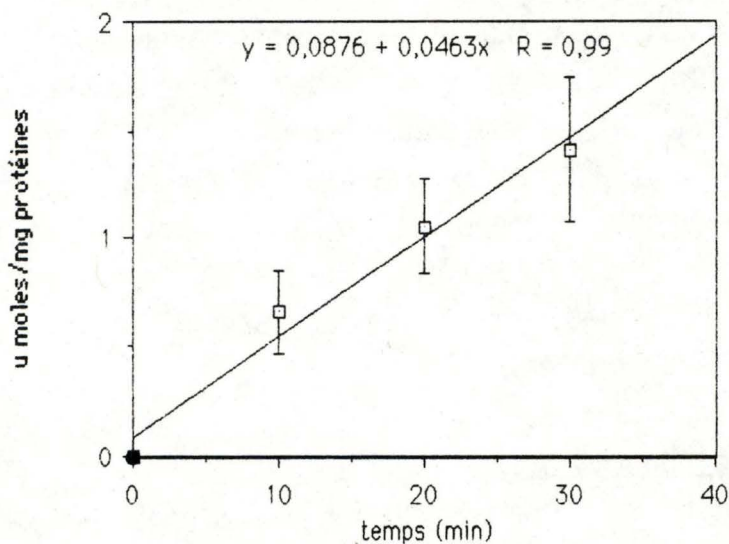
i) La NADPH cytochrome c réductase.

L'activité de cette enzyme est exprimée en nanomoles de cytochrome réduit/min et non en $\mu\text{moles/min}$ de cytochrome réduit. L'activité de cette deuxième enzyme généralement localisée dans le réticulum endoplasmique est donc très faible. Son estimation est cependant semblable par les deux méthodes de calcul, sur un homogénat de veine cave inférieure et la sensibilité de la mesure est grande. Cette enzyme pourra être déterminée lors d'expériences en centrifugation différentielle mais probablement pas isopycnique.

Protéines - Chien (n=4)



Cathepsine c - Chien (Fluorimétrie) (n=4)



Leucine aminopeptidase - Chien (n=4)

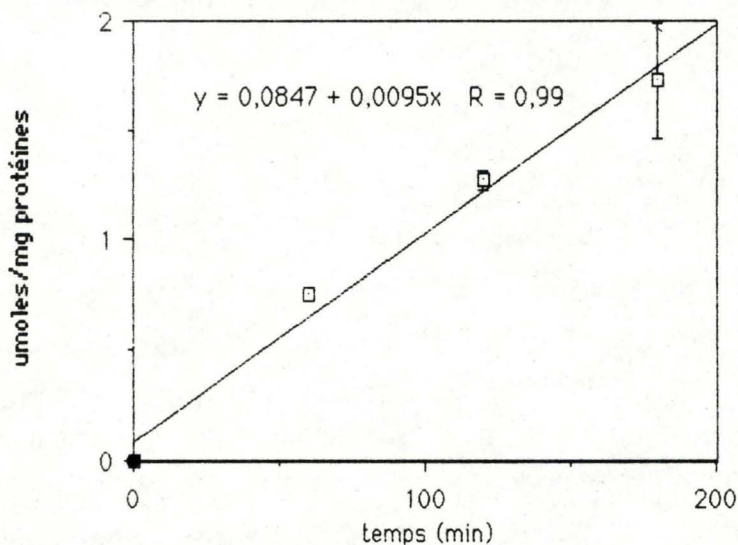


Figure 17. Calcul des droites de régression des dosages de protéines, cathepsine c et leucine naphtylamidase de veine cave inférieure de chien. Les blancs mesurés sont indiqués par un rond plein. Le nombre d'échantillons constitué chacun d'1 veine cave inférieure de chien est indiqué entre parenthèses.

3. Cinétique des enzymes marqueurs déterminées sur la VCI de chien. (Fig. 17 et 18, Tab. 11b et c, Tab. 12.)

Les veines caves inférieures de chien ont été utilisées en espérant pouvoir disposer de plus de matériel et éviter de ce fait de multiples prélèvements longs et sans doute nocifs à l'intégrité des organites subcellulaires.

a) Les protéines.

La dispersion des points est moins grande que dans le cas de l'analyse de la veine cave inférieure, ce qui se traduit par un coefficient de régression nettement plus grand (0.9 contre 0.7).

b) La cathepsine C.

La cathepsine C a été étudiée de la même manière que pour la veine cave inférieure de rat, c'est-à-dire après passage à l'ultraturax. Tout comme pour la VCI de rat, la veine cave inférieure de chien montre une activité par mg de protéines assez élevée. La précision de la méthode est satisfaisante (tableau 12).

On peut donc dire qu'en ce qui concerne la cathepsine C, la méthode de dosage par fluorimétrie est satisfaisante pour la veine cave inférieure de chien. Comme la sensibilité de la mesure est supérieure en fluorimétrie, celle-ci sera retenue de préférence à la mise en évidence colorimétrique de la naphtylamine libérée.

c) La leucine naphtylamidase.

La leucine naphtylamidase possède une activité par mg de protéines peu élevée. La précision de la méthode de dosage est faible par fluorimétrie (Tableau 12).

La leucine naphtylamidase ne pourra donc pas être utilisée ultérieurement comme enzyme marqueur de la membrane plasmique, du moins en ce qui concerne la veine cave inférieure de chien.

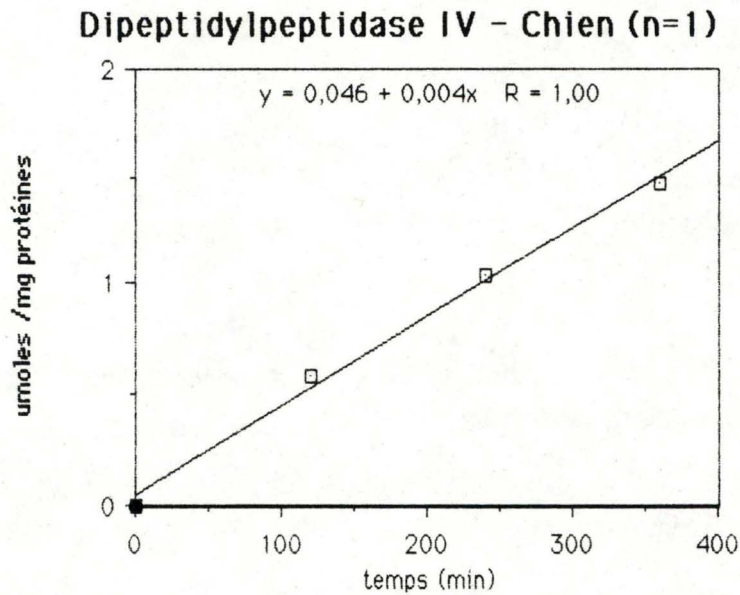
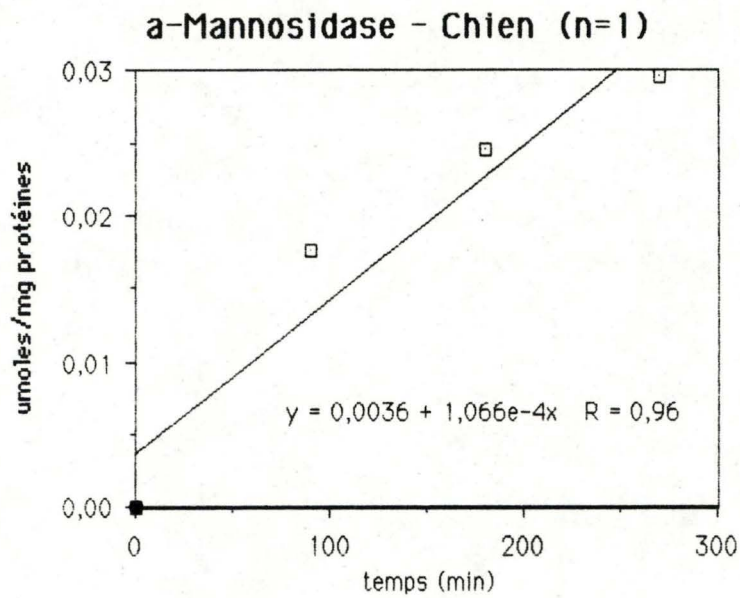


Figure 18 Calcul des droites de régression des dosages de l' α -mannosidase et de la dipeptidylpeptidase IV de veine cave inférieure de chien. Les blancs mesurés sont indiqués par un rond plein. Le nombre d'échantillons constitué chacun d'1 veine cave inférieure de chien est indiqué entre parenthèses. Dans ce cas particulier l'homogénéisation se fait au Kontès Loose après une digestion préalable à la collagénase (Les homogénats obtenus pour les Figures 14 à 17 s'obtiennent par homogénéisation à l'Ultraturrax).

d) L' α -mannosidase.

L' α -mannosidase a été étudiée après traitement de la veine cave inférieure de chien pendant deux heures à la collagénase, suivi d'une homogénéisation au Kontes type loose. La collagénase a été utilisée dans le but de dissocier les cellules de la paroi veineuse, afin de faciliter l'homogénéisation au Kontes loose. Cependant, dans ce cas, l'homogénat ne contient que 1.28 mg de protéines/g. Cette valeur, comparée à celle de 9.44 ± 4.49 obtenue lors de l'homogénéisation à l'ultraturrax dénote sans doute une libération réduite et peut être sélective de certains types cellulaires. Ceci explique en partie la faible précision de la mesure malgré une sensibilité élevée.

Il est à remarquer que le substrat utilisé, à savoir le méthyl umbelliferyl α -D-mannoside possède un résidu de nature relativement hydrophobe, ce qui empêchera son utilisation pour la mise en évidence d'une activité lysosomale latente.

e) La dipeptidylpeptidase IV.

La dipeptidylpeptidase IV a été étudiée de la même manière que l' α -mannosidase, c'est-à-dire après traitement de deux heures à la collagénase et une homogénéisation au Kontes type loose. Il faut remarquer qu'un seul prélèvement a été analysé. La sensibilité et la précision de la mesure pourraient être améliorée par dosage fluorimétrique.

3. Conclusions.

Les enzymes qui ont été retenues montrent, dans l'ensemble, une cinétique enzymatique linéaire (Fig. 14 à 18). Les blancs calculés et mesurés correspondent en général valablement. Les précisions des mesures sont très variables, ainsi que l'indique le tableau 12. Les sensibilités des mesures devraient être maximales par la mise en évidence des produits formés par fluorimétrie. Il y a cependant des restrictions à émettre : les dérivés umbelliferyls hydrophobes ne permettent pas de mettre en évidence une activité latente valable des enzymes lysosomales.

B. ACTIVITES ET ACTIVITES SPECIFIQUES DES ENZYMES DE LA VEINE CAVE INFERIEURE DE RAT.

1. Introduction.

La quantité d'enzyme contenue dans une solution donnée ou un extrait tissulaire peut être mesurée et exprimée par l'effet catalytique qu'elle produit. Pour cela, il est nécessaire:

- de connaître l'équation globale de la réaction catalysée;
- de posséder un procédé analytique qui mesure la disparition du substrat ou l'apparition des produits de la réaction;
- de savoir si l'enzyme nécessite des cofacteurs comme des ions métalliques ou des coenzymes;
- de préciser la dépendance de l'activité enzymatique par rapport à la concentration du substrat, c'est-à-dire le K_M pour le substrat;
- de connaître le pH optimal et la zone de température dans laquelle l'enzyme est stable et possède l'activité la plus élevée.

Par convention internationale, une unité d'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme provoquant la transformation d'une micromole de substrat par minute à 25°C dans des conditions optimales de mesures [Lehninger, 1982].

L'activité spécifique est le nombre d'unités enzymatiques par mg de protéines. Elle est une mesure de la pureté enzymatique : elle augmente au cours de la purification d'une enzyme et devient maximale et constante quand l'enzyme est pure.

2. Résultats et discussion.

Les résultats obtenus ici seront comparés avec les activités et les activités spécifiques de cellules musculaires lisses d'aorte de lapins [Peters et al., 1972] et de foie de rat (Tableau 11c).

Pour les déterminations des activités et des activités spécifiques, l'homogénéiseur mis en œuvre est l'ultraturrax. Cet homogénéiseur est extrêmement drastique et est à même de libérer un maximum d'enzymes. Dans le tableau 11c, nous avons retenu les valeurs d'activité et d'activité spécifique en tenant compte des blancs mesurés. En effet, l'activité n'a pas été déterminée d'après les droites de régression et donc des blancs

Tableau 11a. Activités et activités spécifiques des enzymes de veine cave inférieure de rat.

