



HAL
open science

Etude des effets et des mécanismes cardioprotecteurs de l'éthanol chez le rat

Annabelle Guiraud

► **To cite this version:**

Annabelle Guiraud. Etude des effets et des mécanismes cardioprotecteurs de l'éthanol chez le rat. Physiologie [q-bio.TO]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2006. Français. NNT: . tel-00106391v1

HAL Id: tel-00106391

<https://theses.hal.science/tel-00106391v1>

Submitted on 15 Oct 2006 (v1), last revised 4 Dec 2006 (v5)

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER-GRENOBLE 1

Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

N°

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Spécialité : Physiologie, Physiopathologie et Pharmacologie

Présentée et soutenue publiquement par

Annabelle GUIRAUD

le 23 octobre 2006

**Etude des effets et des mécanismes cardioprotecteurs
de l'éthanol chez le rat**

Directeur de thèse : Pr. Joël de Leiris

Composition du jury

Mme le professeur Danièle Feuvray	Rapporteur
M. le professeur Luc Rochette	Rapporteur
M. le professeur François Boucher	
M. le professeur Joël de Leiris	
M. le Docteur Michel de Lorgeril	

Thèse préparée au sein du laboratoire Nutrition Vieillessement et Maladies Cardiovasculaires, Université Joseph Fourier, Grenoble 1.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER-GRENOBLE 1

Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

N°

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Spécialité : Physiologie, Physiopathologie et Pharmacologie

Présentée et soutenue publiquement par

Annabelle GUIRAUD

le 23 octobre 2006

**Etude des effets et des mécanismes cardioprotecteurs
de l'éthanol chez le rat**

Directeur de thèse : Pr. Joël de Leiris

Composition du jury

Mme le professeur Danièle Feuvray	Rapporteur
M. le professeur Luc Rochette	Rapporteur
M. le professeur François Boucher	
M. le professeur Joël de Leiris	
M. le Docteur Michel de Lorgeril	

Thèse préparée au sein du laboratoire Nutrition Vieillessement et Maladies Cardiovasculaires, Université Joseph Fourier, Grenoble 1.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le professeur Joël de Leiris qui fut chronologiquement: mon professeur de physiologie en DEUG et en maîtrise, mon directeur de DEA et mon directeur de thèse. Je le remercie de m'avoir ouvert les portes du laboratoire Nutrition, Vieillesse et Maladies Cardiovasculaires dès la fin de ma maîtrise.

Je remercie chaleureusement le Dr Michel de Lorgeril de m'avoir dirigée, toujours disponible et enthousiaste à la vue de nouveaux résultats. Je n'oublierai également pas de remercier Michel et son épouse Patricia Salen pour leur soutien et leurs encouragements dans mes moments de doute.

La physiologie cardiaque a occupé une place importante dans mes travaux de thèse. Aussi, je remercie François Boucher pour ses compétences pédagogiques qui m'ont permis de mener à bien mes expériences d'oxygraphie et de cœur isolé perfusé. François, le Mike Gyver de la physiologie !

Je remercie très vivement les professeurs Danièle Feuvray et Luc Rochette de m'avoir fait l'honneur d'être mes rapporteurs et membres du jury de ma thèse.

J'ai eu le privilège de bénéficier d'une bourse CIFRE co-financée par l'ANRT (association nationale pour la recherche et technologie), le laboratoire Synergia et Polaris. Je tiens donc à remercier personnellement «mes sponsors» : Ludovic Prédal (laboratoire Synergia) et Stéphane Lozachmeur (Polaris). Le laboratoire Synergia a été également le fournisseur officiel en acides gras oméga 3 pour mes petits rats !

Toute mon amitié à Sabrina, avec qui j'ai coopéré pour la réalisation de mes travaux de recherche. Sa générosité, son sourire, ont été d'un grand réconfort lors des longues semaines de « manipes ». Sabrina, une personne au grand cœur, au labo comme dans la vie.

Je remercie le Département de Biologie Intégrée (Pr Alain Favier) du CHU de Grenoble sans lequel mon travail sur les lipides n'aurait pu être réalisé. Je tiens à remercier plus personnellement le Dr François Laporte (responsable du secteur biologie nutritionnelle et stress oxydant), le Dr Marie-Thérèse Foulon (responsable du secteur lipide), Marie Pierre

-Remerciements-

Coll (surveillante) et toutes les techniciennes du DBI pavillon B pour leur accueil chaleureux et leur grande gentillesse.

Un grand merci à l'équipe du laboratoire INSERM de bioénergétique fondamentale et appliquée (Pr Valdur Saks) pour son accueil cordial. Je suis notamment reconnaissante de la grande disponibilité du Pr Valdur Saks et de ses deux étudiantes: Tatiana Andrienko et Nathalie Berraud avec qui j'ai collaboré pour effectuer les études de bioénergétique sur mitochondries isolées.

Je remercie Santiago Gonsalez du laboratoire Pharmacologie Toxicologie du CHU de Grenoble pour m'avoir gentiment dosée l'alcoolémie de mes petits rats !

Enfin, mon travail expérimental a été en grande partie rendu possible grâce aux apports techniques du laboratoire INSERM des radiopharmaceutiques (Pr Daniel Fagret). Je remercie tout particulièrement René Bontron, Danièle Marty et Jean-Paul Mathieu.

-Remerciements-

A mes Parents,

***Qui m'ont soutenu tout au
long de ces quatre années***

***Qu'ils trouvent ici le témoignage de
ma reconnaissance et de mon affection***

A mon fiancé,

————— **SOMMAIRE** —————



	Page
Introduction générale	14
<hr/>	
Synthèse bibliographique	17
<hr/>	
<u>I. L'éthanol</u>	19
1.1. Terminologie	19
1.2. Production de boissons alcoolisées	19
1.3. Propriétés physico-chimiques de l'éthanol	21
1.4. Métabolisme de l'éthanol	21
1.4.1 Absorption	21
1.4.2. Voies oxydatives	22
1.4.2.1. Oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde	22
1.4.2.2. Oxydation de l'acétaldéhyde en acétate	27
1.4.2.3. Devenir de l'acétate	28
1.4.3. Voies non oxydatives	30
1.5. L'alcool, un remède connu depuis l'antiquité	30
1.5.1. Période de l'Antiquité	30
1.5.2. Du Moyen âge à la Renaissance	31
1.5.3. Du siècle des Lumières à 1900	32
1.5.3. L'ère Moderne	33
<u>II. Les acides gras</u>	33
2.1. Introduction	33
2.2. Structures et nomenclatures des acides gras	34
2.3. Propriétés physico-chimiques des acides gras	36
2.4. Origines des acides gras	39
2.4.1. Sources exogènes	39
2.4.2. Sources endogènes	42
2.4.2.1. Mobilisation des lipides hépatiques	42
2.4.2.2. Lipolyse	43
2.4.2.3. Synthèse <i>de novo</i> des acides gras	44
2.5. Catabolisme des acides gras	52
2.5.1 Généralités	52
2.5.2. De la mobilisation des triglycérides au site d'oxydation des acides gras	52

-Sommaire-

2.5.3. Dégradation des acides gras	53
2.5.3.1. β -oxydation mitochondriale	53
2.5.3.2. Dégradation des acides gras insaturés	55
2.5.3.3. Dégradation des acides gras à nombre impairs de carbones	56
2.5.3.4. α -oxydation des acides gras	56
2.5.3.5. β -oxydation peroxisomale	57
<u>III. Généralités sur le muscle cardiaque</u>	58
3.1. Description générale	58
3.2. Anatomie microscopique du muscle	58
3.3. Métabolisme énergétique du myocarde	60
3.4. Ischémie et reperfusion du myocarde	61
3.4.1. Ischémie myocardique	61
3.4.2. Reperfusion du myocarde	61
<u>IV. La mitochondrie cardiaque</u>	64
4.1. Caractéristiques générales	64
4.2. Lipides de la mitochondrie	65
4.2.1. Composition phospholipidique	65
4.2.2. Composition en acides gras des phospholipides	67
4.2.3. Biosynthèse des phospholipides	67
4.2.4. Dégradation des phospholipides	69
4.3. Fonction mitochondriale	69
4.3.1. Phosphorylation oxydative	69
4.3.1.1. Organisation de la chaîne respiratoire	69
4.3.1.2. Théorie chimiosmotique de Mitchell	72
4.3.1.3. MgATP synthase mitochondriale	72
4.3.2. Transport de l'énergie de la mitochondrie vers le cytosol	74
4.3.2.1. L'adénine nucléotide translocase	74
4.3.2.2. La porine	75
4.3.2.3. Les créatines kinases	76
4.3.2.4. Théorie du couplage fonctionnel	77
4.3.2.5. Les adénylates kinases	78
4.3.2.6. L'unité énergétique intracellulaire	79

-Sommaire-

4.4. Influence des lipides mitochondriaux sur la fonction mitochondriale	81
4.4.1. Influence des lipides sur les enzymes de la mitochondrie	81
4.4.2. Influence des lipides sur la phosphorylation oxydative	81
<u>V. Evidences épidémiologiques du rôle cardioprotecteur de l'éthanol</u>	82
5.1. Etudes écologiques	83
5.2. Etudes de cas-témoins	86
5.3. Etudes prospectives	88
5.4. Cardioprotection par l'éthanol. Type et dose d'alcool à consommer	99
<u>VI. Autres nutriments protecteurs: les acides gras oméga 3</u>	100
6.1. Intérêts pour les acides gras oméga 3. Depuis plus de 60 ans déjà !	100
6.2. Pourquoi les acides gras oméga 3 sont-ils si importants physiologiquement ?	101
6.3. Apports alimentaires en acides gras oméga 3	102
6.4. Acides gras oméga 3 et cardioprotection	105
6.4.1. Effets des acides gras oméga 3 d'origine marine	105
6.4.1.1. Etudes épidémiologiques	105
6.4.1.2. Etudes d'intervention	107
6.4.2. Effets de l'acide gras oméga 3 d'origine végétale: l'acide linoléique	109
6.4.1.1. Etudes épidémiologiques	109
6.4.1.2. Etudes d'intervention	110
<u>VII. Mécanismes cardioprotecteurs des acides gras oméga 3</u>	112
7.1. Sang et vaisseaux: cibles potentiels des mécanismes cardioprotecteurs des acides gras oméga 3	113
7.1.1. Triglycéridémie	113
7.1.2. Thrombose	113
7.1.3. Inflammation	114
7.1.4. Fonction endothéliale	117
7.1.5. Pression sanguine	117
7.2. Myocarde: cible directe des mécanismes cardioprotecteurs des acides gras oméga 3	118
7.2.1. Phospholipides membranaires	120
7.2.2. Acides gras libres	120
7.2.3. Transporteurs ioniques	122

-Sommaire-

7.2.4. Enzymes et récepteurs	124
7.2.5. Mitochondries cardiaques	124
<u>VIII. Mécanismes cardioprotecteurs de l'éthanol</u>	126
8.1. Sang et vaisseaux : cibles potentiels de l'éthanol	126
8.1.1. Lipides sanguins	126
8.1.2. Thrombose	128
8.1.3. Inflammation	130
8.1.4. Fonction endothéliale	133
8.1.5. Pression sanguine	134
8.2. Le myocarde: cible directe de l'éthanol	135
8.2.1. Protection contre la nécrose cellulaire	137
8.2.2. Amélioration de la fonction ventriculaire	138
8.2.3. Interférence avec les mécanismes du préconditionnement ischémique	138
8.2.4. Interaction avec les acides gras	139
<u>Matériels et méthodes</u>	141
<u>I. Animaux</u>	142
1.1. Conditions d'élevage	142
1.2. Traitements	142
1.2.1. Consommation chronique et modérée d'éthanol	142
1.2.2. Supplémentations lipidiques	142
1.3. Suivi pondéral et analyses nutritionnelles	144
<u>II. Modèle <i>ex vivo</i> de cœur isolé perfusé par voie aortique</u>	144
2.1. Anesthésie et prélèvement du cœur	144
2.2. Technique de perfusion aortique	145
2.3. Composition du liquide de perfusion	145
2.4. Stimulation électrique	146
2.5. Ballonnet intraventriculaire	147
2.6. Evaluation des variables hémodynamiques	147
2.7. Protocole expérimental d'ischémie/reperfusion	148

<u>III. Histologie et mesure de la taille de l'infarctus</u>	149
3.1. Principe de la coloration histoenzymologique au TTC	149
3.2. Protocole de coloration	149
3.3. Analyse des coupes et expression des résultats	150
<u>IV. Préparations biologiques</u>	150
4.1. Prélèvement et préparation des échantillons sanguins	150
4.2. Isolement des mitochondries cardiaques	150
<u>V. Dosage des protéines</u>	152
<u>VI. Analyses lipidiques</u>	153
6.1. Principe de la chromatographie en phase gazeuse	153
6.2. Analyse de la composition en acides gras du plasma et des globules rouges	154
6.3. Analyse de la composition en acides gras de phospholipides mitochondriaux	157
6.3.1. Séparation des différents phospholipides	157
6.3.2. Analyse de la composition en acide gras des phospholipides	159
6.4. Analyse quantitative des phospholipides mitochondriaux	159
6.5. Dosage des lipides sanguins	162
6.5.1. Cholestérol total	162
6.5.2. HDL-cholestérol	162
6.5.3. Triglycérides	163
<u>VII. Analyse de la fonction mitochondriale</u>	163
7.1. Principe du polarographe	163
7.2. Cinétiques de la respiration	164
7.3. Principes et réalisations des tests oxygraphiques	166
7.4. Calculs et détermination des paramètres cinétique	167
<u>VIII. Analyses statistiques</u>	170