Enzyme	Activité (1)	Activité spécifique (1)	(2)
Protéines (n=9)	72,41 ± 57,87		
β-galactosidase(n=2)	72,7 ± 34,5	0,431 ± 0,107	0,304
Cathepsine c (n=3) (Colorimétrique)	1126 ± 794	24,5 ± 9,0	24,7
Cytochrome oxydase	13,020	0,180	
Peptidase IV (n=3)	438,6 ± 157,4	3,86 ± 1,36	3,9
Phosphodiesterase alcaline (n=3)	2199 ± 1157	59,87 ± 32,9	35,4
Catalase (n=2)	2222 ± 970	62,5 ± 27,2	24
Glucose-6-phosphatase (n=3)	443 ± 205	3,52 ± 0,815	3,7
NADPH cytochrome c réductase (n=2)	0,589 ± 0,269	0,00465 ± 0,00076	0,0053

Tableau 11b. Activités et activités spécifiques des enzymes de veine cave inférieure de chien.

Enzyme	Activité (1)	Activité spécifique (1)	(2)
Protéines (n=5)	9,442 ± 4,49		
Cathepsine c (n=4) (Fluorimétrique)	515 ± 250	55 ± 15,7	46
Leucine naphtylamidase	57,1 ± 8,0	10,9 ± 1,53	9,5

Tableau 11c. Activités et activités spécifiques comparées des enzymes de veine cave inférieure de rat, de foie de rat et cellules musculaires lisses de l'aorte de lapin.

	Foie de rat [1, de Duve <i>et al.</i> , 1955] [2, Gilbert, 1989] [3, Beaufay <i>et al.</i> , 1974]		Cellules musculaires lisses de l'aorte de lapin [Peters <i>et al.</i> , 1974]		Veine cave inférieure de rat [Nos résultats]			
	Activité	Activité spécifique	Activité	Activité spécifique	Activité	Activité spécifique	(3)	(4)
Protéines	241 [1]		2,27		72,41			
β-galactosidase	262,8 [1]	1,2	1,68	0,74	72,7	0,431	0,36	1,7
Cathepsine c	14820 [2]	61,5	3,3	1,48	1126	24,5	0,39	16,5
Cytochrome oxydase	33200 [1]	154	63	27,6	13,02	0,180	0,001	0,006
Peptidase IV	2190 [2]	10	-	-	438,6	3,86	0,39	
Phosphodiesterase alcaline	16210 [2]	74	-	-	2199	59,87	0,81	
Catalase	70800 [1]	293	6,4	2,81	2222	62,5	0,21	22,2
Glucose-6-phosphatase	28300 [1]	117	-	-	443	3,52	0,03	
NADPH cyt c réductase	3980 [3]	16,51	-	-	0,589	0,00465	0,0003	

Tableaux 11a, 11 b. et 11c. Les protéines sont exprimées en mg par g de tissu. Les activités enzymatiques en mUnités par g de tissu. Les Unités sont en micromoles/ min/ g de tissu pour tous les enzymes sauf pour la catalase et la cytochrome oxydase définies selon de Duve *et al.* (1955). Les activités spécifiques sont données en mUnités par mg de protéines. Le nombre d'expériences n est indiqué entre parenthèses.

(1) : L'activité et l'activité spécifique ont été calculées en tenant compte du blanc mesuré (voir texte).

(2) : L'activité spécifique dérive des droites de régression provenant des figures 14 à 18.

(3) : Rapports entre les activités spécifiques de VCI de rats et de foie de rats.

(4) : Rapports entre les activités spécifiques de VCI de rats et de cellules musculaires lisses d'aorte de lapin.

calculés. Nous ne discuterons ici que des activités spécifiques. Les différences qui se marquent au niveau des activités sont tributaires du contenu en protéines, lui même très différent pour les différents échantillons analysés. Pour simplifier les comparaisons, nous avons calculé au tableau 11c les rapports des activités spécifiques entre la veine cave inférieure de rat et le foie de rat (3), et entre la veine cave inférieure de rat et les cellules musculaires lisses de l'aorte de lapin (4).

a) Les protéines.

La quantité de protéines par gramme de veine cave inférieure de rat est nettement plus faible que pour le foie de rat. Ceci pourrait résulter du fait que le tissu conjonctif est très riche en protéoglycans fortement hydratés.

La faible valeur de protéines dans les cellules musculaires de l'aorte de lapin peut s'expliquer par le fait qu'elle est exprimée en fonction du poids total de l'aorte, négligeant les autres composants cellulaires non libérés au cours de la digestion enzymatique préalable.

b) La β -galactosidase.

La β -galactosidase est une enzyme de type hydrolase localisée dans les lysosomes et active à pH 3.6. *In vivo*, elle coupe essentiellement les liaisons entre un galactose et une N acétyl glucosamine appartenant à une glycoprotéine de type complexe. *In vitro*, le substrat utilisé est le para nitrophényl β -D-galactoside.

On remarque que l'activité spécifique de la β -galactosidase dans la veine cave inférieure de rat est du même ordre de grandeur que dans le foie de rat et dans les cellules musculaires lisses de l'aorte de lapin. L'activité spécifique retrouvée dans la veine cave inférieure de rat semble également être un peu plus élevée que celle du foie humain (0,420) [Seymour & Peters, 1976]. Comparativement aux autres organes ou tissus, la β -galactosidase ne semble donc pas avoir une activité spécifique différente par rapport à l'aorte de lapin ou le foie de rat. Cela semble en accord avec la localisation ubiquiste de l'enzyme proposée par Dixon et Webb en 1979.

c) La cathepsine C.

La cathepsine C est une enzyme hydrolytique agissant à pH acide et qui est caractéristique des lysosomes. *In vivo*, elle coupe les liaisons

Tableau 12. Synthèse des paramètres des droites représentées aux Fig. 14 à 18.

	Ordonnée à l'origine (1)	Coefficient angulaire (2)	Rapport (1)/(2)=(3)	Expression de l'abscisse	Etalon (4) Abs/μmole ou /mg
Veine Cave Inférieure de rat :					
Protéines	-0,0102	71,4225	0,000143	g de VCI	0,900 (albumine)
β-galactosidase	0,0414	0,000344	120	min	7,200 (para nitrophénol)
Cathepsine C	0,0866	0,0247	3,5	min	2500 (naphtylamine)
Cytochrome oxydase	0,0133	0,1164	0,11	μl d'homogénat	19500 (cytochrome C)
Dipeptidyl peptidase IV	0,0107	0,0039	2,74	min	2500 (naphtylamine)
Phosphodiesterase alcaline	0,0736	0,0354	2,07	min	7,200 (para nitrophénol)
Catalase	0,0013	0,024	0,054	mg prot	0,120 (H ₂ O ₂)
Glucose-6-phosphatase	0,2173	0,0037	58,7	min	0,720 (phosphate)
NADPH cytochrome C réductase	-0,0002613	0,0053	0,049	mg prot	19500 (cytochrome C)
Veine Cave Inférieure de chien :					
Protéines	-0,000844	10,3022	0,000082	g de VCI	0,900 (albumine)
Cathepsine C	0,0876	0,0463	1,89	min	5100(naphtylamine)
Leucine naphtylamidase	0,0847	0,0095	8,9	min	5100 (naphtylamine)
α-mannosidase	0,0036	0,0001066	33,8	min	69750 (méthyl umbellyferone)
Dipeptidyl peptidase IV	0,046	0,0004	11,5	min	5100 (naphtylamine)

Tableau 12 : tableau reprenant les paramètres des droites représentées aux Fig. 14 à 18.

Toutes les mesures se font par colorimétrie pour les veines caves inférieures de rats et par fluorimétrie pour les veines caves inférieures de chien, à l'exception du dosage de protéines. Le spectrofluorimètre SLM Aminco SPF 500 est réglé sur un gain de 10 et une tension de 750 volts.

(1) : L'ordonnée à l'origine équivaut au blanc calculé.

(2) : Le coefficient angulaire équivaut à l'activité spécifique pour les enzymes, à l'exception de la cytochrome oxydase.

(3) : Rapport entre (1) et (2). Au plus ce rapport est petit, au plus grande sera la précision de la mesure et vice versa, toute autre chose étant égale par ailleurs.

(4) : La sensibilité de la mesure sera d'autant plus grande que la valeur de l'étalon est élevée.

calculés. Nous ne discuterons ici que des activités spécifiques. Les différences qui se marquent au niveau des activités sont tributaires du contenu en protéines, lui même très différent pour les différents échantillons analysés. Pour simplifier les comparaisons, nous avons calculé au tableau 11c les rapports des activités spécifiques entre la veine cave inférieure de rat et le foie de rat (3), et entre la veine cave inférieure de rat et les cellules musculaires lisses de l'aorte de lapin (4).

a) Les protéines.

La quantité de protéines par gramme de veine cave inférieure de rat est nettement plus faible que pour le foie de rat. Ceci pourrait résulter du fait que le tissu conjonctif est très riche en protéoglycans fortement hydratés.

La faible valeur de protéines dans les cellules musculaires de l'aorte de lapin peut s'expliquer par le fait qu'elle est exprimée en fonction du poids total de l'aorte, négligeant les autres composants cellulaires non libérés au cours de la digestion enzymatique préalable.

b) La β -galactosidase.

La β -galactosidase est une enzyme de type hydrolase localisée dans les lysosomes et active à pH 3.6. *In vivo*, elle coupe essentiellement les liaisons entre un galactose et une N acétyl glucosamine appartenant à une glycoprotéine de type complexe. *In vitro*, le substrat utilisé est le para nitrophényl β -D-galactoside.

On remarque que l'activité spécifique de la β -galactosidase dans la veine cave inférieure de rat est du même ordre de grandeur que dans le foie de rat et dans les cellules musculaires lisses de l'aorte de lapin. L'activité spécifique retrouvée dans la veine cave inférieure de rat semble également être un peu plus élevée que celle du foie humain (0,420) [Seymour & Peters, 1976]. Comparativement aux autres organes ou tissus, la β -galactosidase ne semble donc pas avoir une activité spécifique différente par rapport à l'aorte de lapin ou le foie de rat. Cela semble en accord avec la localisation ubiquiste de l'enzyme proposée par Dixon et Webb en 1979.

c) La cathepsine C.

La cathepsine C est une enzyme hydrolytique agissant à pH acide et qui est caractéristique des lysosomes. *In vivo*, elle coupe les liaisons

Tableau 12. Synthèse des paramètres des droites représentées aux Fig. 14 à 18.

	Ordonnée à l'origine (1)	Coefficient angulaire (2)	Rapport (1)/(2)=(3)	Expression de l'abscisse	Etalon (4) Abs/μmole ou /mg
<u>VCI de rat :</u>					
Protéines	-0,0102	71,4225	0,000143	g de VCI	0,900 (albumine)
β-galactosidase	0,0414	0,000344	120	min	7,200 (para nitrophénol)
Cathepsine C (colorim.)	0,0866	0,0247	3,5	min	2500 (naphtylamine)
Cytochrome oxydase	0,0133	0,1164	0,11	μl d'homogénat	19500 (cytochrome C)
Dipeptidyl peptidase IV	0,0107	0,0039	2,74	min	2500 (naphtylamine)
Phosphodiesterase alcaline	0,0736	0,0354	2,07	min	7,200 (para nitrophénol)
Catalase	0,0013	0,024	0,054	mg prot	0,120 (H ₂ O ₂)
Glucose-6-phosphatase	0,2173	0,0037	58,7	min	0,720 (phosphate)
NADPH cytochrome C réductase	-0,0002613	0,0053	0,049	mg prot	19500 (cytochrome C)

VCI de chien :

Protéines	-0,000844	10,3022	0,000082	g de VCI	0,900 (albumine)
Cathepsine C (fluorim.)	0,0876	0,0463	1,89	min	5240 (naphtylamine)
Leucine naphtylamidase	0,0847	0,0095	8,9	min	27813 (naphtylamine)
α-mannosidase	0,0036	0,0001066	33,8	min	69750 (naphtylamine)
Dipeptidyl peptidase IV	0,046	0,0004	11,5	min	4960 (naphtylamine)

Tableau 12 : tableau reprenant les paramètres des droites représentées aux Fig. 14 à 18.

(1) : L'ordonnée à l'origine équivaut au blanc calculé.

(2) : Le coefficient angulaire équivaut à l'activité spécifique pour les enzymes, à l'exception de la cytochrome oxydase.

(3) : Rapport entre (1) et (2). Au plus ce rapport est petit, au plus grande sera la précision de la mesure et vice versa.

(4) : La sensibilité de la mesure sera d'autant plus grande que la valeur de l'étalon est élevée.

Tableau 12. Synthèse des paramètres des droites représentées aux Fig. 14 à 18.

	Ordonnée à l'origine (1)	Coefficient angulaire (2)	Rapport (1)/(2)=(3)	Expression de l'abscisse	Etalon (4) Abs/μmole ou /mg
Veine Cave Inférieure de rat :					
Protéines	-0,0102	71,4225	0,000143	g de VCI	0,900 (albumine)
β-galactosidase	0,0414	0,000344	120	min	7,200 (para nitrophéno)
Cathepsine C	0,0866	0,0247	3,5	min	2500 (naphtylamine)
Cytochrome oxydase	0,0133	0,1164	0,11	μl d'homogénat	19500 (cytochrome C)
Dipeptidyl peptidase IV	0,0107	0,0039	2,74	min	2500 (naphtylamine)
Phosphodiesterase alcaline	0,0736	0,0354	2,07	min	7,200 (para nitrophéno)
Catalase	0,0013	0,024	0,054	mg prot	0,120 (H ₂ O ₂)
Glucose-6-phosphatase	0,2173	0,0037	58,7	min	0,720 (phosphate)
NADPH cytochrome C réductase	-0,0002613	0,0053	0,049	mg prot	19500 (cytochrome C)
Veine Cave Inférieure de chien :					
Protéines	-0,000844	10,3022	0,000082	g de VCI	0,900 (albumine)
Cathepsine C	0,0876	0,0463	1,89	min	5100(naphtylamine)
Leucine naphtylamidase	0,0847	0,0095	8,9	min	5100 (naphtylamine)
α-mannosidase	0,0036	0,0001066	33,8	min	69750 (méthyl umbellyferone)
Dipeptidyl peptidase IV	0,046	0,0004	11,5	min	5100 (naphtylamine)

Tableau 12 : tableau reprenant les paramètres des droites représentées aux Fig. 14 à 18.

Toutes les mesures se font par colorimétrie pour les veines caves inférieures de rats et par fluorimétrie pour les veines caves inférieures de chien, à l'exception du dosage de protéines. Le spectrofluorimètre SLM Aminco SPF 500 est réglé sur un gain de 10 et une tension de 750 volts.

(1) : L'ordonnée à l'origine équivaut au blanc calculé.

(2) : Le coefficient angulaire équivaut à l'activité spécifique pour les enzymes, à l'exception de la cytochrome oxydase.

(3) : Rapport entre (1) et (2). Au plus ce rapport est petit, au plus grande sera la précision de la mesure et vice versa, toute autre chose étant égale par ailleurs.

(4) : La sensibilité de la mesure sera d'autant plus grande que la valeur de l'étalon est élevée.

peptidiques des protéines. *In vitro*, nous avons utilisé comme substrat artificiel la glycine-arginine-naphtylamide (GAN). La naphtylamine, qui est un des produits d'hydrolyse, est quantifiée par dosage colorimétrique ou fluorimétrique.

En ce qui concerne les activités spécifiques de l'enzyme dans les trois organes, on constate qu'elle est du même ordre de grandeur dans la veine cave inférieure et dans le foie de rat mais par contre 16 fois plus élevée dans la veine cave inférieure de rat que dans les cellules musculaires lisses de l'aorte de lapin.

Une remarque s'impose quant à la valeur de l'activité spécifique calculée (Tableau 11a). La quantité de protéines dans les prélèvements concernant la cathepsine C était très faible (25, 29, 55 mg de protéines/g de veine cave inférieure) alors qu'inversément, elle était élevée dans les prélèvements pour lesquels la β -galactosidase a été étudiée (122 et 195 mg de protéines/g de veine cave inférieure).

En résumé, le choix que nous avons fait pour les enzymes des lysosomes s'avère adéquat : la β -galactosidase et la cathepsine C montrent une activité spécifique élevée, avec comme restriction la faible sensibilité de la mesure.

d) La cytochrome oxydase.

La cytochrome oxydase est une enzyme localisée dans la membrane interne des mitochondries. *In vivo*, elle a pour rôle de transférer quatre électrons d'une molécule de cytochrome c vers une molécule d'oxygène.

On constate que l'activité spécifique de l'enzyme dans la veine cave inférieure de rat est très faible par rapport au foie de rat ou aux cellules musculaires lisses de l'aorte de lapin. Elle est cependant explicable si l'on tient compte de la présence de cellules musculaires lisses riches en mitochondries dans la veine.

e) La dipeptidyl peptidase IV.

La dipeptidylpeptidase IV est une enzyme hydrolytique active à pH alcalin, localisée dans la membrane plasmique. *In vivo*, elle coupe une liaison peptidique en éliminant à l'extrémité N-terminale un dipeptide. *In vitro*, le substrat utilisé est la glycine-proline-naphtylamide qui, sous l'action de l'enzyme, libère une naphtylamine aisément identifiable.

L'activité spécifique de l'enzyme dans la veine cave inférieure est comparable à celle de l'enzyme hépatique. Il a été supposé que la cible de la peptidase IV serait des hormones peptidiques circulantes. Cependant, cette notion est erronée [Kenny, 1986]. En effet, cette enzyme est largement répandue et est très peu spécifique. Si un rôle précis doit lui être dévolu, il n'est pas encore connu actuellement.

f) La phosphodiesterase alcaline.

La phosphodiesterase alcaline est localisée dans la membrane plasmique. *In vivo*, elle coupe les liaisons phosphodiesters. Son rôle physiologique de même que son organisation moléculaire sont mal connus. Il existe une phosphodiesterase très spécifique dont le substrat est le phosphatidyl inositol 4,5 biphosphate. Ce dernier intervient dans la transmission des signaux externes qui aboutissent à la formation de IP3 et de diacylglycérol, et donc au contrôle de la concentration intracellulaire en Ca^{++} et l'activation de la protéine kinase C.

L'activité spécifique de l'enzyme est du même ordre de grandeur dans la veine cave inférieure et le foie. Cette enzyme est donc un bon marqueur de la membrane plasmique de la veine cave inférieure de rat, relativement plus active que la dipeptidylpeptidase IV.

g) La catalase.

La catalase est une enzyme localisée dans les peroxysomes. Elle a pour rôle essentiel de détoxifier la cellule de l'eau oxygénée produite par les réactions d'oxydation qui se déroulent dans les peroxysomes. Lors de l'hypoxie consécutive à la stase veineuse, il semble que la xanthine oxydase produise également de l' H_2O_2 [Fisher, 1988].

D'après Dixon et Webb [1979], la catalase est largement répandue dans l'organisme. Au vu des résultats obtenus ici, l'activité spécifique de l'enzyme est nettement plus importante dans la veine cave inférieure que dans les cellules musculaires lisses. Par contre, l'activité spécifique de l'enzyme dans la veine cave inférieure n'est que 4 à 5 fois plus faible que dans le foie de rat. Ceci pourrait souligner l'importance de cette enzyme dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène.

h) La glucose-6-phosphatase.

La glucose-6-phosphatase est une enzyme clé dans la gluconéogenèse. La gluconéogenèse est particulièrement élevée dans le foie et le rein; par contre, elle est très faible dans le cœur, le cerveau et les muscles squelettiques. L'activité spécifique de l'enzyme dans la veine cave inférieure est 30 fois plus faible que dans le foie de rat mais on pourrait suspecter l'intervention d'une autre enzyme à action peu spécifique. Dans ce cas cependant, l'action de la phosphatase acide est à exclure. En effet, le dosage s'effectue en présence de tartrate sodico-potassique qui inhibe totalement la phosphatase acide.

En tout état de cause, cette enzyme n'est probablement pas un bon marqueur du réticulum endoplasmique.

i) La NADPH cytochrome c réductase.

La NADPH cytochrome c réductase est une enzyme du réticulum endoplasmique impliquée dans l'hydroxylation d'un grand nombre de substrats naturels différents dont les stéroïdes [Lehninger, 1982], les acides gras, le squalène et certains acides aminés. Il provoque également l'hydroxylation de médicaments.

L'accepteur normal est le cytochrome P 450. Ce mécanisme se déroule normalement dans le foie.

On constate que l'activité spécifique de cette enzyme est très faible dans la veine cave inférieure par rapport au foie de rat, ce qui est logique en fonction du rôle de l'enzyme.

En conclusion, il serait intéressant d'évaluer l'activité d'autres enzymes associées au réticulum endoplasmique, comme l' α -glucosidase par exemple. En effet, les deux cas examinés ici montrent une activité extrêmement réduite.

3. Conclusions.

Nous constatons à partir des résultats obtenus que les activités spécifiques de veine cave inférieure de rat sont soit du même ordre de grandeur (pour la β -galactosidase, la cathepsine C, la dipeptidylpeptidase IV et la phosphodiesterase alcaline), soit inférieures (pour la cytochrome oxydase, la catalase, la glucose-6-phosphatase et la NADPH cytochrome c réductase) à celles obtenues pour le foie de rat. Il faut rappeler que ces

mesures ont été effectuées sur des homogénats obtenus à l'ultraturrax. De ce fait, on obtient des homogénats présentant une activité enzymatique maximale car ils contiennent un maximum de tissu veineux.

II. HOMOGENEISATION ET FRACTIONNEMENT SUBCELLULAIRE DE VCI DE RAT.

A. HOMOGENEISATION.

1. Introduction.

a) Définition

L'objectif de l'homogénéisation est de transformer un tissu en une suspension homogène de composants subcellulaires [Wattiaux, 1970]. Ce processus précède le fractionnement subcellulaire par centrifugation, sauf dans de rares cas où la centrifugation est effectuée sur des cellules intactes.

b) Milieux d'homogénéisation.

L'homogénéisation doit s'effectuer dans un milieu choisi de telle manière que les propriétés biochimiques et morphologiques des organites soient préservées. Pour ce faire, quatre facteurs doivent être pris en compte [Wattiaux, 1970] :

- **la tonicité** : généralement, un milieu isoosmotique est recommandé. En effet, des particules telles que les mitochondries ou les lysosomes sont altérées dans des solutions hypotoniques ou hypertoniques.

- **le pH** : un changement de pH dans l'homogénat est fréquemment observé peu de temps après la rupture des cellules. Un léger tamponnage du milieu aux alentours de pH 7 est donc souvent indiqué.

- **la force ionique** : en général, des substances non chargées sont recommandées. Dans certains cas en effet, on peut observer une agglutination de particules quand le milieu contient des solutés chargés.

- **la présence de substances protectrices** : dans certains cas, l'addition de substances spécifiques au milieu d'homogénéisation est nécessaire pour protéger une activité ou une structure particulièrement labile.

c) Les homogénéiseurs.

Dans la plupart des homogénéiseurs, la rupture des cellules est produite par des forces de cisaillement. Le procédé le plus simple consiste à écraser le tissu à l'aide d'un pilon dans un mortier contenant du sable ou

tout autre substance abrasive. Cette approche est utilisée pour faire éclater des microorganismes mais ne convient pas pour la rupture des cellules animales.

Dans les procédés utilisés habituellement pour les tissus animaux, les fragments de tissu sont forcés à travers un espace annulaire par des mouvements de va-et-vient d'un piston. Divers types d'homogénéiseurs sont ainsi disponibles. Nombreux sont ceux qui sont dérivés des appareils de Potter et Elvehjem. Ils consistent en un piston de Teflon pouvant se déplacer dans un tube de verre calibré. Généralement, ce piston est mû par un moteur tournant à 1800 RPM.

L'homogénéiseur de Dounce est aussi fréquemment utilisé. Ici, le piston se termine par une boule et est abaissé et remonté manuellement dans un tube de verre calibré. Il existe des pistons lâches (loose) et serrés (tight). L'efficacité de tels systèmes dépend principalement de l'espace disponible entre le piston et la paroi de verre.

D'autres systèmes d'homogénéisation utilisent des lames tournantes. La puissance de rupture de ces appareils est considérable mais elle aboutit à de sévères altérations des organites subcellulaires. L'ultraturrax est un exemple d'un tel homogénéiseur.

Il existe de nombreux autres processus de rupture de cellules : ultrasons, traitement hypotonique, congélation-décongélation,... Ces procédés sont employés quand les lames ou les homogénéiseurs coaxiaux se sont révélés inefficaces. Malheureusement, ils ne respectent généralement pas l'intégrité des organites.

Dans certains cas où l'homogénéisation s'avère particulièrement difficile, le tissu est préalablement traité par des enzymes protéolytiques (collagénase ou pronase par exemple) afin de dissocier les cellules présentes, qui seront recueillies par centrifugation et soumises ensuite à un type d'homogénéisation comme décrit plus haut et à la centrifugation différentielle.