Partie 1 : Effets d'une consommation chronique et modérée d'éthanol sur la résistance du myocarde à une séquence d'ischémie/reperfusion <i>ex vivo</i>.	171
<hr/>	
<u>I. Introduction et objectifs</u>	172
<u>II. Méthodes</u>	173
2.1. Groupes expérimentaux	173
2.2. Suivi pondéral et analyses nutritionnelles	173
2.3. Perfusion de coeurs isolés	173
2.4. Histologie et mesure de la taille de l'infarctus	174
2.5. Analyses statistiques	174
2.6. Exclusion des animaux	174
<u>III. Résultats : influence de l'éthanol sur le poids et la nutrition du rat</u>	175
3.1. Suivi pondéral	175
3.2. Analyses nutritionnelles	176
3.2.1. Apports énergétiques	176
3.2.2. Analyse des apports lipidiques	177
<u>IV. Résultats : étude de la résistance du myocarde à l'ischémie/reperfusion après une consommation modérée d'éthanol sur un modèle de coeur isolé perfusé de rat</u>	181
4.1. Paramètres hémodynamiques	181
4.2. Taille de l'infarctus	186
<u>V. Discussion</u>	188
<u>VI. Conclusion</u>	190

Partie 2 : Etude des mécanismes cardioprotecteurs induits par une consommation modérée d'éthanol chez le rat.	
Parallèle avec la cardioprotection induite par une consommation d'acides gras oméga 3.	191
<hr/>	
<u>I. Introduction et objectifs</u>	192
<u>II. Méthodes</u>	194
2.1. Groupes expérimentaux	194
2.2. Perfusion de cœur isolé	195
2.3. Histologie et mesure de la taille de l'infarctus	195
2.4. Préparation des échantillons	195
2.5. Analyses lipidiques	196
2.6. Tests oxygraphiques	196
2.7. Analyses statistiques	197
2.8. Exclusion des animaux	198
<u>III. Résultats : influence des acides gras oméga 3 sur le poids et la nutrition du rat</u>	198
3.1. Suivi pondéral	199
3.2. Analyses nutritionnelles	199
3.2.1. Apports énergétiques	199
3.2.2. Analyse des apports lipidiques	200
<u>IV. Résultats : étude de la résistance du myocarde à l'ischémie/reperfusion après une supplémentation en acides gras oméga 3 sur un modèle de coeur isolé perfusé de rat</u>	202
4.1. Paramètres hémodynamiques	202
4.2. Taille de l'infarctus	204
<u>V. Résultats : effets d'une supplémentation en acides gras oméga 3 sur les acides gras des phospholipides de la mitochondrie cardiaque</u>	205

<u>VI. Résultats : effets de l'éthanol sur les lipides du sang et des mitochondries cardiaques</u>	211
6.1. Analyse du profil lipido-lipoprotéinique plasmatique	211
6.2. Analyse du profil lipidique des globules rouges	216
6.3. Analyse quantitatives des phospholipides mitochondriaux	225
6.4. Analyse du profil en acides gras des phospholipides de la mitochondrie cardiaque	226
<u>VII. Résultats : effets de l'éthanol sur la fonction mitochondriale</u>	231
7.1. Evaluation de la qualité de la préparation mitochondriale	231
7.2. Etude du couplage fonctionnel sur mitochondries isolées de cœur de rat	232
7.2.1. Couplage entre la créatine kinase et la phosphorylation oxydative	233
7.2.2. Couplage entre la créatine kinase et l'adénine nucléotide translocase	235
<u>VIII. Discussion</u>	237
<u>IX. Conclusion</u>	249
Conclusion générale	251
<hr/>	
Références bibliographiques	205
<hr/>	
Liste des figures	292
<hr/>	
Liste des tableaux	296
<hr/>	
Liste des abréviations	300
<hr/>	

———— **INTRODUCTION GÉNÉRALE** ————



-Introduction générale-

La consommation de boissons alcoolisées fait partie intégrante de la culture de nombreuses civilisations anciennes. L'histoire a par ailleurs été marquée par de nombreuses confrontations entre les pros et les anti-alcool qui percevaient l'alcool comme une substance toxique.

Les premiers travaux de recherches scientifiques sur l'alcool datent du XVIII^{ème} siècle et c'est principalement depuis ces dernières décades que les études s'accumulent. Pour la majorité de ces travaux, l'excès d'alcool est néfaste pour la santé. Les conséquences sanitaires d'une forte consommation d'alcool sont nombreuses: cancers digestifs, cardiomyopathies, cirrhose hépatique, syndrome d'alcoolisme fœtal, accidents de voiture et suicide. Cependant, ces effets n'ont jamais été retrouvés chez les buveurs légers à modérés d'alcool. D'ailleurs, ces études montrent que la consommation modérée d'alcool est bénéfique pour le système cardiovasculaire.

Tout a commencé après guerre où l'état français décide de mettre en place une veille sanitaire. Ces études ont alors pour but de suivre l'évolution sanitaire de cette population française en pleine reconstruction. Fin des années 50, ces données nationales sont comparées avec les données épidémiologiques d'autres pays industrialisés. Pour nombreux de ces pays, une consommation élevée en graisses saturées est fortement corrélée à des risques de mortalité cardiovasculaire. Exception faite pour la France, qui malgré sa forte consommation de graisses saturées affiche un faible taux de mortalité coronarienne. Ce phénomène est alors baptisé le «paradoxe français». Ensuite, de nombreuses études épidémiologiques se sont succédées pour déterminer les raisons de ce paradoxe français. L'observation des habitudes alimentaires suggère que la consommation régulière et modérée de vin peut être la clé de cette exception française. Ces résultats sont alors très vite repris par les médias. L'écho le plus retentissant est sans nul doute l'émission américaine «60 minutes» sur CBS en novembre 1991 où le Dr Serge Renaud fait découvrir l'existence du «French paradox» à des dizaines de millions d'américains. Depuis, les études cliniques et expérimentales se succèdent pour mieux comprendre les mécanismes à l'origine de la cardioprotection induite par la consommation modérée d'alcool. Pendant longtemps, on a admis que des effets systémiques (effet anti-plaquettaire, augmentation des HDL...) étaient à l'origine des effets cardioprotecteurs de l'alcool. Fin des années 90, les études expérimentales se succèdent et démontrent que des effets spécifiquement myocardiques peuvent également expliquer les bénéfices cardiaques de l'éthanol (= molécule alcool). Autrement dit, la prise chronique de doses modérées d'éthanol peut être associée à la mise en place d'un système d'autoprotection myocardique permettant au cœur d'être moins sensible aux altérations liées à l'ischémie/reperfusion. Cependant le mode d'action de l'éthanol est encore obscur. C'est pourquoi notre objectif a été de s'intéresser aux mécanismes cardioprotecteurs spécifiquement myocardiques induits par des

-Introduction générale-

doses « nutritionnellement » modérées (et non « pharmacologiquement » modérées) d'éthanol. D'après les données de la littérature, les effets cardioprotecteurs de l'éthanol ressemblent fortement à ceux induits par la consommation d'acides gras oméga 3 (contenus principalement dans les poissons gras, l'huile de colza, les noix). Il nous restait alors plus qu'à suivre notre fil d'Ariane, déterminer si des doses modérées d'éthanol pouvait mimer la cardioprotection induite par les AGPI n-3. En somme, est-ce que boire modérément de l'alcool équivaut à manger du poisson pour la bonne santé de notre cœur.

Après avoir vérifié les effets cardioprotecteurs (et spécifiquement myocardiques) induits par des doses modérées d'éthanol et par une supplémentation en acides gras oméga 3, nous avons évalué l'interaction de chacun de ces nutriments avec les acides gras des cellules cardiaques et plus précisément au niveau des membranes mitochondriales cardiaques. Enfin, nous avons déterminé si le remodelage lipidique induit par l'éthanol pouvait avoir un impact direct sur la fonction respiratoire de la mitochondrie et expliquer la meilleure résistance du myocarde à l'ischémie/reperfusion.

———— **SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE** ————



-Synthèse bibliographique-

Première cause de mortalité en France, les maladies cardiovasculaires sont à l'origine de près de 170000 décès chaque année (32% des causes de mortalité). Il est à présent bien établi qu'un nombre important de facteurs peuvent jouer un rôle dans la survenue de ces maladies parmi lesquels l'alimentation. Depuis les années 50, notre alimentation s'est considérablement améliorée. Toutefois, cela n'empêche pas les pays industrialisés de baigner dans l'abondance et l'excès alimentaire. Les aliments nutritionnellement intéressants sont trop souvent étouffés par des produits «marketing» qui sont uniquement là pour satisfaire nos papilles.... Ces aliments plaisirs sont en effet nutritionnellement catastrophiques : trop de sucre, trop de (mauvaises) graisses, trop de sel, trop de colorants, trop de conservateurs.... bref trop de mauvais! La consommation de ces gadgets alimentaires vient très souvent compléter la prise de repas faciles et rapides de type «fast food». Avec de telles habitudes alimentaires, on aboutit alors à un excès en lipides, en glucides, en sel, en additifs et à des carences voire des déficiences en nutriments essentiels. Notre alimentation est alors devenue un véritable facteur à risque pour certains d'entre nous. Entretenir ce type de processus pendant des années va alors constituer une véritable bombe à retardement. L'excès ou le manque d'un ou de certain(s) nutriment(s) va alors participer au déclenchement d'une maladie chronique comme un diabète, un cancer, une polyarthrite rhumatoïde, une maladie cardiovasculaire.... Le mal peut aussi ne pas se faire prier et survenir brutalement, c'est le cas de la crise cardiaque, de l'attaque cérébrale. Une précaution ou un remède à toutes ces pathologies? Une alimentation équilibrée, calquée sur les régimes Crétois et Méditerranéen, réputés pour être exceptionnellement salvateurs pour notre santé. Une alimentation type Crétoise/Méditerranéenne est très riche en légumes, légumineuses, fruits, oléagineux, poissons, huile d'olive. La consommation modérée de vin fait également partie intégrante de ces diètes. Tous ces aliments permettent de fournir à notre organisme des nutriments essentiels comme des polyphénols, des vitamines, des oligo-éléments, de l'arginine, de l'acide oléique, des acides gras oméga 3 et de l'éthanol, des molécules scientifiquement toutes reconnues pour leurs bienfaits sur la santé.

L'alcool à doses modérées et les acides gras oméga 3 sont de formidables facteurs de protection cardiovasculaire et font d'ailleurs l'objet de ce présent travail de recherche. La synthèse bibliographique qui suit est d'ailleurs consacrée à ces nutriments. Une partie biochimie permettra de (mieux) faire connaissance avec l'éthanol et les acides gras. Une revue de la littérature permettra de faire le point sur les effets et mécanismes cardioprotecteurs de ces deux nutriments. A l'issue de cette lecture, notre hypothèse de recherche semblera alors certainement moins farfelue!

I. L'éthanol

1.1. Terminologie

Le mot « *alcool* » est né sous la plume d'Ambroise Paré en 1586. Il est issu du latin alchimique *alko(ho)l* (substance produite par distillation totale) lui-même dérivé du mot arabe *al-kuhl* (poudre antimoine).

On appelle : « boissons alcooliques », toute substance qui, à l'état naturel, contient de l'alcool et « boissons alcoolisées », tout liquide auquel on a ajouté de l'alcool. Dans la pratique courante, l'expression boisson alcoolisée désigne toutes les boissons contenant de l'alcool.

Selon la nature de la boisson, la teneur en alcool peut-être très différente. Pour la mesurer, on se réfère au volume d'alcool pur contenu dans 100 volumes de liquide mesuré à la température de 15°C. Cette mesure s'effectue grâce à l'alcoomètre de Gay-Lussac. La teneur en alcool peut s'exprimer ensuite en degrés, pourcentage ou centilitres. Ainsi, un litre de vin à 12° contient 12 centilitres soit 12% d'alcool pur. Particularité pour la bière, la teneur en alcool est un rapport de quantités et s'exprime en grammes d'alcool pour 100 g de solution.

Suivant leur teneur en alcool, les boissons alcoolisées sont alors classées en différents types :

- de 1 à 10% : les cidres
- de 4 à 13% : les boissons au houblon
- de 8 à 20% (en général surtout 12%) : les vins rouges, blancs ou rosés
- de 15 à 20% : les liqueurs
- inférieur 18% : le vermouth et les apéritifs à base de vin
- entre 40 et 55% : les spiritueux de type digestif et les eaux-de-vie
- inférieur à 45% : les apéritifs anisés
- environ 70% : les élixirs à base de plantes

1.2. Production de boissons alcoolisées

Les boissons alcoolisées sont issues de la fermentation alcoolique (ou éthanolique) des fruits, céréales, tubercules, des végétaux riches en sucre (glucose ou fructose). Les pionniers dans la fabrication des vins et des bières fermentés furent les babyloniens vers -3000 av JC. La fermentation alcoolique est un procédé réalisé naturellement par les levures. Dans le cas du vin, ces levures se retrouvent sur la pruine du raisin. Ces levures vont alors transformer le sucre du raisin en alcool selon les réactions décrites sur la figure 1.