L'homogénéisation requiert donc une désintégration adéquate des cellules en même temps qu'une bonne préservation des organites subcellulaires.

2. Résultats et discussion.

Dans le but d'obtenir des lysosomes intacts, nous avons tenté d'homogénéiser des veines caves inférieures de rats en utilisant divers procédés. L'efficacité de chacune de ces homogénéisations a été testée en déterminant l'activité libre et l'activité totale de la cathepsine C.

a) Homogénéisation au Potter.

D'entrée de jeu, l'homogénéiseur de Potter a dû être écarté. En effet, les morceaux de veine de 1 à 2 mm de côté s'agglomèrent en un amas fibreux adhérant au piston ou restent confinés dans le fond du tube de verre. De ce fait, il est impossible de faire passer le tissu entre la paroi et le piston. La veine ne subit donc aucune homogénéisation et ce procédé a dû être rapidement éliminé.

b) Homogénéisation au Dounce.

L'homogénéiseur de Potter s'étant avéré inutilisable, nous nous sommes tournés vers un homogénéiseur de type Dounce. Voici le schéma expérimental suivi :

- l'activité maximale de la cathepsine C est estimée sur des veines caves inférieures de rat passées à l'ultraturax. Nous avons vu plus haut que ce type d'homogénéisation est très destructeur. Les membranes en général, et la membrane lysosomale en particulier, éclatent et il n'existe donc pas de latence enzymatique par ce procédé. Cependant cette technique permet de déterminer les activités enzymatiques maximales.

- l'activité libre AL est estimée après avoir homogénéisé les veines caves inférieures de rat dans du saccharose 0.25 M tamponné avec de l'imidazole 3mM pH 7.4, en suivant le schéma suivant :

- 8 passages au Dounce loose
- 4 passages au Dounce tight
- 4 passages au Dounce tight

Entre chaque séquence d'homogénéisation, on procède à une centrifugation à 1500 RPM pendant 10 minutes et on récupère le surnageant.

- l'activité totale AT est estimée en utilisant le même processus d'homogénéisation que ci-dessus mais le dosage de la cathepsine C se fait en présence de Triton 0.1%.

Les résultats obtenus sont repris ci-dessous :

*) 100, 200, 300 et 400 μ l d'homogénat sont incubés pendant 10 minutes à 37°C. Les activités libres AL et les activités totales AT de la cathepsine C sont mesurées au spectrofluorimètre.

μ l	AL(fluorescence)	AT(fluorescence)	AL/AT (%)
100	26	25	104
200	43	50	86
300	86	89	97
400	92	128	72

*) 200 μ l d'homogénat sont incubés pendant 5', 10', 20' et 30' à 37°C. Les activités libres AL et les activités totales AT sont lues au spectrofluorimètre.

temps (min)	AL(fluorescence)	AT(fluorescence)	AL/AT (%)
5	18	23	78
10	43	55	78
20	98	120	82
30	150	182	82

(l'activité maximale, obtenue après homogénéisation à l'ultraturrax, est environ 10 fois plus élevée que l'activité totale, obtenue après homogénéisation au Dounce

On voit donc que le Dounce semble peu approprié pour homogénéiser les veines caves inférieures de rat de manière à obtenir des lysosomes intacts et en quantité appréciable. Les causes en sont multiples. La nature de l'homogénéiseur est certainement en cause. Il faut aussi mentionner le temps assez long entre le prélèvement des veines caves et le début de l'incubation. En effet, une dizaine de VCI de rats sont nécessaires pour atteindre une quantité d'homogénat raisonnable. Or, il faut de 3 à 4 minutes pour prélever une veine dans des conditions optimales. De plus, chaque veine doit être débarrassée des graisses et mésentère, puis pesée et découpée. 80 minutes sont ainsi nécessaires entre le premier prélèvement et le début de l'incubation. Durant ces 80 minutes, la membrane lysosomale commence à s'altérer malgré le maintien dans la glace.

Lors de l'homogénéisation proprement dite, on s'aperçoit que les morceaux de VCI ont tendance à s'agglomérer en un amas fibreux rendant difficile le passage du piston.

On doit donc également écarter ce procédé d'homogénéisation.

c) Homogénéisation au Kontes.

L'homogénéiseur de Dounce s'étant révélé peu satisfaisant, nous avons opté pour un homogénéiseur de type Kontes (Kontes Glass Co., Vineland, NJ, USA), qui est un Dounce de taille réduite et dont le piston a une forme différente. Nous avons ainsi préparé des fractions ML et P suivant le processus de fractionnement subcellulaire mentionné au chapitre 2. Sur les fractions ML et P ainsi préparées, nous avons dosé les activités libre et totale de la cathepsine C de la même manière que lors des homogénéisations au Dounce.

Dans un premier temps, les résultats furent peu convaincants : pour la fraction ML, le rapport entre l'activité libre et l'activité totale AL/AT était de 86%. Ce même rapport atteignait 111% pour la fraction P.

Par après, nous avons tenté d'améliorer le procédé en veillant particulièrement à réduire le temps entre le prélèvement et l'incubation en maintenant constamment les fractions dans la glace et en homogénéisant un nombre réduit de veines caves inférieures à la fois. Nous sommes finalement arrivés à montrer un rapport AL/AT égal à 17,6% pour la cathepsine C de la fraction ML ainsi préparée. Pour la fraction P, ce rapport atteignait 120%.

Nous voyons donc que par ce procédé, il est possible d'obtenir une fraction ML à activité lysosomale masquée.

d) Homogénéisation après incubation à la collagénase.

L'homogénéisation au Kontes loose s'étant avérée possible, nous avons tenté d'améliorer le procédé en pré-incubant des morceaux de veines caves inférieures de chien dans la collagénase pendant deux heures. Cette collagénase pouvait faciliter l'homogénéisation en dissociant les cellules de la paroi veineuse. Cependant, les résultats obtenus (p. 37) montrent une faible teneur en protéines (1.28 mg de protéines/g de VCI contre 9.44 mg de protéines/g de VCI), ce qui dénote probablement une libération réduite et peut être sélective de certains types tissulaires. Ceci permettrait d'expliquer partiellement la faible précision de la mesure.

Ce procédé ne nous donnant pas satisfaction, nous l'avons écarté au profit d'une utilisation du Kontes sans pré-incubation à la collagénase.

3. Conclusions.

Les homogénéiseurs de type Potter et Douce doivent être écartés. En effet, au vu des résultats obtenus, il nous a semblé vain de vouloir tenter de montrer l'existence d'une latence enzymatique lysosomale en suivant ces deux voies.

Par contre, nous avons montré qu'il était possible de mettre en évidence l'existence d'une telle latence au moyen d'un homogénéiseur de type Kontes loose. Il existe malgré tout de nombreux problèmes à surmonter :

- un temps assez long entre le prélèvement et la mesure de l'activité latente, induit par la nécessité de prélever une dizaine de veines;
- une homogénéisation rendue plus difficile de par la texture du tissu. Les résistances rencontrées au cours de l'homogénéisation peuvent conduire à la rupture du Kontes. Pour pallier à cet inconvénient, l'homogénéisation peut se faire par groupe de cinq ou six veines mais cela augmente encore le temps entre le prélèvement et le début de l'incubation.

En tout état de cause, cette étape est extrêmement délicate et il est indispensable de la contrôler minutieusement afin de pouvoir mettre en évidence un masquage des enzymes lysosomales qui prouve l'intégrité de la membrane de cet organite.

B. FRACTIONNEMENT SUBCELLULAIRE DE VEINES CAVES INFÉRIEURES DE RATS.

1. Introduction.

Plusieurs fractionnements ont été effectués mais seulement trois se sont révélés utilisables. En effet, les difficultés rencontrées lors de l'homogénéisation des veines ont entraîné la rupture de plusieurs Kontes. Les fractions qui étaient récoltées malgré tout montraient une distribution enzymatique erratique, ce qui a entraîné leur mise à l'écart.

Tableau 13. Comparaison des distributions enzymatiques pour le foie de rat et la veine cave inférieure de rat après fractionnement subcellulaire.

Enzymes	Foie de rat (Beaufay et al., 1974)				Veine cave inférieure de rat			
	N	ML	P	S	N	ML	P	S
Protéines (n=36)	18,42±4,15	22,77±4,45	18,82±1,82	39,98±3,14	35,3 35 27,7	10,3 13,9 2,0	2,5 5,3 0,4	52,1 45,4 69,8
Cytochrome oxydase (n=34)	22,32±6,41	73,04±6,74	4,64±2,21	-	23,69 22,7 47,66	67,3 58,15 27,37	8,91 19,07 24,97	- - -
Phosphatase acide (n=31)	12,6±6,41	50,1±8,23	17,39	19,89±4,69	-	-	-	-
Cathepsine C	-	-	-	-	3,4 2,44 35,26	17,8 20,81 29,58	2,85 3,9 20,62	75,9 72,84 14,52
alpha- mannosidase	-	-	-	-	20,1 - 45	48,2 - 25,57	5,33 - 17,63	26,4 - 11,73
Catalase (n=32)	9,12±2,9	46,73±6,63	5,91±2,69	38,24±5,28	3,63 5,03 11,09	31,9 30,81 15,29	3,53 4,71 2,92	61 59,4 70,69
NADPH cyt C réductase (n=13)	12,06±2,79	11,07±3,69	66±6,7	11,06±4,39	17,6 25,8 20,66	30,9 27,45 14,13	19,7 25,75 23,34	31,7 20,97 41,8

Tableau 13 : Afin d'éviter les erreurs introduites par une récupération trop faible ou trop élevée, les résultats sont exprimés en pourcentage corrigé, ce qui correspond au pourcentage d'activité dans une fraction par rapport à la somme des activités observées pour chacune des fractions.

Pour le foie de rat, le nombre de mesure est indiqué par n. Pour la veine cave inférieure de rat, 2 ou 3 mesures ont été effectuées. Elles sont toujours reprises dans le même ordre : les deux premières lignes correspondent aux fractionnement obtenu au moyen du Kontes loose n° 1, représentés aux Fig. 19 et 20; la dernière correspond au fractionnement obtenu au moyen du Kontes loose n°2, représenté aux Fig. 21 et 22.

Trois fractionnements seulement ont donc pu être analysés; deux ont montré des distributions enzymatiques voisines et sont discutés en détail. Il est à remarquer que ces deux fractionnements ont été réalisés lorsque la technique de fractionnement a été parfaitement mise au point.

Le troisième fractionnement mentionné, obtenu lors de la mise au point de la technique, montre des profils enzymatiques qui diffèrent sensiblement des deux autres. Nous nous y attarderons en fin de discussion.

2. Résultats et discussion. (Fig. 19 à 22; Tab. 13)

Les distributions obtenues lors des fractionnements de veines caves inférieures de rat seront mises en parallèle avec celles décrites par Beaufay *et al.* en 1974 sur foie de rat.

Il est à remarquer que dans la plupart des dosages, le pourcentage de récupération est compris entre 85 et 110%. Cependant, afin d'éviter les erreurs introduites par une récupération excessivement faible ou excessivement élevée, tous les résultats ont été recalculés en pourcentage corrigé, qui correspond au pourcentage d'activité dans une fraction par rapport à la somme des activités observées pour chacune des fractions.

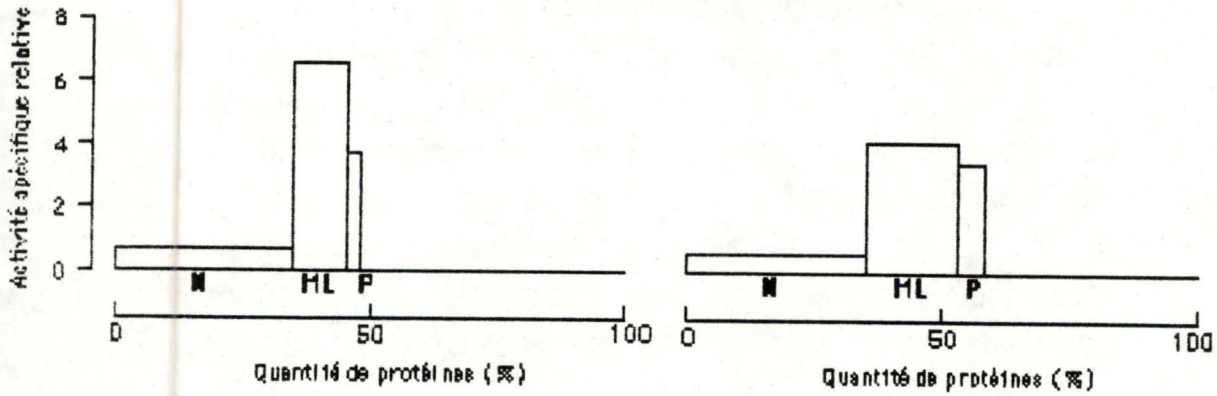
a) La cytochrome oxydase.

La cytochrome oxydase est l'enzyme terminale de la chaîne respiratoire, localisée dans la membrane interne des mitochondries. Elle est composée de 7 chaînes polypeptidiques différentes formant un dimère dont le PM est proche de 250 000 Daltons. La cytochrome oxydase a pour fonction de catalyser la réaction de transfert de 4 électrons provenant d'une molécule de cytochrome C vers une molécule d'oxygène, pour former deux molécules d'eau.

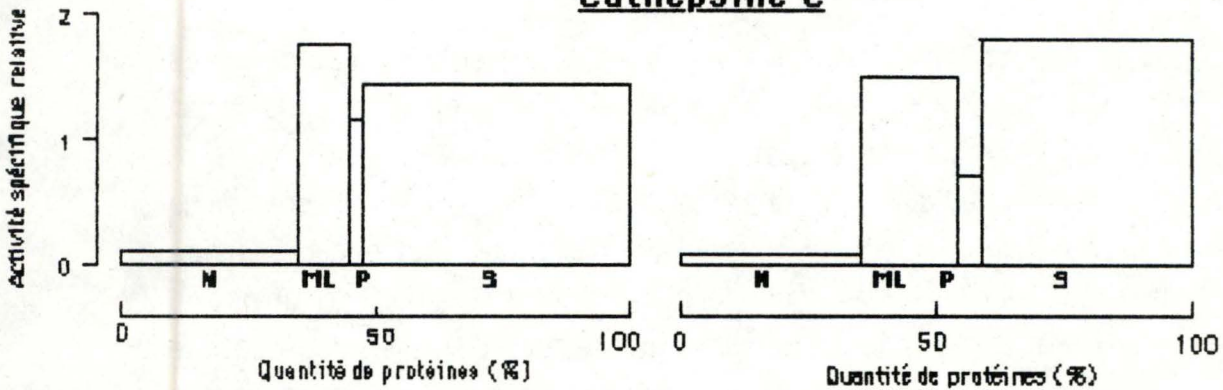
Etant localisée dans la mitochondrie, la cytochrome oxydase pourrait donc nous servir comme référence des mitochondries pour des fractionnements subcellulaires ultérieurs si les résultats obtenus sont satisfaisants.

Le profil que nous avons obtenu pour la veine cave inférieure de rat se rapproche fortement de celui observé pour le foie de rat. On remarque un pourcentage atteignant $62.7 \pm 6.5\%$ pour la fraction ML, ce qui traduit la proportion importante de mitochondries dans cette fraction. Le

Cytochrome oxydase



Cathepsine C



Alpha-Mannosidase

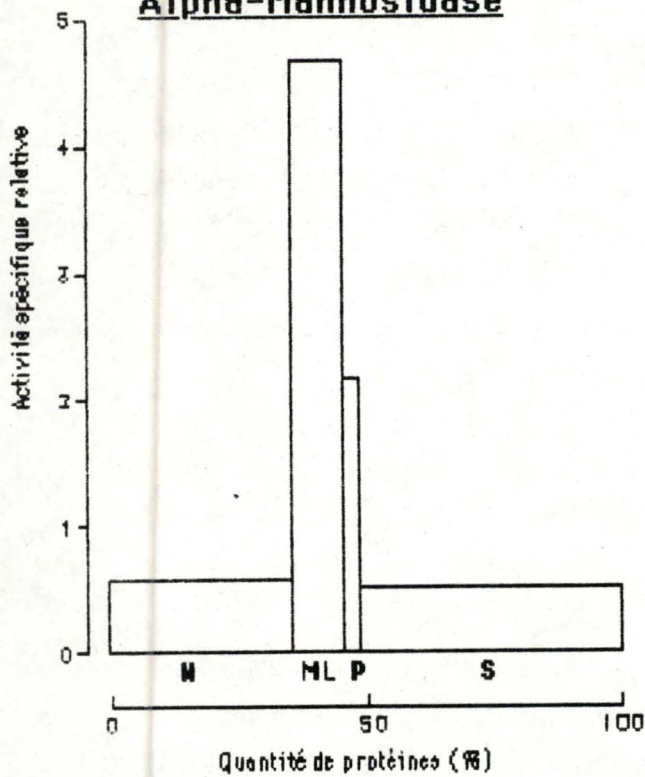


Figure 19. Fractionnements de veine cave inférieure de rat. Profil de distribution de la cytochrome oxydase, de la cathepsine C et de l' α -mannosidase. L'ordonnée exprime l'activité spécifique relative (% de l'activité récupérée dans la fraction/% de protéines récupérées dans la fraction). En abscisse est exprimé le contenu relatif en protéines (cumulé de gauche à droite). L'homogénéisation se fait au Kontes loose.

pourcentage observé pour la fraction N est généralement très proche de celui obtenu dans le cas de foie de rat. Il n'en va pas de même pour la fraction P, où le pourcentage est nettement plus élevé ($14.0 \pm 7.2\%$ contre $4.6 \pm 2.2\%$). Ces résultats peuvent se comprendre si on admet une contamination de la fraction P lors du fractionnement. On pourrait également supposer l'existence de mitochondries plus petites qui se retrouveraient dans la fraction P. Dès lors, la vitesse de centrifugation ou le temps utilisés pour obtenir la fraction ML ne seraient plus adaptés.

L'activité spécifique relative est maximale dans la fraction ML et est un peu plus élevée que celle obtenue pour le foie de rat.

Le profil de distribution de la cytochrome oxydase se rapproche assez de celui qu'on obtient pour le foie de rat. Le même schéma de fractionnement peut donc être appliqué, du moins en ce qui concerne la préparation d'une fraction ML enrichie et purifiée en mitochondries.

b) La cathepsine C.

Comme nous l'avons vu plus haut, la cathepsine C est une enzyme hydrolytique agissant à pH acide et se trouvant localisée à l'intérieur des lysosomes.

Cette enzyme n'est pas reprise dans l'étude de Beaufay *et al.* de 1974 mais on peut cependant la comparer à une autre enzyme lysosomale, la phosphatase acide.

Le pourcentage le plus important se retrouve dans la fraction S, ce qui semble assez surprenant. Cette distribution peut cependant s'expliquer si elle rend compte d'une solubilisation partielle de la cathepsine C. En effet, compte tenu de la difficulté de l'homogénéisation, on peut parfaitement admettre une solubilisation partielle de la cathepsine C. Une autre partie resterait probablement à l'intérieur de lysosomes intacts, ce qui expliquerait un pourcentage atteignant $19.05 \pm 2.1\%$ dans la fraction ML. Mais ce pourcentage est faible par rapport à celui de la phosphatase acide ($50.1 \pm 8.2\%$).

D'autres explications pourraient être avancées. D'une part, on peut supposer la présence de lysosomes de tailles différentes. Il existerait ainsi des lysosomes plus gros que d'autres et donc plus sensibles à l'homogénéisation, et d'autres, plus petits, qui le seraient moins. Ces deux populations de lysosomes seraient soit localisées dans un même type cellulaire, soit localisées dans des types cellulaires distincts.

D'autre part, on peut également avancer l'hypothèse d'une localisation de la cathepsine C à la fois dans et en dehors des lysosomes.

Quand aux activités spécifiques relatives de la ML, elles restent en delà des valeurs observées pour la phosphatase acide et sont même, dans un des cas, inférieures à celles obtenues pour le surnageant.

Le profil de distribution de la cathepsine C diffère donc sensiblement du profil qu'on serait en droit d'attendre pour une enzyme lysosomale type telle que la phosphatase acide. Les causes n'en sont pas connues et nécessiteraient un examen plus approfondi.

c) L' α -mannosidase.

Tout comme la cathepsine C, l' α -mannosidase est une enzyme hydrolytique agissant à pH acide et localisée dans les lysosomes.

A l'opposé de la cathepsine C, le profil retrouvé de l' α -mannosidase se rapproche beaucoup plus du profil type des enzymes lysosomales. En effet, il est caractérisé par un pourcentage important au niveau de la fraction ML (48.2%), ce qui confirme la localisation lysosomale de l' α -mannosidase de la veine cave inférieure. Le pourcentage assez faible dans la fraction S par rapport à celui trouvé pour la cathepsine C pourrait faire penser à l'existence de lysosomes plus petits qui résisteraient bien à l'homogénéisation, ou encore à une localisation cellulaire multiple.

Au niveau de la purification, on observe une ASR de l' α -mannosidase approchant 5 dans la fraction ML de veine cave inférieure de rat, ce qui est deux fois plus élevé que l'ASR de la phosphatase acide dans la ML de foie de rat.

Le profil général quant à lui reproduit fidèlement celui attendu pour les enzymes lysosomales telle la phosphatase acide. On peut cependant faire quelques remarques pour cette enzyme. En effet, un seul dosage seulement a pu être effectué pour l' α -mannosidase. En effet, le substrat est très instable et facilement hydrolysé, ce qui nous a empêché d'effectuer le dosage sur le deuxième fractionnement. Le profil obtenu doit donc être confirmé. De plus, d'autres enzymes lysosomales pourraient faire l'objet d'une expérimentation semblable, afin d'affiner les résultats obtenus en ce qui concerne les lysosomes.

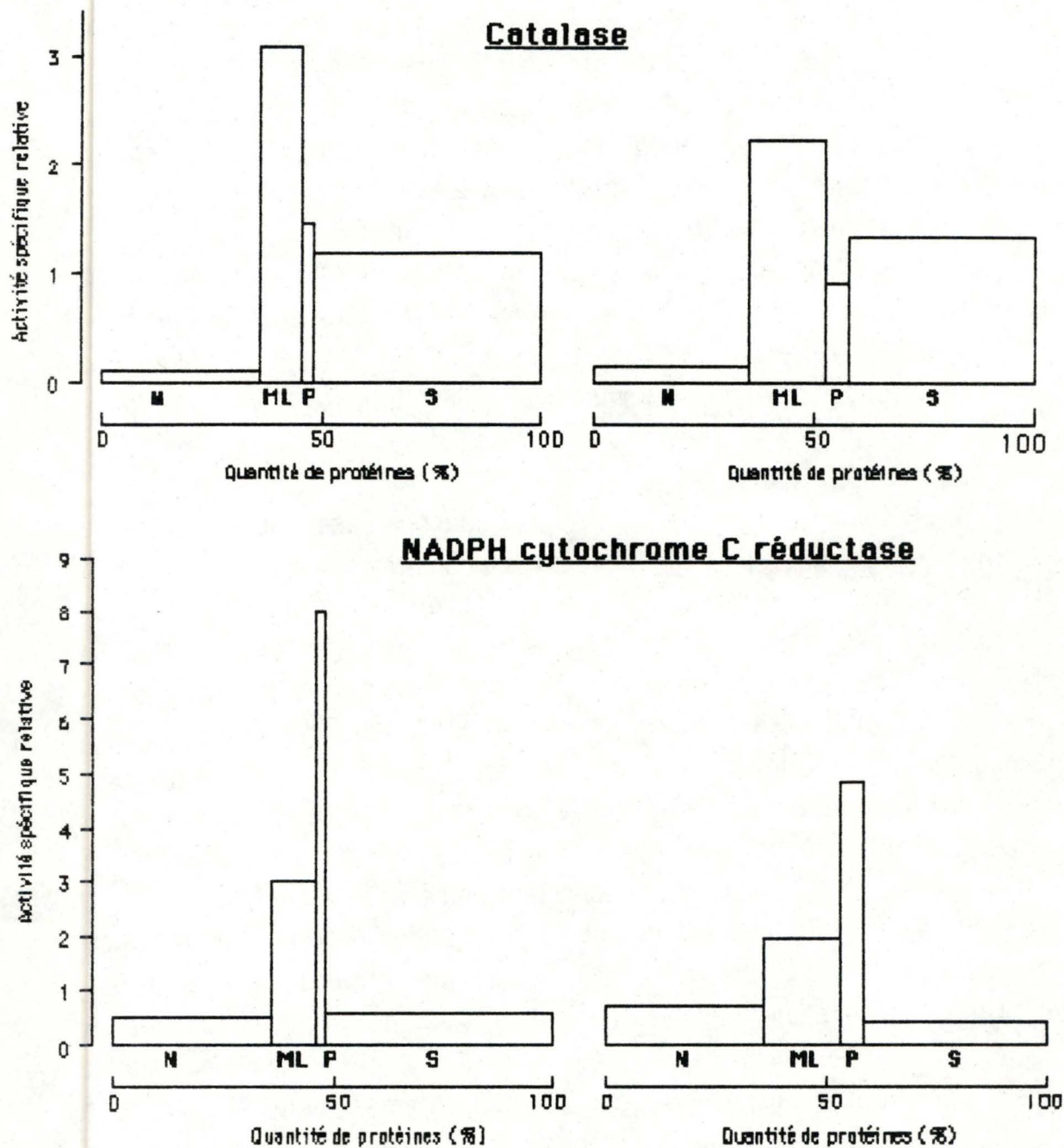


Figure 20. Fractionnements de veine cave inférieure de rat. Profil de distribution de la catalase et de la NADPH cytochrome C réductase. L'ordonnée exprime l'activité spécifique relative (% de l'activité récupérée dans la fraction/% de protéines récupérées dans la fraction). En abscisse est exprimé le contenu relatif en protéines (cumulé de gauche à droite). L'homogénéisation se fait au Kontes loose.

d) La catalase.