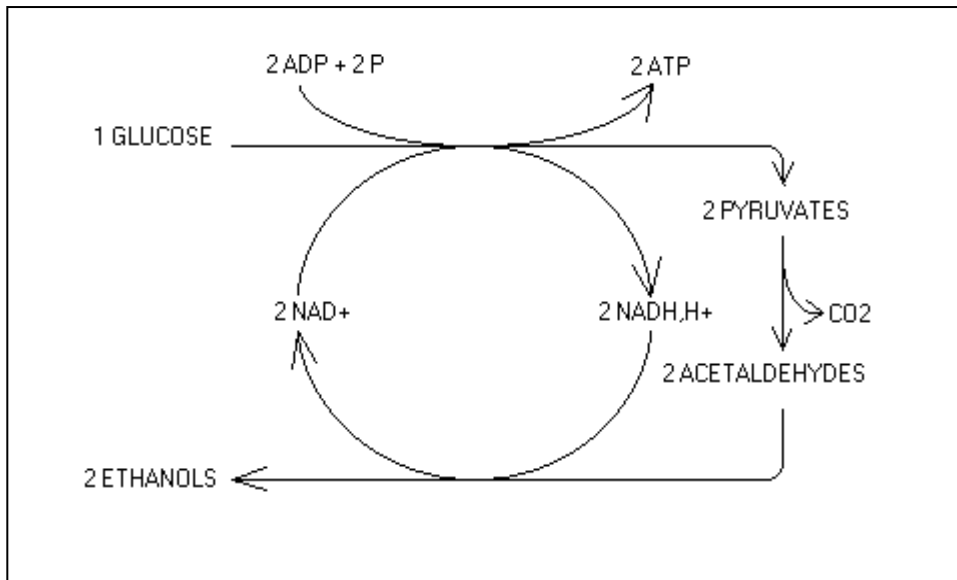


Figure 1 : Biosynthèse de l'éthanol.

Au cours de la glycolyse anaérobie, le glucose se transforme en pyruvate. Le pyruvate est ensuite transformé en éthanol par fermentation alcoolique. Ce processus nécessite au préalable la réduction du pyruvate en éthanal et la libération de dioxyde de carbone. L'éthanal est ensuite réduit en éthanol grâce à l'oxydation de NADH, H^+ en NAD^+ . La fermentation sert ainsi à régénérer le NAD^+ , indispensable au bon déroulement de la glycolyse.

On peut extraire l'alcool des produits fermentés par distillation. On obtient alors des spiritueux, des eaux-de-vie, du rhum, etc..., dont le titre de consommation est généralement compris entre 40 et 55°. La distillation alcoolique permet de faire évaporer l'alcool puis de le condenser pour augmenter la proportion d'alcool dans le produit final. L'appareil destiné à la séparation par chauffage puis refroidissement s'appelle l'alambic (de l'arabe *al-anbiq* lui-même empreinté au grec *ambix*= vase), invention attribuée aux arabes aux alentours du X^{ème} siècle.

La distillation alcoolique repose sur le principe que l'alcool bout à 78,4°C soit une température inférieure à la température d'ébullition de l'eau (100°C). En conséquence, en chauffant un mélange d'eau et d'alcool à une température supérieure à 78,4°C et inférieure à 100°C, on évapore préférentiellement l'alcool que l'on récupère ensuite par condensation. Toutefois, l'alcool ayant des liaisons atomiques fortes avec l'eau, le produit de la distillation contiendra toujours de l'eau. Il n'est donc pas possible d'obtenir de l'alcool pur à partir de la distillation !

1.3. Propriétés physico-chimiques de l'éthanol

Propriétés chimiques

L'éthanol ou alcool éthylique est un alcool possédant la structure semi-développée suivante : $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$ et est usuellement désigné par la formule EtOH.

Propriétés physiques

- pouvoir calorique : 7 Kcal/g
- masse molaire : 46,1 g/mole
- masse volumique : 7,9 Kg/m³
- température de fusion : -114,4°C
- température de vaporisation : 78,4°C
- solubilité : complète dans l'eau et les solvants polaires et apolaires (acétone, éther)
- température d'auto-inflammation : 425° C

1.4. Métabolisme de l'éthanol

1.4.1 Absorption

Aussitôt ingéré, l'éthanol diffuse dans le sang. La muqueuse buccale et l'œsophage résorbent une très faible quantité d'éthanol. L'absorption digestive de l'éthanol se déroule au niveau de la muqueuse gastrique et surtout de l'intestin grêle. Elle s'effectue très rapidement par diffusion. Une heure environ après l'ingestion, le contenu en éthanol du tube digestif est en équilibre avec le sang. Cette vitesse d'absorption sera cependant influencée par plusieurs facteurs :

a). Le type de boisson alcoolique

Le degré d'alcool, une boisson chaude (exemple : un grog), la présence de sucre et d'acide carbonique (exemple : le champagne) sont des facteurs qui accélèrent l'absorption de l'éthanol. Par exemple, pour une boisson contenant 50% d'éthanol (eau-de-vie), le pic sanguin est atteint 30 min après l'ingestion. Si au contraire la même quantité d'éthanol est absorbée sous forme diluée (bière, vin entre 5 à 10° par exemple), ce maximum n'est atteint qu'après 1 heure environ.

b). La quantité d'éthanol ingérée

Pour une absorption de 0,35 g d'alcool/kg corporel, ce maximum est atteint en 30 minutes alors qu'il faut 1 heure et demie pour une quantité d'alcool absorbée à 1,65 g/kg corporel.

c). L'état de plénitude de l'estomac

L'absorption de l'éthanol est plus rapide s'il est consommé à jeûne plutôt qu'au cours du repas, surtout si ce dernier est riche en lipides. Dans le premier cas, le maximum est atteint en 45 minutes et dans le second cas, en plus de 60 minutes.

d). L'individu

Pour une même quantité d'éthanol consommée et pour un même poids corporel, l'alcoolémie sera plus élevée pour les femmes que pour les hommes. Par exemple, un individu de 70 kg qui absorbe 0,6g d'alcool/kg (soit l'équivalent de 2 verres de vin rouge) aura une alcoolémie de 0,59g/L de sang si c'est un homme et de 0,71 g/L de sang si c'est une femme.

Après son absorption, l'éthanol rejoint le foie par la veine porte. La concentration hépatique de l'éthanol est faible car il est rapidement oxydé. Après cette catabolisation de premier passage, l'éthanol encore non métabolisé rejoint la circulation générale et diffuse dans l'ensemble des liquides et des tissus de l'organisme (proportionnellement à la teneur hydrique de ces tissus). Ceci explique pourquoi les muscles et le cerveau captent une quantité importante d'éthanol tandis que le tissu adipeux et les os en captent peu. Le volume de distribution de l'éthanol représente approximativement 70% du corps. Si l'on considère un homme de 70 kg (volume de distribution : $70 \text{ kg} \times 0,07 = 49\text{kg}$) qui consomme un verre de vin rouge (=12 g éthanol) alors cet individu aura une concentration sanguine en éthanol de $12 \text{ g} / 49 \text{ kg} = 0,24 \text{ ‰}$, soit 5 mM après absorption complète de l'éthanol (*remarque : concentration létale d'éthanol $\approx 3,5 \text{ ‰}$ soit 76 mM*).

1.4.2. Voies oxydatives

La majeure partie de l'éthanol est oxydée au niveau du foie. Son métabolisme fait intervenir deux oxydations, la première transforme l'éthanol en acétaldéhyde et la seconde transforme l'acétaldéhyde en acétate.

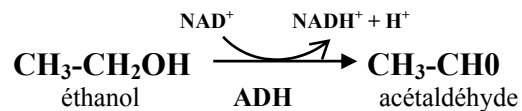
1.4.2.1. Oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde

Cette première oxydation peut se réaliser selon plusieurs voies enzymatiques décrites ci-après.

a) Alcool déshydrogénase (ADH)

La voie de l'ADH est prépondérante dans le métabolisme de l'éthanol. Cet enzyme cytosolique fonctionne avec le cofacteur NAD^+ et catalyse la réaction :

-Synthèse bibliographique-



Appartenant à une famille polygénique (des gènes différents vont coder pour des sous-unités différentes), les isoformes ADH sont alors très nombreux. En effet, l'ADH est une protéine dimérique, les combinaisons entre sous-unités offrent donc la possibilité de produire différents isoformes d'ADH. Les ADH sont réparties en 5 classes suivant leurs propriétés électrophorétiques, enzymatiques et leur similarités de séquence (Bosron *et al.*, 1986; Ehrig *et al.*, 1990). Le tableau 1 résume les principales caractéristiques des différentes ADH.

Expérimentalement, la régulation de l'ADH a été étudiée sur le foie de rat et il apparaît que l'activité de cet enzyme est modulée par des facteurs nutritionnels et hormonaux. Ainsi, Bosron et collaborateurs ont montré que le jeûne, le régime hypocalorique, la carence en zinc diminuent la vitesse d'élimination de l'éthanol (Bosron *et al.*, 1984). Des hormones telles que les androgènes, les hormones thyroïdiennes inhibent également l'ADH hépatique tandis que l'hormone de croissance stimule cet enzyme (Crabb, 1995). Chez l'homme, l'ADH hépatique est plutôt adaptée pour métaboliser des doses modérées d'alcool (Crabb, 1995) car l'activité de cet enzyme est diminuée chez les consommateurs excessifs et chroniques d'alcool (Thomas *et al.*, 1982).

Quant au métabolisme gastrique de l'éthanol, l'ADH de l'estomac (ADH type IV) a une affinité relativement faible pour l'éthanol (Yin *et al.*, 1990; Moreno *et al.*, 1991). Pour cette raison, cet enzyme semble jouer un rôle dans l'oxydation de l'alcool avant même que celui soit absorbé au niveau du système digestif. Ce catabolisme dit de premier passage (first-pass metabolism) réduit la biodisponibilité de l'éthanol et représente ainsi une certaine barrière de protection lors de la consommation de quantité modérée de boissons alcoolisées (Julkunen *et al.*, 1985). Cependant, cette barrière est moins active chez la femme que chez l'homme (Baraona *et al.*, 1994) et c'est probablement la raison pour laquelle les femmes sont plus vulnérables face à la consommation d'alcool. Enfin, comme pour l'ADH hépatique, l'activité de l'ADH gastrique est également réduite chez les alcooliques (Yin *et al.*, 1999).

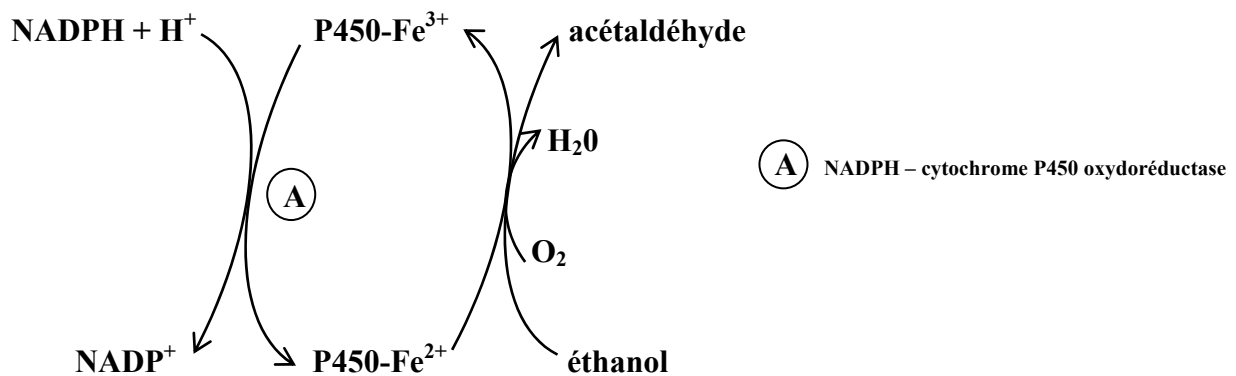
Classe	Sous-unité	K _m éthanol [mM, (g/L)]	V _{max}	Localisation	Caractéristiques
I	α $\beta_1, \beta_2, \beta_3$ γ_1, γ_2	0,05 (0,002) à 4,4 (0,2)	9 à 340	Nombreux tissus dont foie, glandes surrénales, poumons (Crabb <i>et al.</i> , 1995). A l'état de trace dans le cerveau et le cœur (Holmes <i>et al.</i> , 1986).	- forte affinité pour l'éthanol - abondance dans le foie : rôle essentiel dans le métabolisme hépatique de l'éthanol.
II	π	34,0 (1,58)	?	Foie, duodénum (Saleem <i>et al.</i> , 1984)	- abondante dans le foie, haut K _m - contribue à l'oxydation de fortes concentrations d'alcool.
III	χ	> 1000 (46)	20	Ubiquitaire (Holmes <i>et al.</i> , 1986)	- ancêtre de l'ADH - K _m très élevé, compatible avec les concentrations d'éthanol dans l'estomac - métabolisme de 1 ^{er} passage - ADH plus active chez l'homme que chez la femme (Baraona <i>et al.</i> , 2001).
IV	μ, σ	37,0 (1,7)	1510	Esophage, estomac (Yin <i>et al.</i> , 1990; Moreno 1991)	- petite affinité pour l'éthanol - vitesse de métabolisation élevée - métabolisme de 1 ^{er} passage
V	?	?	?	Foie (ARNm), estomac (ARNm) (Yasunami <i>et al.</i> , 1991).	- mal caractérisée

Tableau 1 : Classification des ADH.

Les constantes cinétiques sont données pour des dimères. Le K_m (constante de Michaelis) représente la concentration d'éthanol pour laquelle l'enzyme atteint la moitié de sa vitesse maximale (V_{max}, en moles éthanol/min/mole ADH).

b) Cytochrome P4502E1 (CYP2E1)

Cet enzyme a été caractérisé successivement dans le foie de rat et le foie humain (Koop et Coon, 1986). La CYP2E1 intervient dans la voie microsomale (ou MEOS pour microsomal ethanol oxidizing system) (Lieber et de Carli, 1968) qui est responsable de l'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde. Le CYP2E1 appartient à la superfamille des cytochromes P450 qui utilisent le NADPH et l'oxygène comme cofacteurs. D'autres isoenzymes du P450 peuvent également contribuer au métabolisme de l'éthanol comme les CYP1A2 et CYP3A4 (Salmela *et al.*, 1998).



Enzyme membranaire localisé principalement dans le réticulum endoplasmique, le CYP2E1 est exprimé en grande quantité dans les hépatocytes et en quantité jusqu'à 100 fois plus faible dans les tissus extrahépatiques (poumons, œsophage, intestin, cerveau, lymphocytes, coeur) (Lieber, review 1999; Thum *et al.* 2000).

En ce qui concerne sa régulation, le CYP2E1 a pour caractéristique d'être induit après une administration aiguë et forte d'éthanol (4g/kg chez le rat) (Petersen *et al.*, 1982) ou au cours d'une alcoolisation chronique (Roberts *et al.*, 1994, Mishin *et al.*, 1998). L'induction de la CYP2E1 par l'alcool peut être expliquée par deux mécanismes : une synthèse accrue (Badger *et al.*, 1993) et/ou une stabilisation accrue de la protéine lui permettant de rallonger sa demi-vie de 7 à 37 heures (Roberts *et al.*, 1995).

Chez les consommateurs excessifs et chroniques d'alcool, le métabolisme de l'éthanol par la CYP2E1 génère différentes espèces radicalaires (Eckström et Ingelman-Sundberg, 1989) qui peuvent être à l'origine de la lipoperoxydation et de la toxicité hépatique de l'alcool (Nanji *et al.*, 1994; Wu et Cederbaum, 2000). La CYP2E1 génère la production de radicaux superoxydes ($\text{O}_2^{\bullet -}$) qui conduisent, en présence d'eau oxygénée (H_2O_2) et de fer, à la formation de radicaux hydroxyles (OH^{\bullet}) très réactifs et à des radicaux hydroxyéthyles ($\text{CH}_3\text{-}\dot{\text{C}}\text{HOH}$) formés directement par la CYP2E1 ou issus de l'attaque de l'éthanol par OH^{\bullet} (Albano *et al.*, 1999). Les radicaux $\text{CH}_3\text{-}\dot{\text{C}}\text{HOH}$ attaquent à leur tour des molécules

-Synthèse bibliographique-

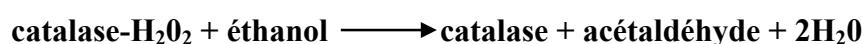
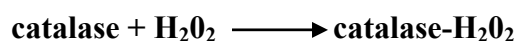
environnantes et forment des adduits aux protéines (Clot *et al.*, 1996) qui entraînent la production d'anti-corps (Clot *et al.*, 1997) dont la quantité est corrélée à l'activité du CYP2E1 (Dupont *et al.*, 1998).

L'expression de la CYP2E1 est également influencée par des facteurs hormonaux et nutritionnels. Des conditions physiopathologiques comme le jeûne, le diabète ou l'obésité entraînent des perturbations hormonales à l'origine de l'induction du CYT2E1 (Koop et Tiernay, 1990). L'importance et la nature des apports lipidiques sont également des facteurs régulateurs de l'enzyme. Associer consommation d'éthanol à un régime hyperlipidémique riche en acide gras linoléique entraîne une induction considérable du CYP2E1 dans le foie (Takahashi *et al.*, 1992).

Il est également important de préciser que le CYP2E1 catalyse le métabolisme de plus de 100 substrats (Guengerich et Shimada, 1991). Il s'agit notamment d'alcools (autre que l'éthanol), de solvants organiques, de nitrosamines, de médicaments. Ces substrats ont des structures très différentes mais sont généralement hydrophobes et de faibles poids moléculaires. En raison d'une absence de spécificité entre la CYP2E1 et l'éthanol ($K_m=10$ mM soit 0,5 g/L), il est fréquent d'observer des interférences entre l'éthanol et de nombreux médicaments (Guengerich et Shimada, 1991).

c) Catalase

La catalase a une fonction essentielle de détoxification de l' H_2O_2 . Elle peut également oxyder l'éthanol en acétaldéhyde selon la réaction suivante :



Cette voie d'oxydation est essentiellement localisée dans les peroxysomes et dépend de la disponibilité en H_2O_2 laquelle est très limitée dans les conditions physiologiques habituelles. L'oxydation de l'éthanol par la catalase se produira donc davantage lors de situations associant alcoolisation et libération élevée d'acides gras libres d'origine hépatique (lors de jeûne ou de régime hyperlipidique). Cette condition génère de l' H_2O_2 et active ainsi l'oxydation peroxisomale de l'éthanol.

Identifiée en 1976 par Herzog et Fahimi, la catalase cardiaque (Herzog et Fahimi, 1976) présente une activité 50 fois plus faible que la catalase hépatique (Chen *et al.*, 1994). Comparé à la teneur en catalase du foie, le cœur peut contenir jusqu'à 150 fois moins de catalase (Doroshov *et al.*, 1980). Toutefois, une consommation chronique et élevée d'éthanol (36% des calories totales) est associée à une prolifération peroxisomale et à un doublement de

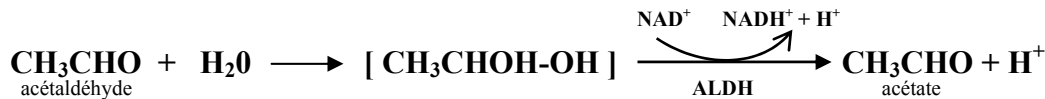
l'expression de la catalase (Fahimi *et al.*, 1979) dans le myocarde. Malgré sa teneur faible en catalase, le cœur est donc capable de développer des voies de détoxification en cas d'alcoolisation.

1.4.2.2. Oxydation de l' acétaldéhyde en acétate

Cette seconde oxydation peut se réaliser selon plusieurs voies enzymatiques décrites ci-après.

a) Aldéhyde déshydrogénase (ALDH)

L'acétaldéhyde, produit hautement réactif et toxique pour la cellule, est à son tour oxydé en acétate grâce à l'intervention de l'ALDH. Cet enzyme, comme l'ADH, utilise le NAD^+ comme coenzyme (Smith *et al.*, 1986) et catalysent la réaction suivante :



L'ALDH appartient à une superfamille d'enzymes comprenant 16 gènes chez l'homme (Vasiliou et Pappas, 2000). Ces enzymes ont une large spécificité pour les aldéhydes issus notamment de la peroxydation des lipides membranaires ou du métabolisme des mono-, di- ou polyamines. A la différence de nombreuses déshydrogénases qui sont inhibées par le NADH pendant le métabolisme de l'éthanol, l'ALDH reste active malgré l'augmentation du rapport NADH/NAD^+ qui a lieu au cours du métabolisme de l'éthanol (Crabb *et al.*, 1995). Les deux isoenzymes les plus importants dans le métabolisme de l'éthanol sont l'ALDH1 et l'ALDH2. Comparée à l'ALDH1 située dans le cytosol, l'ALDH2 est présente dans les mitochondries et a une plus forte affinité pour l'acétaldéhyde ($<1 \mu\text{M}$ soit 1000 plus grand que celui de l'ALDH1). L'ALDH2 est donc responsable de la majeure partie de l'oxydation de l'acétaldéhyde en acétate. Une autre ALDH mitochondriale, l'ALDH5 a également un faible K_m pour l'acétaldéhyde ($30 \mu\text{M}$) et semble jouer un rôle non négligeable dans le métabolisme de l'éthanol (Stewart *et al.*, 1995). Les ALDH 1, 2 et 5 sont exprimées massivement dans le foie. L'ALDH est également présente dans l'estomac et permet d'oxyder l'acétaldéhyde issu du catabolisme de premier passage (Yin *et al.*, 1988). On retrouve également de l'ALDH abondamment dans le rein, les muscles, le cœur. Le placenta, le cerveau et le pancréas en contiennent un peu moins.

b) Cytochrome P4502E1 (CYP2E1)

Cet enzyme est capable d'oxyder l'éthanol en acétaldéhyde et également d'oxyder l'acétaldéhyde en acétate, avec une affinité pour l'acétaldéhyde environ 1000 fois plus grande que pour l'éthanol (Terelius *et al.*, 1991; Bell-Parikh et Guengerich *et al.*, 1999).

c) Oxydases flaviniques

La xanthine oxydase et l'aldéhyde oxydase catalysent l'oxydation de l'acétaldéhyde en acétate par l'intermédiaire de l'oxygène moléculaire. Au cours de cette réaction, elles génèrent également des radicaux O_2^{\bullet} qui peuvent conduire eux-même à la génération d' $^{\bullet}OH$ susceptibles d'initier la lipoperoxydation. Ces deux enzymes interviennent de façon minoritaire dans l'oxydation de l'acétaldéhyde toutefois elles engendrent une production de radicaux agressifs qui n'est pas négligeable. Expérimentalement, Shaw et collaborateurs ont montré que l'administration de tungstate (inhibiteur de la xanthine oxydase et de l'aldéhyde oxydase) ou d'allopurinol (inhibiteur de la xanthine oxydase) ou de menadione (inhibiteur de l'aldéhyde oxydase) sur des hépatocytes de rat entraînent respectivement une réduction de 85-90%, 35-50% et 100% de la lipoperoxydation induite par une alcoolisation chronique. Au travers de cette production de radicaux libres, l'aldéhyde oxydase pourrait donc jouer un rôle non négligeable dans les effets hépatotoxiques de l'alcool (Shaw *et al.*, 1990).

1.4.2.3. Destin de l'acétate

L'acétate peut-être transformé en acétyl-CoA dans les hépatocytes grâce à une thokinase cytosolique selon la réaction suivante:



L'acétyl-CoA est ensuite oxydé en CO_2 et H_2O au cours du cycle de Krebs. Cependant l'éthanol ne peut pas être totalement métabolisé au niveau du foie. En effet, 25% de l'acétate issu du métabolisme hépatique de l'éthanol est exporté vers les tissus extrahépatiques pour y être dégradé (Karlsson *et al.*, 1975). A l'origine de cela, deux raisons :

a) Hyperproduction cytosolique de NADH

Au cours du métabolisme de l'éthanol, les enzymes ADH et ALDH1 concourt à la réduction du NAD^+ en NADH. Or, il est indispensable que ce NADH soit réoxydé en NAD^+ pour que le métabolisme de l'éthanol puisse se poursuivre. Des processus enzymatiques tels que la lactate déshydrogénase utilise le NADH pour réduire le pyruvate en lactate (Kreisberg, 1967).

-Synthèse bibliographique-

Cependant ces mécanismes cytosoliques sont généralement insuffisants pour régénérer le NAD⁺ en quantité suffisante pour le catabolisme de l'éthanol. La participation de la chaîne respiratoire mitochondriale est donc indispensable à la réoxydation du NADH cytosolique.

b) Transfert du NADH du cytosol vers la mitochondrie

Le NADH traverse la membrane mitochondriale interne grâce à la navette malate-aspartate (figure 2). La malate déshydrogénase (MDH cytosolique) permet l'oxydation du NADH cytosolique en NAD⁺ par la réduction du malate en oxaloacétate. Le malate traverse la membrane mitochondriale puis est oxydé en oxaloacétate par la MDH mitochondriale avec réduction concomitante du NAD⁺ en NADH. Ce NADH mitochondrial est à son tour réoxydé par la chaîne respiratoire, parallèlement le malate est oxydé en oxaloacétate. L'oxaloacétate se transforme en aspartate et traverse la membrane mitochondriale pour rejoindre le cytosol.