Comme nous l'avons vu plus haut, la catalase est une enzyme localisée dans les peroxysomes. Sa fonction principale est de neutraliser l' H_2O_2 produit par les réactions d'oxydation se déroulant dans ces peroxysomes.

Le pourcentage corrigé de la fraction ML s'approche de celui observé pour le foie de rat (31.35 contre $45.1 \pm 6.4\%$). Par contre, le pourcentage observé dans la fraction S est nettement plus élevé ($60.2 \pm 1.1\%$ contre $38.2 \pm 5.3\%$), ce qui traduit une localisation beaucoup plus importante dans la fraction S et peut être dans le cytoplasme pour la veine cave inférieure.

L'activité spécifique relative est la plus élevée dans la fraction ML, ce qui traduit la purification de l'enzyme dans cette fraction. Le profil de distribution obtenu est bien celui d'une enzyme peroxysomale.

La distribution bimodale de la catalase peut aisément s'expliquer si on tient compte du fait que cette enzyme est synthétisée dans les ribosomes libres du cytoplasme pour ensuite être acheminée vers les peroxysomes. La fraction S renferme les éléments non sédimentables; toute la catalase non intégrée aux peroxysomes et donc en formation au niveau des ribosomes libres dans le cytoplasme va s'y retrouver.

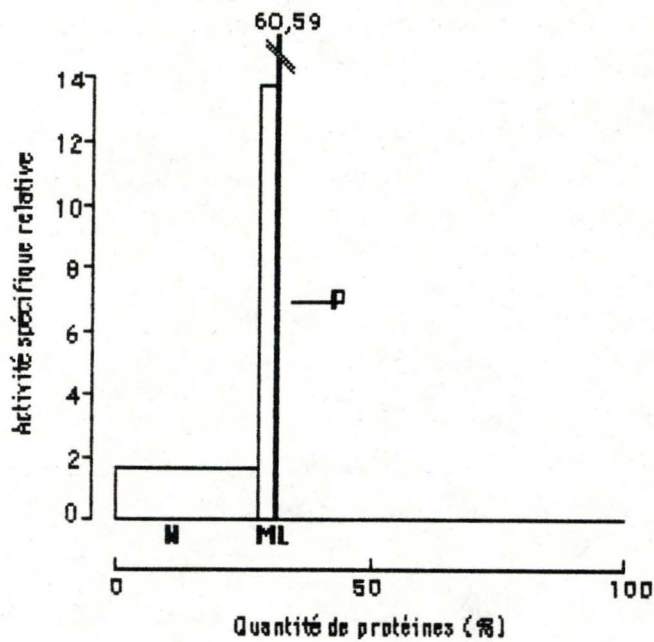
e) La NADPH cytochrome c réductase.

Comme mentionné précédemment, la NADPH cytochrome c réductase est une enzyme localisée dans le réticulum endoplasmique, intervenant dans l'hydroxylation d'un grand nombre de substrats.

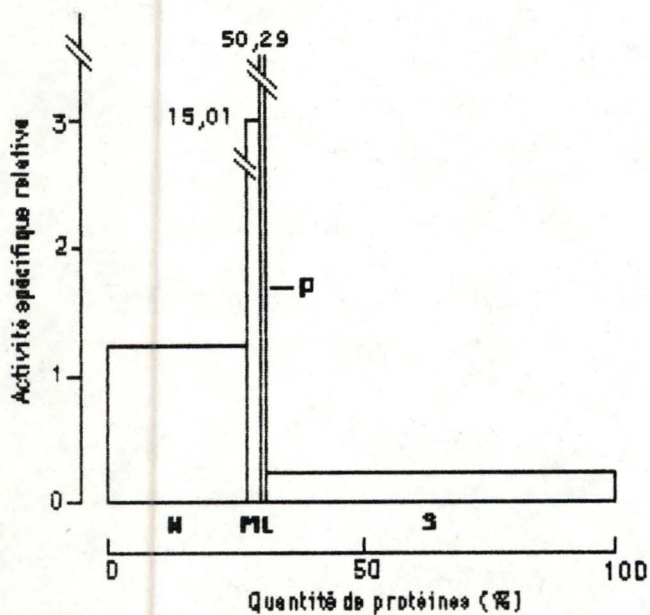
Avec un pourcentage corrigé de $22.7 \pm 4.3\%$ dans la fraction P, la NADPH cytochrome c réductase se distingue du foie de rat dans lequel on retrouve jusqu'à $66 \pm 6.7\%$ au niveau de cette même fraction P. Par contre, le pourcentage dans la fraction ML est plus élevé ($29.7 \pm 3.1\%$ contre $11.1 \pm 3.7\%$).

Beaufay *et al.* [1974] ont discuté de la localisation bimodale de cette enzyme. Dans le foie de rat, elle appartient pour 4% environ aux mitochondries et 96% au réticulum endoplasmique. Le tissu de la veine cave inférieure est évidemment très différent et rien ne permet dans ce cas de préjuger de l'appartenance de l'enzyme préférentiellement à l'un ou l'autre de ces organites.

Cytochrome oxydase



Cathepsine C



Alpha-Mannosidase

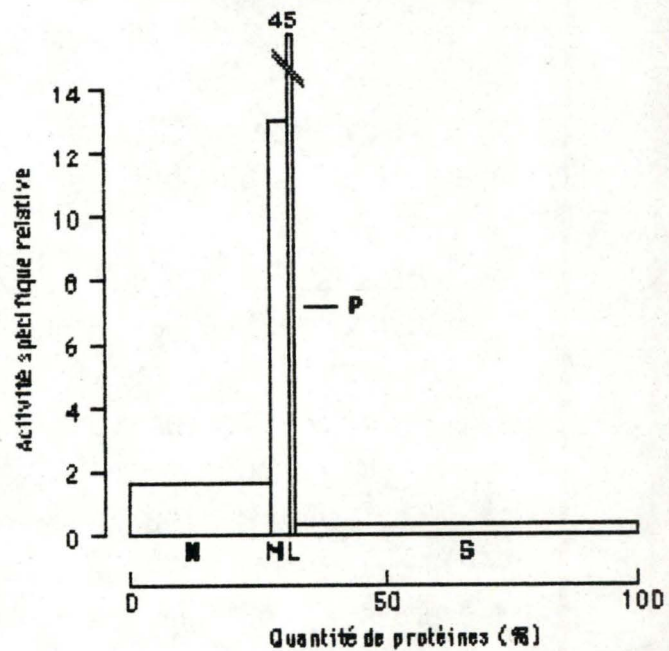


Figure 21. Fractionnement de veine cave inférieure de rat. Profil de distribution de la cytochrome oxydase, de la cathepsine C et de l' α -mannosidase. L'ordonnée exprime l'activité spécifique relative (% de l'activité récupérée dans la fraction/% de protéines récupérées dans la fraction). En abscisse est exprimé le contenu relatif en protéines (cumulé de gauche à droite). L'homogénéisation se fait au Kontes loose.

Remarque

Un troisième fractionnement est représenté aux Fig.21 et 22 et au Tab. 13. Il a été obtenu au moyen d'un deuxième exemplaire de Kontes loose de même type que celui utilisé pour les fractionnements précédents, l'exemplaire étant utilisé au cours de ceux-ci s'étant brisé. Ce troisième fractionnement se distingue des deux autres par la quantité de protéines extrêmement faible retrouvée dans les fractions ML et P et très élevée retrouvée dans la fraction S. Ceci met donc bien en évidence les différences individuelles entre Kontes de même type. Mais il faut remarquer que ni les lysosomes (identifiés à partir de la cathepsine C et de l' α -mannosidase), ni les peroxysomes (identifiés à partir de la catalase), ni le réticulum endoplasmique (identifié à partir de la NADPH cytochrome C réductase) ou les mitochondries (identifiées à partir de la cytochrome oxydase) n'ont été préférentiellement lésés au cours de l'homogénéisation, ce qui est mis en exergue par le pourcentage important des différentes enzymes retrouvées dans les fractions sédimentables.

Le pourcentage important de protéines retrouvé dans la fraction soluble pourrait être dû à un élément étranger à la veine cave inférieure de rat. En effet, la quantité de protéines dans ce troisième fractionnement est de 63,87 mg/g de veine cave inférieure alors que dans les deux autres, elle est respectivement de 18,77 et de 9,97 mg/g de VCI, ce qui se rapproche des valeurs obtenues au tableau 11a. L'origine de ce surplus de protéines solubles ne nous est pas connue mais son abondance dans la fraction S se répercute au niveau des fractions ML et P qui sont relativement pauvres en protéines. Cela entraîne des activités spécifiques relatives très élevées, reprises dans les Fig. 21 et 22.

3. Conclusions.

Nous voyons que le fractionnement subcellulaire de veines caves inférieures de rat est possible en utilisant le Kontes loose. Cependant, l'homogénéisation reste délicate et nécessite une attention continue et une grande prudence dans la réalisation. De plus, des homogénéiseurs légèrement différents peuvent amener des résultats qui varient fortement l'un par rapport à l'autre. Enfin, si les profils et les valeurs d'activité spécifique relative semblent convenables pour certaines enzymes telle que

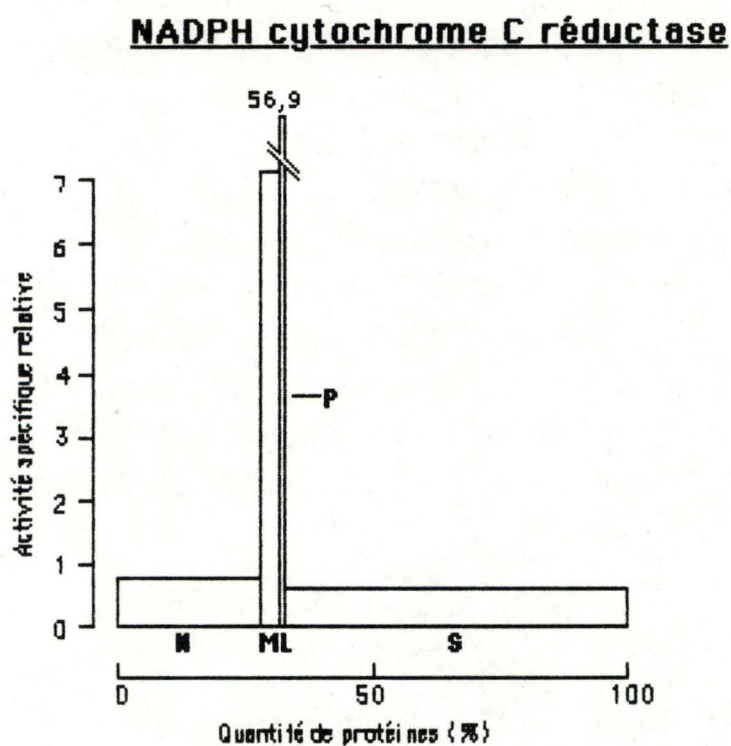
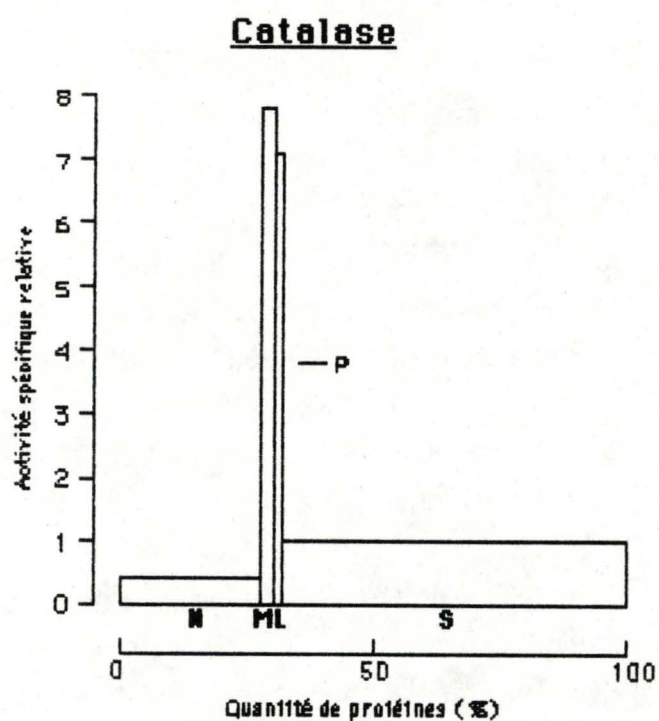


Figure 22. Fractionnement de veine cave inférieure de rat. Profil de distribution de la catalase et de la NADPH cytochrome C réductase. L'ordonnée exprime l'activité spécifique relative (% de l'activité récupérée dans la fraction/% de protéines récupérées dans la fraction). En abscisse est exprimé le contenu relatif en protéines (cumulé de gauche à droite). L'homogénéisation se fait au Kontes loose.

la cytochrome oxydase par exemple, des travaux complémentaires devraient être effectués pour affiner ou confirmer les premiers résultats obtenus.