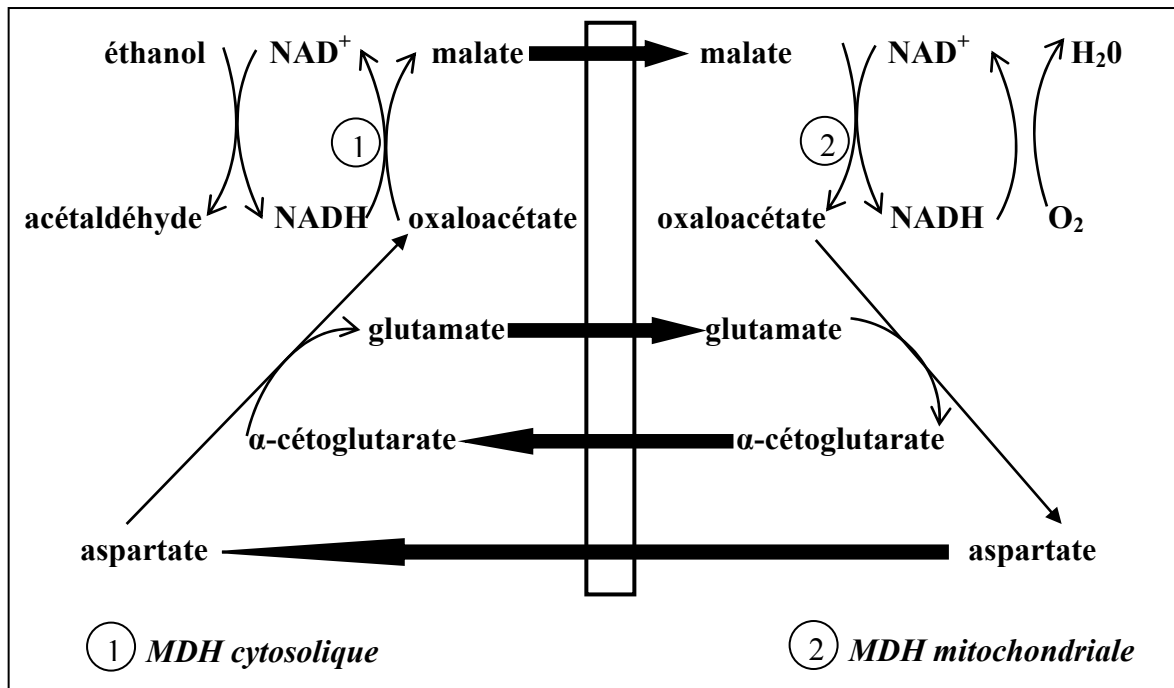


Figure 2 : Système de transfert du NADH par la navette malate-aspartate.

L'ALDH2 génère également du NADH en oxydant l'acétaldéhyde dans la mitochondrie. Cette production vient donc s'ajouter aux équivalents réduits transportés vers la mitochondrie. Le métabolisme de l'éthanol produit donc un excès de NADH dans la mitochondrie et ceci constitue le facteur essentiel de la métabolisation partielle de l'acétate dans le foie. En effet, en dehors de toute prise d'alcool, le NADH mitochondrial hépatique est formé au cours de la β-oxydation et du cycle de Krebs et sert à alimenter la chaîne

-Synthèse bibliographique-

respiratoire. Cependant, cette chaîne respiratoire a une capacité limitée et ne peut donc absorber tout ce NADH (Hasumura *et al.*, 1976). En conséquence, l'afflux d'équivalents réducteurs secondaires à l'oxydation de l'éthanol entraîne une réduction excessive du NAD⁺ mitochondrial. Il en résulte une carence en NAD⁺ et donc une inhibition du métabolisme de l'acétate et du catabolisme des acides gras dans les hépatocytes (Cederbaum *et al.*, 1975). Quant aux tissus extrahépatiques, ils métabolisent l'éthanol à une vitesse trop lente pour pouvoir générer un excès d'équivalents réducteurs donc l'oxydation de l'acétate ne peut pas être inhibée dans les cellules extrahépatiques.

1.4.3. Voies non oxydatives

Le système nerveux central (Laposata *et al.*, 1987) et le cœur (Lange *et al.*, 1981) ont des capacités oxydatives limitées pour métaboliser l'éthanol. Ces tissus vont donc métaboliser l'éthanol par des systèmes non oxydatifs comme des glutathion-S-transférases qui utilisent l'éthanol pour former des esters éthyliques d'acides gras (Laposata et Lange, 1986). Bien que minoritaire, cette voie métabolique semble contribuer aux effets cytotoxiques de l'alcool sur ces tissus. Dans le cœur, l'alcoolisation chronique entraîne une hyperproduction d'esters éthyliques d'acides gras. Ces molécules sont non chargées et se lient préférentiellement à des structures hydrophobes comme les membranes mitochondriales. L'accumulation d'esters éthyliques d'acides gras autour de la mitochondrie entraîne un dysfonctionnement de la fonction mitochondriale qui peuvent être à l'origine des effets cardiotoxiques de l'alcoolisation chronique (Lange et Sobel, 1983).

1.5. L'alcool, un remède connu depuis l'antiquité

Cette partie est dédiée aux vertus de l'alcool et plus exactement à celle du vin. Loin d'être une apologie à la consommation de boissons alcoolisées, cette section est plutôt un clin d'œil à nos ancêtres, initiateur de la nutrithérapie. Au fil des siècles, leurs connaissances sur les vertus des aliments se sont étoffées. Aujourd'hui, ce savoir est devenu une science et aussi une médecine douce qui permet de prévenir et soigner de nombreuses maladies.

1.5.1. Période de l'Antiquité

La plus ancienne mention d'un usage thérapeutique et médicamenteux du vin remonte à 4000 ans avant J-C, date à laquelle une inscription vantant les vertus du vin a été découverte dans une tombe Egyptienne. Le vin a toujours été étroitement lié à la vie spirituelle des hommes.

-Synthèse bibliographique-

Dans la mythologie grecque, Dionysos incarne le dieu de la vigne, du vin et des excès. Le vin est également un symbole divin pour tous les chrétiens du monde puisqu'il symbolise le sang du Christ depuis 2000 ans. C'est avec Hippocrate, père de la médecine moderne, que le vin connaît une véritable consécration thérapeutique. Selon lui : *"le vin est une chose merveilleusement appropriée à l'homme si, en santé comme en maladie, on l'administre avec à propos et juste mesure, suivant la constitution individuelle"*. Un peu plus tard, Théophraste (372-287 av. J.C) invente les vins médicinaux en y mélangeant des herbes et des épices. Platon quant à lui, en recommande l'usage modéré pour réchauffer à la fois l'âme et le corps. Dans l'un de ses ouvrages, il dit que le vin : *"apporte à la fois santé, divertissement aux hommes d'âge"* et assure que le vin : *"leur a été donné par un Dieu comme remède à l'austérité de la vieillesse"*.



Dans la Rome Antique, Bacchus (représenté ci-contre) remplace le dieu grec Dionysos. Le produit de la vigne n'a pas pour autant perdu de ses qualités thérapeutiques. D'ailleurs, Pline l'Ancien rappelle les applications médicales du vin, du sarment, de la feuille de vigne et des pépins de raisin dans son traité d'histoire naturelle. Rejoignant les enseignements d'Hippocrate, il confirme: *"le vin à lui seul est un remède; il nourrit le sang de l'homme, réjouit l'estomac et amortit chagrin et souci"*. Néanmoins, il mettait déjà en garde les gros buveurs contre les redoutables effets d'abus de vin

1.5.2. Du Moyen âge à la Renaissance

Durant cette époque, les travaux d'Hippocrate sont temporairement oubliés. Seuls les moines qui sont aussi des viticulteurs, continuent à soigner avec le vin. Saint Benoît (480-547), moine fondateur de l'ordre des bénédictins, conscient des vertus du *"breuvage sacré"*, recommandait à ses frères de consommer ¼ de litre de vin au cours des repas monastiques pour qu'ils restent toujours au mieux de leur forme. Au IX^{ème} siècle, la conviction des vertus thérapeutiques refait surface. A Salerne (Italie), la porte d'entrée de l'hôpital porte la citation: *"Bois un peu de vin"*. Dans cette même ville, la bibliothèque de la faculté de médecine détient des ouvrages sur les bienfaits du vin. On peut y lire notamment : *"Le bon vin donne aux vieux un regain de jeunesse. Le vin pur a de multiples bienfaits, il tonifie le cerveau met l'estomac en liesse, chasse les humeurs mauvaises. Il rend l'esprit vif, les yeux brillants, l'oreille fine, dispense l'embonpoint et donne dans la vie*

-Synthèse bibliographique-

une santé robuste". A cet enseignement, les maîtres de la faculté ajoutaient déjà ce conseil judicieux (et toujours d'actualité): *"buvez-en peu, mais qu'il soit bon"*. Le début du XIII^{ème} siècle marque le début de la faculté de médecine de Montpellier où l'on retrouve des écrits médicaux montrant que la moitié des remèdes médicinaux contenaient du vin. Durant la Renaissance, François Rabelais (1494-1553), docteur en médecine de cette même faculté, proclamait haut et fort les vertus du vin en disant que: *"Le jus de la vigne clarifie l'esprit et l'entendement, chasse tristesse, donne joie"*. Quant à Montaigne (1532-1592), homme de lettres, moraliste et vigneron bordelais, il soignait ses calculs urinaires au vin. Ambroise Paré (1509-1590), chirurgien des rois de France, appliquait des cataplasmes de vin rouge sur les blessures reçues par ses patients au cours de leurs campagnes guerrières. Un siècle plus tard, apparaît le baume du Samaritain, préparation consignée dans la "Pharmacopée universelle" (1677), à base d'un mélange d'huile et de vin rouge qui servait soit en usage externe au nettoyage des plaies et à leur cicatrisation, soit en usage interne pour aider à fortifier les nerfs (selon les termes autrefois usités).

1.5.3. Du siècle des Lumières à 1900

Les connaissances sur le vin progressant, il tend à occuper une place encore plus importante dans les prescriptions médicales. Au début du XVIII^{ème} siècle, Helvétius (1715-1771), médecin de Louis XV, avait, sur un total de 60 ordonnances, consigné plus de 20 fois l'usage du vin à son malade. Il déclarait : *" il ne faut pas s'opposer à l'usage modéré du vin car il est utile et même nécessaire pour faciliter la digestion et fortifier l'estomac du convalescent"*. En 1822, le neurologue français Magendie conseillait aux malades du choléra de boire du vin de Bordeaux. Par la suite, Todd crée l'éthylothérapie et le vin devient alors un remède officiel pour lutter contre cette maladie. Des praticiens comme Chomel, Sabrazès, Mercadier constatent que le vin du Médoc détient un pouvoir bactéricide contre certaines maladies. Le XIX^{ème} siècle est aussi la grande époque des vins médicinaux: le vin de gentiane pour améliorer la digestion, le vin de quinine pour faire baisser la fièvre... Les affiches publicitaires de l'époque proclament que *"le vin, c'est la santé"*. Louis Pasteur (1822-1895) apporte sa contribution à cette promotion en annonçant que *"le vin est la plus saine et la plus hygiénique des boissons"*. Parallèlement, Pasteur milite dans des ligues antialcooliques, qui visaient essentiellement l'alcool de distillation et plus particulièrement l'absinthe mais en aucun cas le vin. Dans une période où naît la lutte antialcoolique, le Docteur Guyot, oppose *"le vin naturel, alimentaire et bienfaisant"* aux alcools de distillation, comme l'absinthe qui commence à faire des ravages.

1.5.4. L'ère Moderne

En 1904, le Docteur Gauthier, membre de l'Institut et de l'Académie de Médecine, approuve l'usage modéré du vin : "C'est un aliment précieux tant qu'on ne dépasse pas la dose de 1g d'alcool/kilo et par jour". En toute logique, un sujet de 80 kg ne devrait donc pas dépasser la consommation d'un litre de vin ! En 1935, le Docteur Dougnac défend la "vinothérapie" et démontre que les régions viticoles du Bordelais sont moins touchées par l'alcoolisme et profite d'une longévité plus longue par rapport aux autres régions françaises. Après la seconde guerre mondiale, une politique de prévention. Les ligues antialcooliques en profitent pour occuper le terrain, faisant un amalgame entre le vin et l'alcool. Par la suite, des lois destinées à lutter contre l'alcoolisme paraissent et vont injustement bâillonner le monde viticole, contribuant indirectement à jeter la suspicion sur l'intérêt sanitaire du vin. A la fin des années 1970, parler de l'effet bénéfique du vin sur la santé paraissait une contre-vérité. La lutte contre l'alcoolisme était telle que l'opinion et les pouvoirs publics négligeaient de s'intéresser aux possibles bienfaits du vin. Depuis une quinzaine d'années, l'intérêt du vin sur la santé est relancé. Au début des années 90, une émission diffusée sur la chaîne américaine CBS provoqua une ruée vers les rayon vins des supermarchés. Les téléspectateurs d'Outre-Atlantique venaient en effet d'y apprendre que les français buvaient régulièrement du vin rouge et que, malgré une consommation importante de graisses saturées, ils présentaient le plus bas taux d'accidents cardiovasculaires C'est ainsi que le vin rouge se retrouva subitement sous le feu des projecteurs du monde entier.

II. Les acides gras

2.1. Introduction

Les acides gras appartiennent à la classe des lipides et sont présents chez tous les êtres vivants. Les acides gras sont principalement estérifiés à des alcools comme le glycérol, la sphingosine ou le cholestérol. De petites quantités se retrouvent sous forme d'acides gras non estérifiés, désignés sous le terme d'acides gras libres.

Les acides gras ont au moins 4 rôles physiologiques majeures :

- rôle structural: entre dans la composition des membranes biologiques
- rôle énergétique: carburant énergétique essentiel pour de nombreux types cellulaires
- précurseurs des eicosanoïdes: prostaglandines et leucotriènes
- rôle de médiateur: régulation de la transmission membranaire du signal :

2.2. Structures et nomenclatures des acides gras

Les acides gras sont des acides organiques possédant une longue chaîne hydrocarbonée. Ils se distinguent par leur nombre de carbones et de doubles liaisons (figure 3).

Les acides gras trouvés dans les graisses naturelles sont des dérivés à chaîne linéaire et contiennent un nombre pair d'atomes de carbone car ils sont synthétisés à partir d'éléments à 2 carbones. La numérotation de la chaîne carbonée (figure 3) part du carbone du groupement carboxyle (carbone n° 1). L'atome adjacent au carbone carboxylique (n° 2) est aussi connu comme étant le carbone α . L'atome de carbone n° 3 est le carbone β et le carbone méthylique terminal est connu sous le nom de carbone ω ou carbone n .

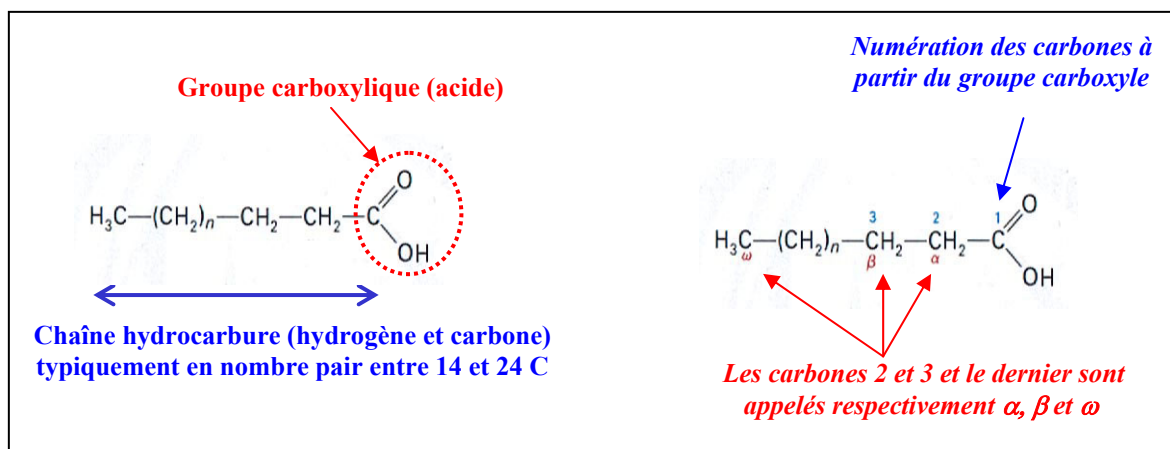


Figure 3 : Structure d'un acide gras.

Suivant la longueur de sa chaîne carbonée, un acide gras est dit à :

- courte chaîne si le nombre d'atomes de carbones est ≤ 6
- moyennes chaînes si le nombre d'atomes de carbones est entre 10 et 14
- longue chaînes si le nombre d'atomes de carbones est entre 16 et 18
- très longues chaînes (AGPI-TLC) si le nombre d'atomes de carbones est ≥ 20

Le nom d'un acide gras est formé à partir du nom de l'hydrocarbure à même nombre d'atomes de carbone suivi du suffixe -anoïque pour les acides gras sans double liaison et par -énoïque pour les acides gras avec double(s) liaison(s).

Certains acides gras n'ont pas de double liaison, ils sont dits saturés. D'autres comportent une ou plusieurs doubles liaisons, ils sont alors dits acides gras moninsaturés (AGMI) ou acides gras polyinsaturés (AGPI) respectivement (figure 4).

-Synthèse bibliographique-

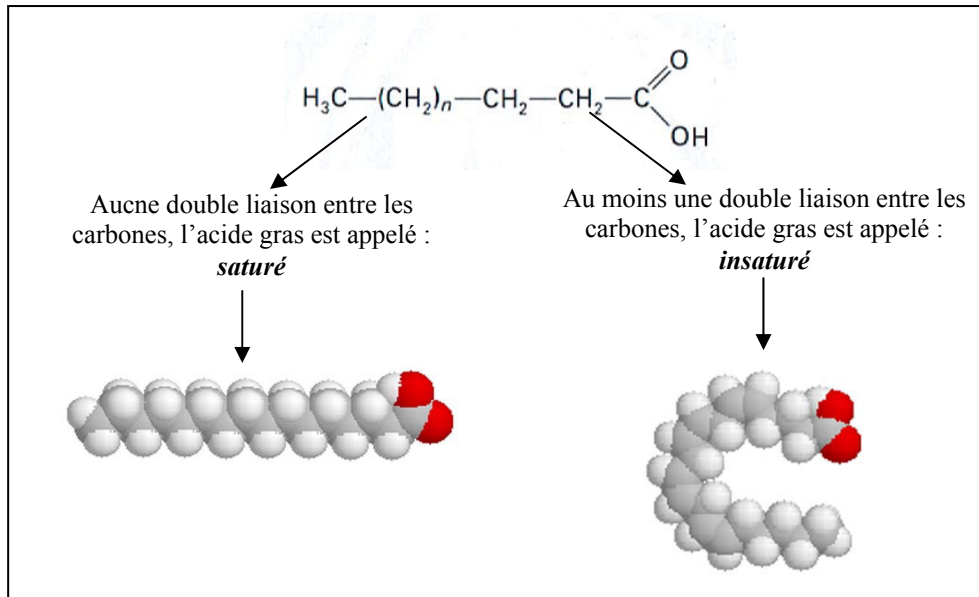


Figure 4 : Structures des acides gras saturés et des acides gras insaturés.

La position de la première double liaison est toujours comptabilisée à partir de l'extrémité méthyle. Pour tout AGPI, les doubles liaisons sont toujours espacées d'un groupe méthylène et le sens de la désaturation est toujours réalisée en direction du groupe carboxyle. Diverses conventions sont utilisées pour indiquer le nombre et la position de la ou des doubles liaisons (figure 5).

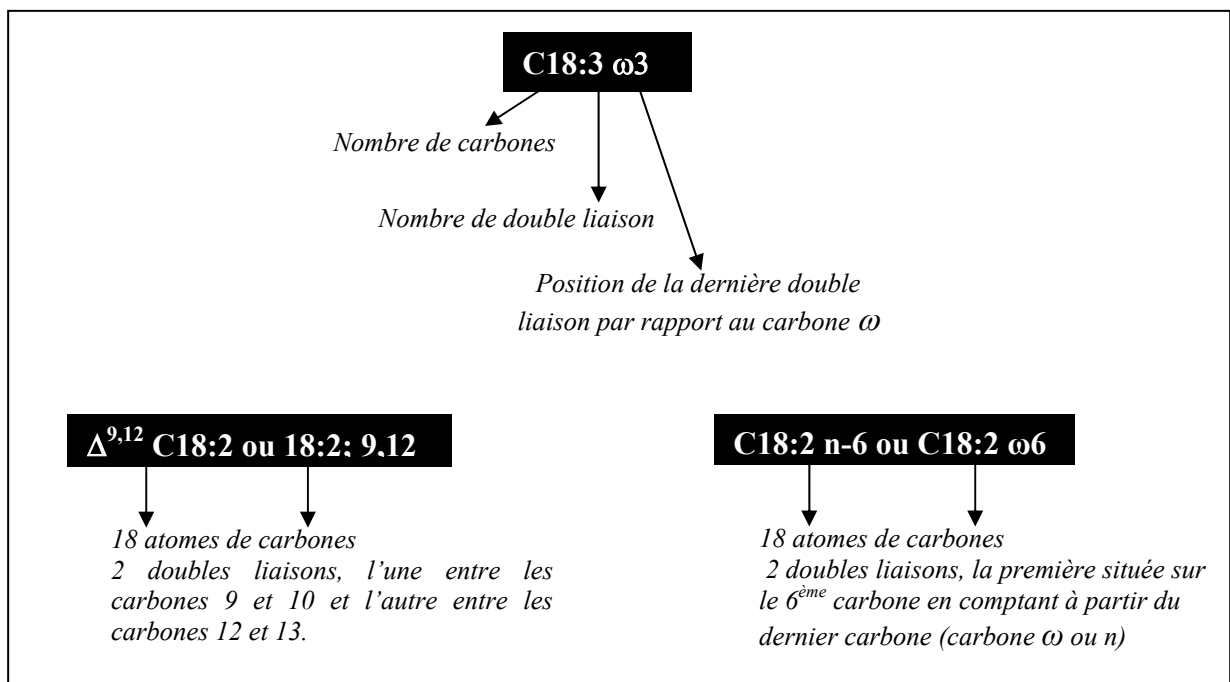


Figure 5 : Nomenclatures des acides gras.

-Synthèse bibliographique-

Comparés aux végétaux, l'homme et l'animal sont incapables d'insérer des doubles liaisons en position n-6 et n-3 sur des acides gras à 18 carbones. Autrement dit, le règne animal est incapable de synthétiser les précurseurs des séries n-6 et n-3. Ces acides gras sont alors considérés comme des acides gras essentiels et doivent donc être obligatoirement apportés par l'alimentation (voir tableau 2). Ces acides gras essentiels sont représentés par l'acide linoléique (LA, C18:2 n-6) précurseur de la série ω 6 et l'acide linoléique (ALA, C18:3 n-3) précurseur de la série ω 3. Toutefois, l'homme et l'animal peuvent ajouter des doubles liaisons et allonger les chaînes carbonées de ces acides gras essentiels. Ces réactions sont catalysées à partir de l'extrémité carboxyle à l'aide de désaturases et d'élongases. A noter cependant que les réactions de désaturations et d'élongations sont lentes et limitées et que l'activité de ces enzymes n'est pas toujours suffisante pour fournir à l'organisme, une quantité nécessaire en AGPI à longues et très longues chaînes. Il est donc souhaitable que l'alimentation fournisse des acides gras essentiels en quantité adaptée et aussi leurs dérivés à longues et très longues chaînes. Le tableau 2 récapitule d'ailleurs les différents acides gras que l'on peut consommer au travers de notre alimentation.

2.3. Propriétés physico-chimiques des acides gras

Les chaînes carbonées des acides gras saturés adoptent une conformation linéaire (figure 6). A températures basses, cette chaîne est en extension. A températures plus élevées, quelques liaisons pivotent causant un rétrécissement de la chaîne ce qui explique pourquoi les membranes s'amincissent avec l'augmentation de la température.

En ce qui concerne les acides gras insaturés, il existe des isomères géométriques d'acides gras (figure 6). C'est-à-dire que pour un acide gras insaturé donné, un groupement carbonyle peut s'orienter différemment autour de l'axe de double liaison. Si les chaînes alkylées se trouvent du même côté de la liaison, elles sont en configuration *cis*. Si à l'inverse elles sont situées de part et d'autre de la double liaison, elles sont en configuration *trans*.

Les acides gras insaturés naturels sont presque tous de configuration *cis*. La molécule forme un repli de 120° au niveau du site de la double liaison. Ainsi, l'OA, 1 liaison *cis*, prend la forme L tandis que l'acide élaïdique, son isomère, demeure rectiligne à l'endroit de sa double liaison *trans*. L'accroissement du nombre de doubles liaisons *cis* dans un acide gras amène la molécule à adopter une diversité de configurations spatiales comme par exemple l'ALA qui avec 3 doubles liaisons *cis*, prend une forme en J (figure 6).