Tableau 14. Activation des lysosomes par les radicaux libres

Milieu	AL	AT	AL/AT(%)
(1) Témoin	29	73	39.7
(2) X	33	131	25.2
(3) X0	51	86	59.3
(4) X/X0	68	66	103
(5) X/X0/ Fe/ADP	57	63	90.5
(6) Fe/ADP	38	52	73

Tableau 14 : L'effet de l'altération de la membrane des lysosomes par les radicaux libres s'observe en mesurant l'activité libre de la cathepsine C et en la rapportant à l'activité totale. (X=Xanthine, X0=Xanthine Oxydase)

III. ACTION DES RADICAUX LIBRES SUR LA LATENCE DES ENZYMES LYSOSOMALES.

A. INTRODUCTION.

Nous avons vu plus haut que les radicaux libres produits par la cellule pouvaient s'attaquer aux lipides membranaires. Sous l'effet de la peroxydation qu'ils subissent, ces lipides ne seraient plus à même d'assurer l'intégrité membranaire, ce qui entraînerait une fuite des composants cellulaires.

Nous avons également vu précédemment que dans l'hypoxie survenant lors de la maladie veineuse, il y avait production de radicaux libres. Ces radicaux libres pourraient s'attaquer à la membrane des lysosomes, ce qui expliquerait l'augmentation des taux sériques d'enzymes lysosomales.

Nous nous sommes donc attaché à montrer le comportement de la membrane des lysosomes lors de la production de radicaux libres. Pour ce faire, nous avons incubé une fraction ML enrichie en lysosomes dans des milieux de compositions différentes, pouvant amener ou non la production de radicaux libres.

B. RESULTATS ET DISCUSSION.

Les résultats d'une seule expérience sont rassemblés dans le tableau 14.

Rem. Une deuxième expérience a été effectuée mais aucune latence lysosomale n'a pu être observée.

Que conclure de ces résultats?

1. On voit une activation des lysosomes dans le milieu contenant la xanthine oxydase seule par rapport au milieu témoin (59.3% contre 39.7%). Or, la xanthine oxydase seule ne produit pas de radicaux superoxydes. On peut donc supposer une contamination de l'enzyme, peut être par des protéases.

2. Dans le milieu contenant la xanthine et la xanthine oxydase, on observe une activation importante (103%), plus élevée que celle retrouvée dans le milieu contenant la xanthine seule (25.2%) ou la xanthine oxydase seule (59.3%). Or, les radicaux superoxydes et le peroxyde d'hydrogène sont les seuls dérivés de l'oxygène produits quand la xanthine est en présence de

xanthine oxydase. On pourrait donc penser que le peroxyde d'hydrogène et, dans une moindre mesure, les radicaux superoxydes, pourrait déjà causer des dégâts importants à la membrane. En effet, le milieu d'incubation utilisé est à pH 8 et la xanthine oxydase devrait donc, d'après Fridovich [1985], produire préférentiellement H_2O_2 . Une autre explication possible serait la production de radicaux $OH\cdot$, malgré l'absence de fer exogène, dans le milieu contenant la xanthine et la xanthine oxydase. On pourrait supposer que les $O_2\cdot^-$ et H_2O_2 produits déplaceraient le fer de la ferritine lysosomale. Ce fer deviendrait ainsi disponible pour la production des $OH\cdot$. Mais toute la question est de savoir si la quantité de fer endogène est suffisante pour produire des $OH\cdot$ en quantité suffisante pour altérer la membrane lysosomale d'une manière importante.

3. Dans le milieu contenant la xanthine, la xanthine oxydase et le Fe/ADP, le rapport AL/AT est aussi de l'ordre de 100%. Dans ce cas, les lésions de la membrane seraient à imputer aux radicaux $OH\cdot$ issus de la réaction de Fenton.

4. Dans le milieu contenant du Fe/ADP seul, on constate un rapport AL/AT pour la cathepsine C de 73%. Les résultats observés doivent être interprétés avec la plus grande prudence. Certains auteurs pensent cependant que le Fe réagirait avec l'oxygène pour former des radicaux ferryles et perferryles, moins toxiques que les $OH\cdot$ mais pouvant malgré tout amener une certaine altération de la membrane.

C. CONCLUSIONS.

Ces résultats tout à fait préliminaires doivent être interprétés avec la plus extrême prudence. Cette manipulation doit impérativement être refaite si l'on veut confirmer les résultats observés. Mais il semble pour l'instant que, même en absence de fer exogène, les radicaux libres produits suffisent à altérer la membrane lysosomale. Des expériences complémentaires seraient nécessaires pour permettre de préciser la nature exacte de ces radicaux libres. De même, des recherches ultérieures devraient tenter d'élucider le problème posé par le Fe/ADP.

CONCLUSIONS GENERALES.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

La maladie veineuse est caractérisée, au niveau histologique, par une altération du tissu conjonctif de la média. Cette altération entraîne une perte d'élasticité des vaisseaux, accompagnée d'une incontinence valvulaire. On pense que les lysosomes des cellules endothéliales interviendraient dans cette altération du tissu conjonctif par la libération d'hydrolases acides.

Étant donné le peu d'informations disponibles au sujet des lysosomes de la paroi veineuse, nous avons débuté une étude biochimique, que nous avons voulu la plus large possible. Aussi y avons nous inclus la plupart des autres organites subcellulaires.

Dans un premier temps, nous nous sommes attachés à **mettre au point le dosage d'enzymes de référence** de ces organites subcellulaires. Ces travaux ont été effectués sur des veines caves inférieures de rat et de chien. Les cinétiques étudiées ont été examinées afin de trouver les conditions expérimentales optimales et en particulier l'intervalle pour lequel les vitesses mesurées sont proportionnelles au temps ou à la concentration en enzyme, ceci afin de permettre l'établissement des paramètres cinétiques. Nous nous sommes également attachés à vérifier la concordance entre les blancs mesurés directement et les blancs calculés indirectement à partir de l'ordonnée à l'origine des droites de régression obtenues. Ces concordances sont particulièrement importantes pour les organes dont les activités spécifiques sont faibles, ce qui est le cas de la veine cave inférieure. Nous avons ainsi montré que, dans l'ensemble, les enzymes étudiées montraient une cinétique enzymatique linéaire. Nous avons également constaté que les blancs mesurés et les blancs calculés correspondaient valablement en général. Il existe malgré tout des problèmes dans certains cas. Ainsi, lors du dosage de la catalase, il persiste une différence importante entre blancs mesurés et calculés. Dans ce cas, il est indispensable d'effectuer chaque fois 2 ou 3 mesures pour calculer la droite de régression et le blanc correspondant.

A partir des résultats obtenus, nous avons comparé les activités et les activités spécifiques de la veine cave inférieure de rat à celles du foie de rat. Ces activités spécifiques sont soit du même ordre de grandeur (pour la β -galactosidase, la cathepsine C, la dipeptidylpeptidase IV, la phosphodiesterase alcaline) soit inférieures (pour la cytochrome oxydase,

la catalase, la glucose-6-phosphatase, la NADPH cytochrome C réductase) à celle du foie de rat. Ces mesures ont été effectuées sur des homogénats obtenus à l'ultraturrax, de façon à obtenir un homogénat contenant le maximum de tissu veineux et par voie de conséquence l'activité maximale des enzymes. Cependant, dans ce cas, l'intégrité des organites subcellulaires est détruite. Nous avons également observé, dans certains cas, que l'écart-type signalant la différence d'activité spécifique d'un échantillon à l'autre est élevée. C'est le cas de la dipeptidylpeptidase IV ou de la phosphodiesterase alcaline.

Par après, nous avons entrepris de déterminer le moyen d'**homogénéisation** le plus adéquat pour obtenir des lysosomes intacts. Nous avons montré que les homogénéiseurs de Potter et de Dounce étaient inadéquats pour la veine cave inférieure de rat. Par contre, l'homogénéiseur de type Kontes loose semble plus approprié mais son utilisation est extrêmement délicate et demande un contrôle minutieux de chaque étape de l'homogénéisation. Il faut également réduire au maximum le temps entre le prélèvement des veines caves inférieures et l'incubation.

L'homogénéisation au Kontes loose s'étant avérée possible, nous avons alors tenté d'effectuer des **fractionnements subcellulaires** de veines caves inférieures de rat. Mais ici encore, l'opération d'homogénéisation est délicate et demande de grands soins dans la réalisation. De plus, des homogénéiseurs légèrement différents peuvent provoquer des variations importantes au niveau des résultats.

L'homogénéisation au Kontes loose nous a permis d'obtenir des fractions ML dans lesquelles les enzymes lysosomales étaient latentes. La membrane de ces lysosomes était donc intacte. Sur de telles préparations, nous avons tenté de mettre en évidence l'action des **radicaux libres** sur la membrane lysosomale. Il nous est apparu que des radicaux libres pouvaient provoquer une altération de cette membrane lysosomale et amener de ce fait un démasquage des enzymes contenues dans cet organe. La nature exacte des radicaux libres impliqués n'a cependant pas pu être établie avec précision. Ce point nécessitera donc des recherches ultérieures.

On peut aborder le problème de l'altération de la paroi veineuse par les lysosomes de deux façons essentiellement différentes. On peut tout

d'abord isoler, ou tenter d'isoler, chacun des types cellulaires et les cultiver *ex vivo*. Ces cultures cellulaires *ex vivo* peuvent alors être l'objet de différents traitements lésants : hypoxie, anoxie, concentration élevée en Ca^{2+} , milieu producteur de radicaux libres,... Les effets de ces différents traitements peuvent alors être analysés sur les différents organites des différents types cellulaires.

Alternativement, on peut isoler, à partir de veines entières, les différentes fractions subcellulaires, ou mieux les différents organites subcellulaires purifiés par gradient de densité, et les soumettre aux mêmes traitements lésants. C'est cette optique que nous avons retenue.

Cette étude pourrait s'étendre à celle des veines pathologiques et mettre en évidence les organites cibles dans la maladie veineuse. Les données de la littérature penchent pour une lésion lysosomale mais rien ne prouve que ceci soit la première altération conduisant au point de non-retour. Pour ne citer que les points clés, les mitochondries, source principale d'ATP, et la membrane plasmique, qui maintient l'homéostasie cellulaire, doivent être impérativement considérées.

C'est dans cette optique que notre travail, malheureusement limité au vu des importantes difficultés techniques rencontrées (lors de la mise au point de l'homogénéisation, par exemple), a été dirigé.

ANNEXE

ANNEXE

Les veines caves de chiens utilisées dans ce travail nous ont été procurées par le département de physiologie générale (Professeur J. Lammerant). Pour chaque chien, nous avons résumé les conditions d'expérimentation.