-Synthèse bibliographique-

Nomenclature	Nom chimique	Nom vulgaire	Sources
C4:0	-ac. butanoïque	-ac. butyrique	En faible quantité dans le beurre et autres produits laitiers
C6:0	-ac. hexanoïque	-ac. caproïque	
C8:0	-ac. octanoïque	-ac. caprylique	En faible quantité dans les graisses végétales, beurre et autres produits laitiers.
C10:0	-ac. décanoïque	-ac. caprique	
C12:0	-ac. didécanoïque	-ac. laurique	Huile de : palmiste, noix de coco, coprah. Beurre et autres produits laitiers,
C14:0	-ac. tétradécanoïque	-ac. myristique	Huile de: palmiste, noix de coco, coprah. Beurre et autres produits laitiers,
C16:0	-ac. hexadécanoïque	-ac. palmitique	Saindoux, jaune d'œuf, viande, beurre et autres produits laitiers, noix, margarine, beurre de cacao, huile de palme et de noix de coco.
C16:1 n-7	-ac. <i>cis</i> -9 hexadécaénoïque	-ac. palmitoléique	Dans presque toutes les graisses.
C18:0	-ac. octadécanoïque	-ac. stéarique	Beurre de cacao et graisses animales: viande, beurre et autres produits laitiers.
C18:1 n-9	-ac. <i>cis</i> -9 octadécaénoïque	-ac. oléique -OA	Huile de: palme, olives, arachide. Viande, beurre de cacao, avocat, oléagineux, beurre et autres produits laitiers,
C18:2 n-6	-ac. <i>cis</i> -9,12 octadécadiénoïque	-ac. linoléique -LA	Margarine, huile de: maïs, tournesol, soja, noix, sésame carthame.
C18:3 n-6	-ac. <i>cis</i> -6,9,12 octadécatriénoïque	-ac. γ -linoléique -GLA	Algues, Huile de bourrache et d'onagre.
C18:3 n-3	-ac. <i>cis</i> -9,12,15 octadécatriénoïque	-ac. α -linoléique -ALA	Pourpier, mâche, Huile de: lin, colza, noix.
C20:0	-ac. eicosanoïque	-ac. arachidique	Lard, huile d'arachide
C20:4 n-6	-ac. <i>cis</i> -5,8,11,14 eicosatétraénoïque	-ac. arachidonique -AA	Graisses animales: beurre, fromage viande, œuf.
C20:5 n-3	-ac. <i>cis</i> -5,8,11,14,17 eicosapentaénoïque	-ac. timnodonique -EPA	Algues, poissons gras (maquereau, sardine, hareng, saumon), huile de poissons gras.
C22:0	-ac. docosanoïque	-ac. béhénique	En infime quantité dans les huiles végétales.
C22:5 n-3	-ac. <i>cis</i> -7,10,13,16,19 docosapentaénoïque	-ac. lupanodonique -DPA	Algues, poissons gras (maquereau, sardine, hareng, saumon), huile de poissons gras.
C22:6 n-3	-ac. <i>cis</i> -4,7,10,13,16,19docosahexaénoïque	-ac. cervonique -DHA	Algues, poissons gras (maquereau, sardine, hareng, saumon), huile de poissons gras.
C24:0	-ac. tétracosanoïque	-ac. lignocérique	Huile d'arachide

Tableau 2 : Nomenclature et sources alimentaires des principaux acides gras.

(Source : www.nal.usda.gov/fnic/cgi-bin/nut)

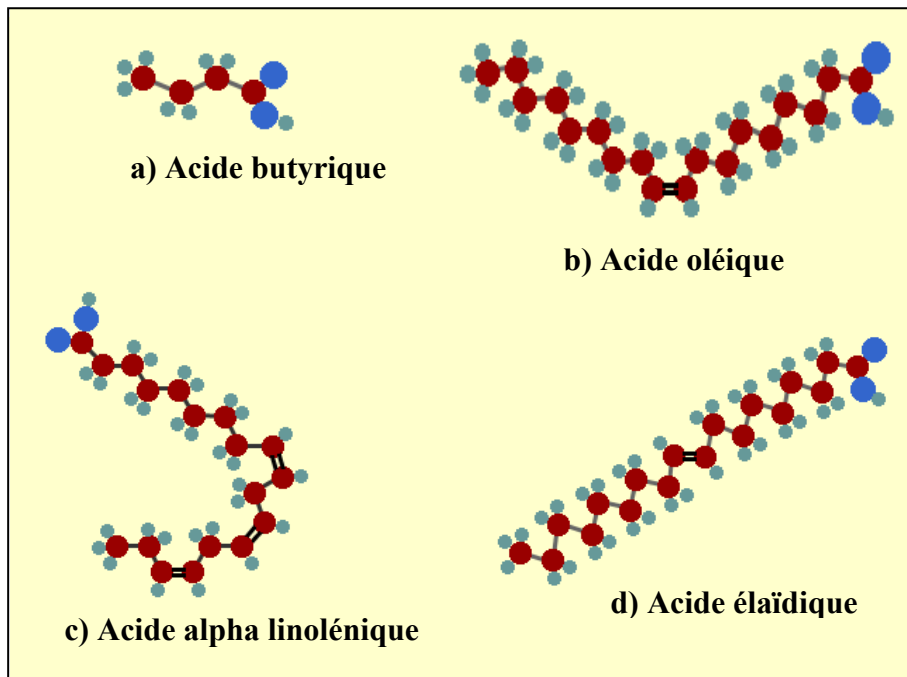


Figure 6 : Conformation linéaire d'un acide gras saturé (a), configuration *cis* d'un acide gras mono- (b) et polyinsaturé (c), configuration *trans* d'un acide gras insaturé (d) et isomères géométriques (b,d).

Au niveau membranaire, les acides gras insaturés introduisent une perturbation qui se traduit par une mobilité plus importante (fluidité membranaire plus élevée). Cependant la présence de doubles liaisons *trans* va modifier ces relations spatiales. Les acides gras *trans* sont présents dans certains aliments. La plupart sont formés au cours de l'hydrogénation des huiles, un procédé qui permet de solidifier l'huile en margarine. La graisse des ruminants contient également des acides gras *trans* produits par les microorganismes du rumen. Dans notre alimentation quotidienne, on peut donc retrouver des acides gras *trans* dans les margarines, la viande et les produits laitiers provenant des ruminants ainsi que tous les produits transformés contenant produits laitiers et graisses hydrogénées.

Les propriétés physiques des acides gras dépendent de la longueur de la chaîne et du degré d'insaturation. Ainsi, le point de fusion des acides gras augmente avec la longueur de la chaîne et diminue avec le degré d'insaturation. C'est pour cela qu'à température ambiante, le beurre, riche en acides gras saturés à chaînes courtes, est de consistance solide comparé à une huile végétale qui contient davantage d'acides gras insaturés à chaînes moyennes et longues. Sur le même principe, les lipides membranaires contiennent plus d'acides gras insaturés que les lipides de réserves car ils doivent rester fluides à toutes les températures ambiantes. C'est également le cas pour les hibernants dont la graisse, riche en acides gras insaturés, permet de conserver une certaine fluidité.

2.4. Origines des acides gras

2.4.1. Source exogène

Dans le cas d'une alimentation équilibrée, les lipides représentent environ 30% de nos apports énergétiques quotidiens. Une classification des lipides est présentée dans la figure 7.

Les lipides alimentaires sont majoritairement ingérés sous forme de triglycérides (90 à 95%). Les phospholipides, les acides gras libres et les stérols (cholestérol et phytostérols) ne représentent que 5-10% des lipides de notre alimentation. Avant d'être utilisés par l'organisme, les lipides alimentaires suivent un parcours tumultueux au cours duquel ils subissent digestion, absorption et transport vers les cellules utilisatrices.

a) Digestion

La digestion des lipides alimentaires commence dans la cavité buccale avec la salivation et la mastication puis continue dans l'estomac. La lipase salivaire et la lipase gastrique permettent une hydrolyse en position sn-3 des triglycérides ingérés, préférentiellement des acides gras courts. A l'entrée de l'intestin grêle, 70% des graisses alimentaires sont encore sous la forme de triglycérides non hydrolysés. La bile et la lipase pancréatique qui se déversent dans le duodénum permettent la digestion de la majorité des lipides alimentaires (figure 8). L'action détergente des sels biliaires permet la transformation des amas lipidiques en émulsion (micelles). Les triglycérides et autres lipides sont ainsi rendus accessibles aux différentes lipases pancréatiques:

- la cholestérol ester hydrolase permet le clivage entre l'acide gras estérifié et la molécule de cholestérol.
- la triglycéride lipase hydrolysent les liaisons esters des triglycérides en position sn-1 et sn-3 du glycérol. Deux acides gras et du 2-monoacylglycérol sont ainsi libérés.
- les phospholipases A1 et A2 attaquent les phospholipides en position sn-1 et sn-2 du glycérol aboutissant ainsi à la libération de 2 acides gras et de lysophospholipide
- la phospholipase C hydrolyse la liaison ester entre le glycérol et le groupement phosphate.
- la phospholipase D hydrolyse la liaison entre le groupement phosphate et l'amino- (ou sucre-) alcool qui fait la spécificité du phospholipide.

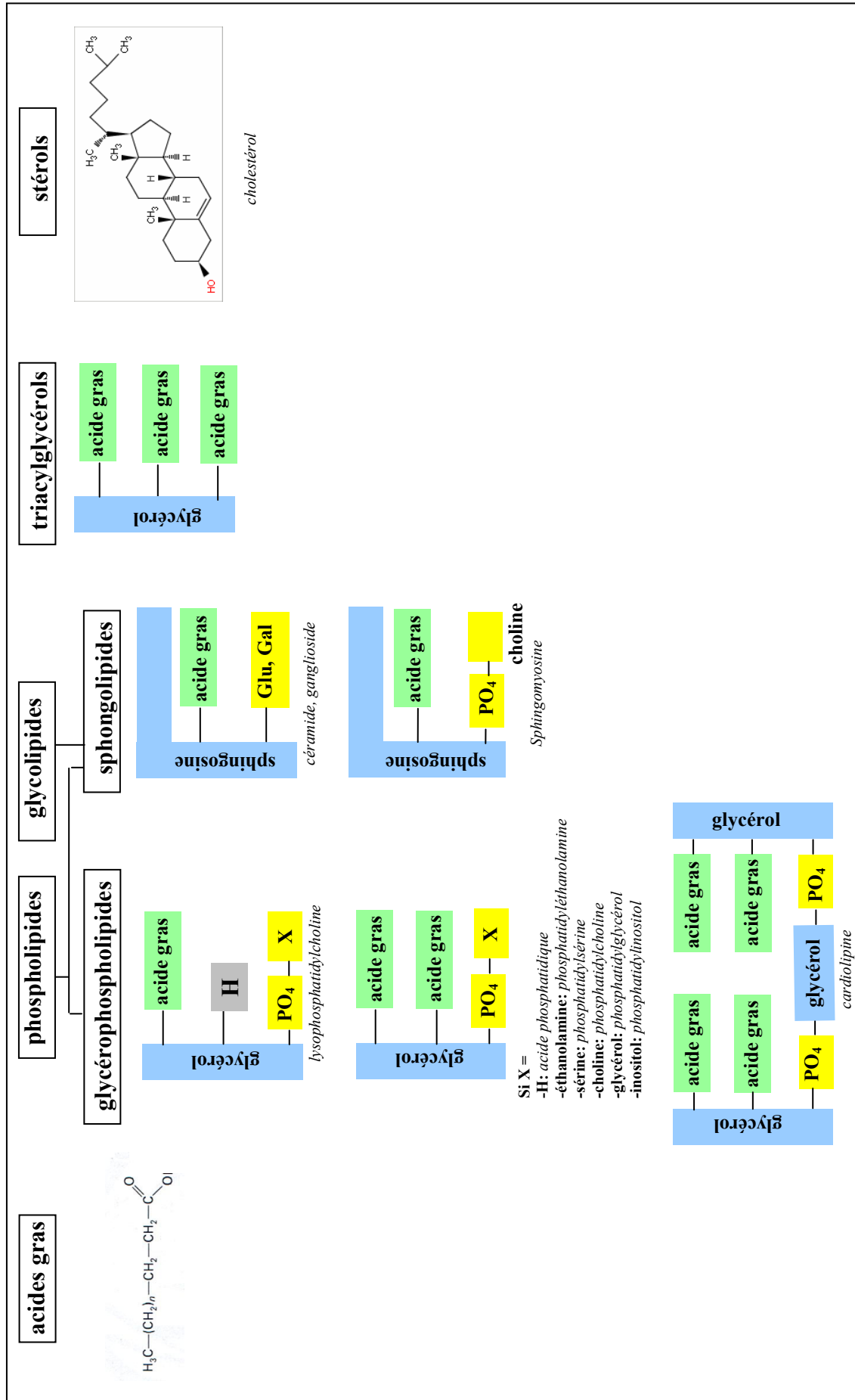


Figure 7 : Classification des lipides.

b) Absorption

Après l'action complète des lipases, les micelles sont absorbées par les entérocytes (cellules absorbantes de l'intestin grêle). Les acides gras sont ensuite pris en charge par un transporteur spécifique qui les achemine dans le réticulum endoplasmique lisse. Les 2-monoacylglycérols rejoignent les acides gras par diffusion passive. Acides gras et monoacylglycérols se recombinaient en triacylglycérols grâce à l'acyl-CoA monoglycérol acyltransférase (MGAT) et l'acyl-CoA diacylglycérol acyltransférase (DGAT) du réticulum endoplasmique (figure 8).