Chaque chien est mis à jeun 12 heures avant l'opération. L'anesthésie est identique pour tous les chiens et se fait suivant le schéma suivant :

- Morphine : 2 mg/kg
- Nembutal : 30 mg/kg
- Héparine : 2 fois 300 U/kg

L'opération suivie par chaque chien est explicitée ci-dessous :

chien 1592 : occlusion pendant 60 minutes puis reperfusion pendant 60 minutes avec O₂. Ce chien a été préalablement traité avec de la Lidocaïne (2 mg/kg puis 0,06 mg/kg/min).

chien 1593 : perfusion d'O₂ pendant 30 minutes, sans occlusion préalable. Dans ce cas, la veine cave inférieure est prélevée avant ouverture du thorax.

chien 1599 : perfusion d'O₂ pendant 30 minutes, sans occlusion préalable.

chien 1600 : perfusion intracoronaire de superoxyde dismutase (SOD) et de catalase à raison de 0,1 mg/min; 0,1 ml/min pendant 60 minutes. Cette perfusion de SOD et de catalase s'accompagne d'une perfusion d'O₂ pendant 30 minutes.

chien 1601 : perfusion d'O₂ pendant 30 minutes. Aucune expérience n'a eu lieu sur ce chien à cause de troubles du rythme.

chien 1603 : perfusion d'O₂ pendant 60 minutes et injection intracoronaire de SOD à raison de 1mg/min en fin d'expérience, après la perfusion d'O₂.

chiens 1604, 1605, 1609, 1610 : perfusion d'O₂ pendant 60 minutes.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J.D.
(1983)
"Molecular biology of the cell."
Garland Publishing Inc., New-York, London.
- BAINTON, D.F. (1981)
"The discovery of lysosomes."
J. Cell Biol., 91, 66s-76s.
- BAUDHUIN, P., BEAUFAY, H., RAHMAN LI, Y., SELLINGER, O.Z., WATTIAUX, R.,
JACQUES, P., DE DUVE, C. (1964)
"Tissue Fractionation studies. 17. Intracellular distribution of
monoamine oxidase, aspartate aminotransferase, alanine
aminotransferase, D-amino acid oxidase and catalase in rat-liver
tissue."
Biochem. J., 92, 179-184.
- BEAUFAY, H., AMAR-COSTESECC, A., FEYTMANS, E., THINES-SEMPOUX, D.,
WIBO, M., ROBBI, M. (1974)
"Analytical study of microsomes and isolated subcellular
membranes from rat liver."
J. Cell. Biol., 61, 188-231.
- BEAUFOUR (1989)
"Il était une fois la veine. Ginkor®"
Laboratoire Beaufour SA, Dreux.
- COTRAN, R.S. (1982)
"The endothelium and the inflammation : new insights." in : Current
topics in inflammation and infection. Majno G., Cotran R.S., Joris I.
(eds.), William & Wilkins, Baltimore.
- DAENS, W.T.H., WISSE, E., BREDEROO, P. (1969)
"Electron microscopy of the vacuolar apparatus." in : "Lysosomes in
biology and pathology." (Dingle J.T., Fell H.B. eds.), Vol. 1, pp 64-
112, North Holland Publishing, Amsterdam.

- DE DUVE, C., PRESSMAN, B.C., GIANETTO, R., WATTIAUX, R., APPELMANS, F.
(1955)
"Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns
of enzymes in rat liver tissue."
Biochem. J., 60, 604-617.
- DE DUVE, C. & WATTIAUX, R. (1966)
"Functions of lysosomes."
Ann. Rev. Physiol., 28, 435-495.
- DE DUVE, C. (1975)
"Exploring cell with a centrifuge."
Science, 189, 186-194.
- DIXON, M. & WEBB, E.C. (1979)
Enzymes
Third edition, Academic Press, Inc., New-York.
- DUHAMEL, B. (1962)
"Schémas d'anatomie. Fascicule 7 : Abdomen."
Edition Gilbert, Paris.
- EECKHOUT, Y. (1965)
"La métamorphose caudale des Amphibiens Anoures."
Thèse de doctorat, UCL.
- FISHER, A.B. (1988)
"Intracellular location of oxygen-derived free radicals" in :
"Oxygen radicals and tissue injury".
Proc. of an Upjohn Symposium/Oxygen Radicals. Allen Press, Kansas
(Halliwell, ed.)
- FOX, H. (1973)
"Degeneration of the tail notochord of Rana temporaria at
metamorphic climax."
Z. Zellforsch, 139, 371-386.
- FRIDOVICH, I. (1985)
"Xanthine oxydase" in : CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical
Research. Ed. by Robert A., Greenwald, CRC Press, Inc.

- GILBERT, A. (1987)
"Etude du cheminement intracellulaire des toxines et immunotoxines." Rapport des travaux de recherche, année 1986-87. F.N.D.P., Namur.
- GOLDBERG, J.A. & RUTENBURG, A.M. (1958)
"The colorimetric determination of leucine aminopeptidase in urine and serum of normal subjects and patients with cancer and other diseases."
Cancer, 11, 283-290.
- GONZE, M.M. (1989)
"Biosynthèse d'une glycoprotéine de la membrane lysosomale (LGP10D10)."
Thèse de doctorat, F.N.D.P, Namur.
- GROBETY, J. & BOUVIER, C.A. (1977)
"Studies on normal and varicose human saphenous veins. Structural differences, histochemical and electron microscope investigations."
IXth World Conference European Society for Microcirculation, Antwerp, July 5-9, 1976, Karger (Ed.), Basel.
- HAARDT, B. (1982)
"Comparaison histochimique des profils enzymatiques de veines saines et de veines variqueuses."
Communication personnelle.
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C. (1985)
Free radicals in biology and medicine.
Clarenton Press, Oxford.
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C. (1986)
"Oxygen Free Radicals and Iron in Relation to Biology and Medicine : Some Problems and Concepts."
Archives of Biochemistry and Biophysics, 246, 501-514.
- HAMER, I. (1988)
"Implications de la xanthine oxydase dans les lésions des membranes lysosomales induites par l'ischémie/reperfusion."
Rapport IRSIA 1988-1989.

- HENNING, R. (1974)
"The lysosomal membrane characteristic feature of composition and function."
Methodological developments in biochemistry, 216, 187-194, ed. Reid E.
- HOBBS, J.T. (1978)
"Compression Sclerotherapie of Varicose Veins." in
J.J. Bergan & J.S.T. Yao (Eds.): "Venous Problems.", Year Book
Medical Publishers, Inc. Chicago, p. 26.
- HOLTZMAN, E. (1976)
Cell. Biol. Monogr., 3, 1-27.
Springer-Verlag, New-York, Wien.
- JADOT, M., COLMANT, C., WATTIAUX-DE CONINCK, S., WATTIAUX, R. (1984)
"Intralysosomal hydrolysis of glycyL-L-phénylalanine 2-
naphtylamide."
Biochem. J., 219, 965-970.
- JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J., LONG, J.A. (1986)
Basic Histology, Fifth Edition, Lange Medical Publication, Los
Altos, California.
- KENNY, J. (1986)
"Cell surface peptidases are neither peptide- nor organ-specific."
TIBS, 11, 40-41.
- LEHNINGER, A.L. (1982)
Principles of biochemistry.
Worth Publishers, Inc, New-York.
- LEU, H.J. (1971)
"Histopathologie der peripheren Venenerkrankungen."
Verlag Hans Huber, Bern, Stuttgart, Wien.
- LOFGREN, E.P. & LOFGREN, K.A. (1971)
"Recurrence of Varicose Veins after the Stripping Operation."
Arch. Surg., 102, 111.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. (1951)
"Protein measurement with the Folin phenol reagent."
J. Biol. Chem., 193, 265-275.

- MATHEWS, M.B. (1975)
"Connective tissue. Macromolecular Structure and Evolution."
Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin.
- MEGO, J.L. (1979)
"The ATP-dependent proton pump in lysosomes membranes. Still a
valid hypothesis."
FEBS Lett., 107, 113-116.
- MOYER, C.F., DENNIS, P.A., MAJNO, G., JORIS, I. (1988)
"Venular endothelium *in vitro*. Isolation and characterisation."
In vitro cellular and developmental biology, 24, 359-368.
- NAGATSU, T., HINO, M., FUYAMADA, H., HAYAKAWA, T., SAKABARA, S.,
NAKAGAWA, Y., TAKEMOTO, T. (1976)
"New chromogenic substrates for X-Prolyl Dipeptidyl-
aminopeptidase."
Anal. Biochem., 74, 466-476.
- NEISS, W.F. (1984)
"A coat of glycoconjugates on the inner surface of the lysosomal
membrane in the rat kidney."
Histochemistry, 80, 603-608.
- NIEBES, P. & LASZT, L. (1971)
"Recherche sur l'activité des enzymes dans le métabolisme des
mucopolysaccharides de veines saphènes humaines saines et
variqueuses."
Angiologica, 8, 7.
- NIEBES, P. (1972)
"Determination of enzymes and degradation products of
glycosaminoglycans metabolism in the serum of healthy and
varicose subjects."
Clin. Chim. Acta, 42, 399.
- NIEBES, P. (1977)
"Biochemical studies of varicosis." in :
Stand. Cardio-ang. Meth. : 4. (Kappert A., ed) : "New Trends in Venous
Disease." Hans Huber Publishers, Bern.
- NIERMAN, H. (1970)
"Genetisch Problematiek der varikösen Symptomenkomplexen."
Ergebnisse der Angiologie, 4, 25-29.

- PERDUE, G.D., Jr. (1985)
"Diseases of the Peripheral Veins and The Venæ Cavæ." in
"The Heart, Vol II : Arteries and Veins.", Sixth Edition, Mac Graw-
Hill, New-York, p. 1372.
- PETERS, T.J., MÜLLER, M., DE DUVE, C. (1972)
"Lysosomes of the arterial wall."
J. Exp. Med., 136, 1117.
- REIJNGOUG, D.J. & TAGER, J.M. (1973)
"Measurement of intralysosomal pH."
Biochim. Biophys. Acta, 297, 174-178.
- SCHNEIDER, D.L., BURNSIDE, J., GORGA, F.R., NETTLETON, C.J. (1978)
"Properties of the membrane proteins of rat liver lysosomes."
Biochem J., 176, 75-82.
- SELLINGER, O.Z., BEAUFAY, H., JACQUES, P., DOYEN, A., DE DUVE, C. (1960)
"Tissue Fractionation Studies. 15. Intracellular distribution and
properties of β -N-acetylglucosaminidase and β -galactosidase in
rat liver."
Biochem. J., 74, 450-461.
- SEYMOUR, C.A. & PETERS, T.J. (1977)
"Enzyme activities in human liver biopsies : assay methods and
activities of some lysosomal and membrane-bound enzymes in
control tissue and serum."
Clinical Science and Medicine, 52, 229-239.
- STIRPE, F. & DELLA CORTE, E. (1969)
"The regulation of rat liver xanthine oxydase conversion *in vitro* of
the enzyme activity from deshydrogenase to oxygenase."
J. Biol. Chem., 244, 3855-3863.
- SVEJCAR, J., PREROVSKY, I. LINHART, J. KRUHL, J. (1963)
"Contents of collagen, elastin and hexosamine in primary varicose
veins."
Clin. Sci., 24, 325.
- THULESIUS, O. & GJÖRES, J.E. (1974)
Angiology, 25, 145.

- THULESIUS, O., GJÖRES, J.E., ERIKSSON, O., WEYWADT, C., BERLIN E. (1977)
 "Studies on venous wall elasticity, valvular function and lysosomal enzymes in primary varicose insufficiency." in :
 Stand. Cardio-Ang. Meth. : 4. (Kappert A., ed.) : "New Trends in Venous Disease.", Hans Huber Publishers, Bern.
- VAES, G. (1965)
 "Excretion of acid and of lysosomal hydrolytic enzymes during bone resorption induced in tissue culture by parathyroid extract."
 Exp. Cell. Res., 39, 470-474.
- VAES, G. (1969)
 "Lysosomes and the cellular physiology of the bone resorption." in :
 "Lysosomes in biology and pathology." (Dingle J.T., Fell H.B., eds.), Vol. 1, pp 217-253. North Holland Publishing, Amsterdam.
- WATTIAUX, R. (1970)
 "Centrifugation of subcellular components."
 Fundamentals of Biochemical Pharmacology. Bacq, Z.M. (ed.), Pergamon Press, Oxford, New-York.
- WATTIAUX-DE CONINCK, S. & WATTIAUX, R. (1969)
 "Nucleoside diphosphatase activity in plasma membrane of rat liver."
 Biochim. Biophys. Acta, 183, 118-128.
- WEISSMAN, G. (1969)
 "The effects of steroids and drugs on lysosomes." in : "Lysosomes in biology and pathology." (Dingle J.T., Fell H.B., eds.), Vol 1, pp 276-295. North Holland Publishing, Amsterdam.
- WIBO M., DUONG A.T., GODFRAIND T. (1980)
 "Subcellular Location of Semicarbazide-Sensitive Amine-Oxydase in Rat Aorta."
 Eur. J. Biochem., 112, 87-94.
- ZWILLENBERG, L.O., LASZT, L., ZWILLENBERG, H. (1971)
 "Die Feinstruktur der Venenwand bei Variköse."
 Angiologica, 8, 318.