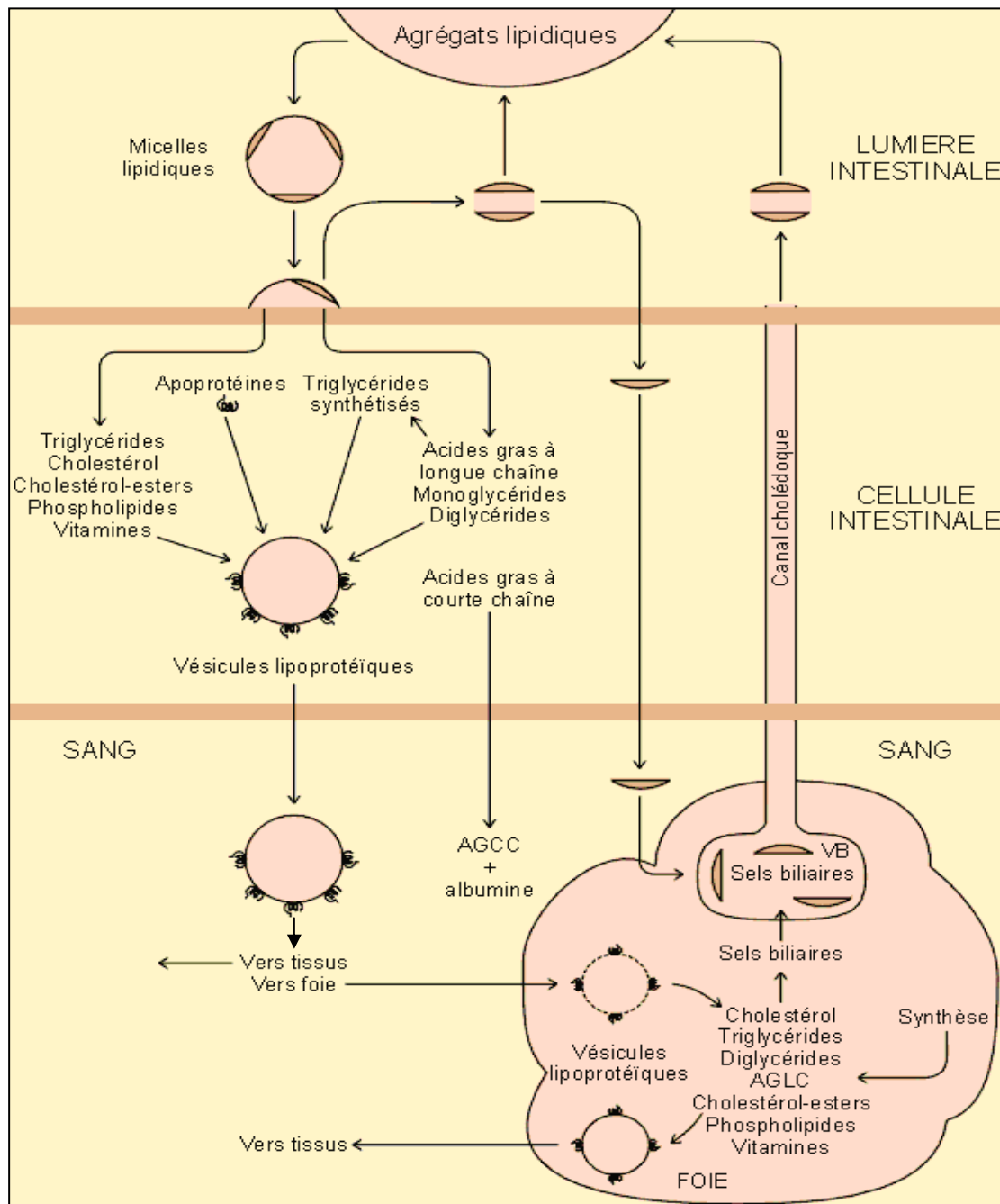


Figure 8 : Digestion des lipides et leur assimilation.
(Source: http://obnet.chez-alice.fr/images/assimil_lipides.gif).

-Synthèse bibliographique-

Les phospholipides sont également resynthétisés à partir d'acides gras et d'acide phosphatidique. Le cholestérol absorbé est majoritairement ré-estérifié sous l'action de l'acyl-CoA cholesterol acyltransferase (ACAT).

c) Transport plasmatique des lipides alimentaires

Les lipides étant insolubles en milieu aqueux, des lipoprotéines permettent leur transport à travers le plasma sanguin (figure 8). Les triglycérides, les phospholipides et le cholestérol sont donc assemblés au niveau microsomal avec de l'apolipoprotéine (apo B48) sous l'action de la protéine de transfert microsomal (MTP), formant ainsi des lipoprotéines appelées chylomicrons, sécrétées au pôle basolatéral de l'entérocyte. Les chylomicrons sont ensuite conduits par la lymphe vers la veine cave supérieure pour rejoindre la circulation sanguine. Les chylomicrons vont rapidement perdre la plus grande partie de leurs triglycérides. Fixée à la surface des capillaires sanguins, une lipoprotéine lipase (LPL) va hydrolyser les triglycérides. Des acides gras sont alors libérés et captés par les tissus sous-jacents pour fournir de l'énergie aux muscles squelettiques ou servir de lipides de réserve dans le tissu adipeux. Après ce relargage, les chylomicrons deviennent des remnants de chylomicrons qui sont captés par des récepteurs hépatiques aux LDL ou LRP (LDL receptor related protein), puis endocytés et dégradés dans l'hépatocyte sous l'action de la lipase hépatique (HL) où ils libèrent du cholestérol, des acides gras, du glycérol, du di- et du monoglycérol d'origine alimentaire (figure 8)

2.4.2. Sources endogènes

L'organisme possède trois moyens pour subvenir à ses besoins en acides gras :

- mobilisation des lipides du foie
- lipolyse ou hydrolyse des triglycérides du tissu adipeux
- biosynthèse des acides gras ou synthèse *de novo* des acides gras.

2.4.2.1. Mobilisation des lipides hépatiques

Hors période post-prandiale, le foie libère ses lipides dans le plasma sous forme de lipoprotéines. A jeûne, c'est en effet les lipoprotéines de très basse densité (VLDL) qui assurent le transport de 60 % des triglycérides circulants. Les VLDL sont synthétisés dans le foie à partir de lipides stockés ou synthétisés par le foie et d'apo B100 sous l'action de la MTP. Les VLDL sont libérés dans le plasma puis hydrolysés par la LPL permettant ainsi de

fournir un apport régulier en acides gras pour le métabolisme des tissus, notamment celui des muscles et du tissu adipeux.

2.4.2.2. Lipolyse

Les triglycérides de réserve constituent une source d'énergie utilisable par toutes les cellules. Lorsque les cellules extra-hépatiques ont besoin d'acides gras pour leurs besoins énergétiques, le tissu adipeux est capable d'hydrolyser ces triglycérides de réserve, c'est la lipolyse. La lipolyse est catalysée par des lipases selon deux étapes (figure 9):

- 1°) Des conditions comme : l'hypoglycémie, la diète prolongée, l'exercice physique ou le stress stimulent la sécrétion d'hormones (adrénaline, noradrénaline, glucagon, corticotropine, la thyrotropine, l'hormone de croissance et la vasopressine) qui activent une lipase hormono-sensible responsable de l'hydrolyse des triglycérides en 2-monoacylglycérol et deux acides gras.
- 2°) une lipase non hormono-indépendante, la monoacyl glycérol lipase, hydrolyse le 2-monoacylglycérol, libérant ainsi le glycérol et le dernier acide gras.

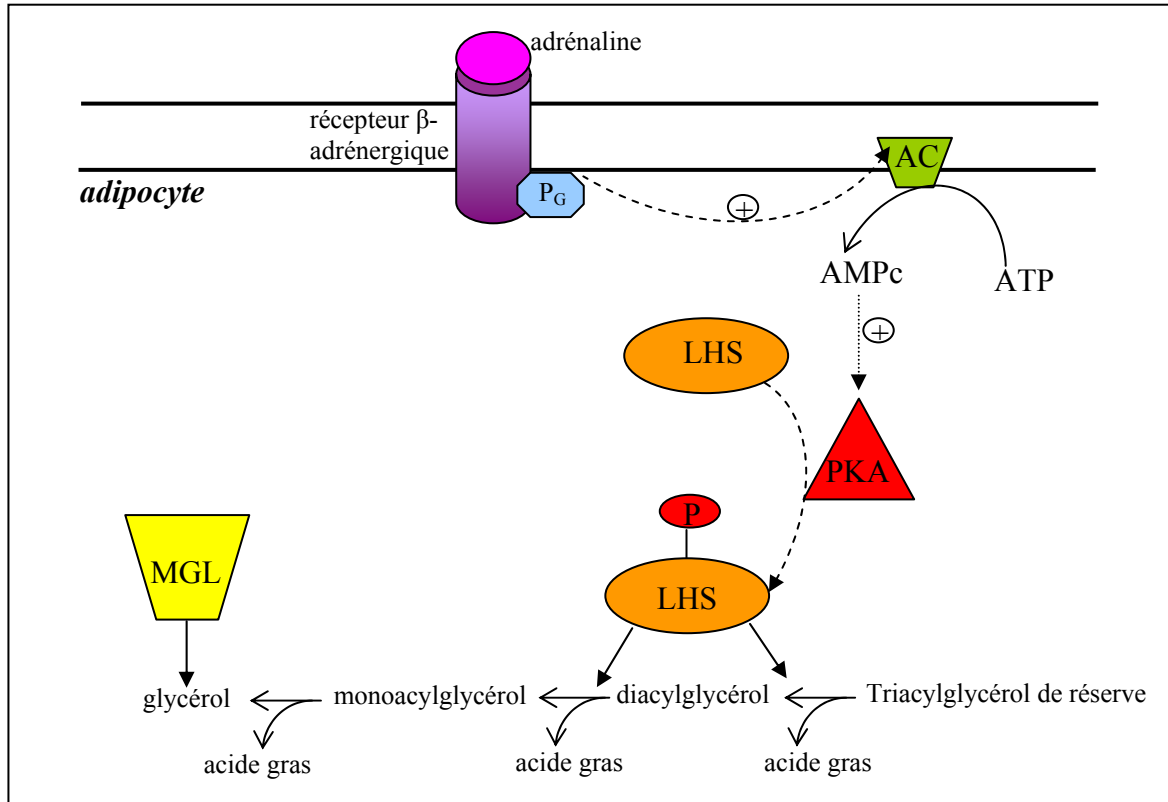


Figure 9 : Mécanismes de la lipolyse.

AC : adénylate cyclase; LHS: lipase hormono-sensible; MGL: monoacylglycérol; P_G: protéine G; PKA: protéine kinase A.

-Synthèse bibliographique-

Des acides gras sont alors libérés dans le plasma et se dirigent vers les cellules utilisatrices (foie, muscles, cœur) sous forme libre (c'est le cas des acides gras à chaînes courtes non estérifié) ou transportés par de l'albumine (c'est le cas des acides gras à chaînes plus longues donc moins hydrosolubles). Pour atteindre le cytosol de la cellule utilisatrice, le complexe acide gras/albumine doit traverser :

- la paroi endothéliale par fixation à des récepteurs spécifiques: albumin-binding protein (ABP) (Veerkamp et Maatman, 1995) et transcytose du complexe albumine/acides gras à travers les cellules endothéliales (Antohe *et al.*, 1993).
- la membrane plasmique par simple diffusion (Kamp et Hamilton, 1993).

Les acides gras sont ensuite pris en charge par des protéines de transport aux acides gras (FABP) pour circuler dans le cytosol. Cette protéine cytoplasmique existent sous 7 types différents : foie, cœur, intestin, adypocyte, myéline, iléon et épiderme (Veerkamp et Maatman, 1995). La FABP est ubiquitaire, la distribution de chaque type de FABP est caractéristique à chaque tissu. La FABP de type coeur est la plus universelle. La majorité de ces protéines lient un seul acide gras avec plus ou moins de spécificité. La FABP de coeur se lie préférentiellement aux acides gras insaturés et spécialement avec les acides gras insaturés à 18 carbones (Maatman *et al.*, 1994). Quant à la FABP de foie, c'est la seule à lier deux acides gras, elle a davantage de spécificité pour les acides gras insaturés que pour les acides gras saturés.

Quant aux acides gras activées (ou acyl-CoA), ils doivent se déplacer du cytosol vers des compartiments membranaires. Ils seront alors pris en charge par une protéine cytoplasmique et ubiquitaire (Knudsen *et al.*, 1993), la protéine de liaison aux acyl-CoA (ACBP).

2.4.2.3. Synthèse *de novo* des acides gras

Le foie et le tissu adipeux sont les principaux sites de synthèse des acides gras. La biosynthèse des acides gras saturés de 4 et 16 atomes de carbones se déroule dans le cytosol. Pour le reste des acides gras, la synthèse se poursuit dans le réticulum endoplasmique et le peroxyosome.

Toute synthèse d'acides gras nécessite de l'énergie (ATP), du pouvoir réducteur (NADPH, H⁺ et NADH, H⁺) et un précurseur, l'acétyl-CoA.

En préliminaire à toute synthèse d'acide gras, deux étapes sont indispensables:

a) Transfert de l'acétyl-CoA de la mitochondrie vers le cytosol

L'acétyl-CoA formé dans la mitochondrie (durant la glycolyse, la dégradation des alcools ou le métabolisme des acides aminés) doit être transporté vers le cytosol pour servir de précurseur à la synthèse des acides gras (figure 10). Pour cela, du pyruvate est exporté du cytosol vers la matrice mitochondriale pour être carboxylé en oxaloacétate par la pyruvate carboxylase. L'oxaloacétate et l'acétyl-CoA se condensent pour former du citrate qui traverse ensuite la membrane mitochondriale interne grâce la citrate translocase. Sous l'action d'une citrate synthase ATP-dépendante et en présence de HSCoA, le citrate est clivé en acétyl-CoA et en oxaloacétate qui, sous l'action de la malate déshydrogénase, régénère le pyruvate et permet la formation de NADPH, H^+ nécessaire à l'activité des réductases lors de la biosynthèse des acides gras.

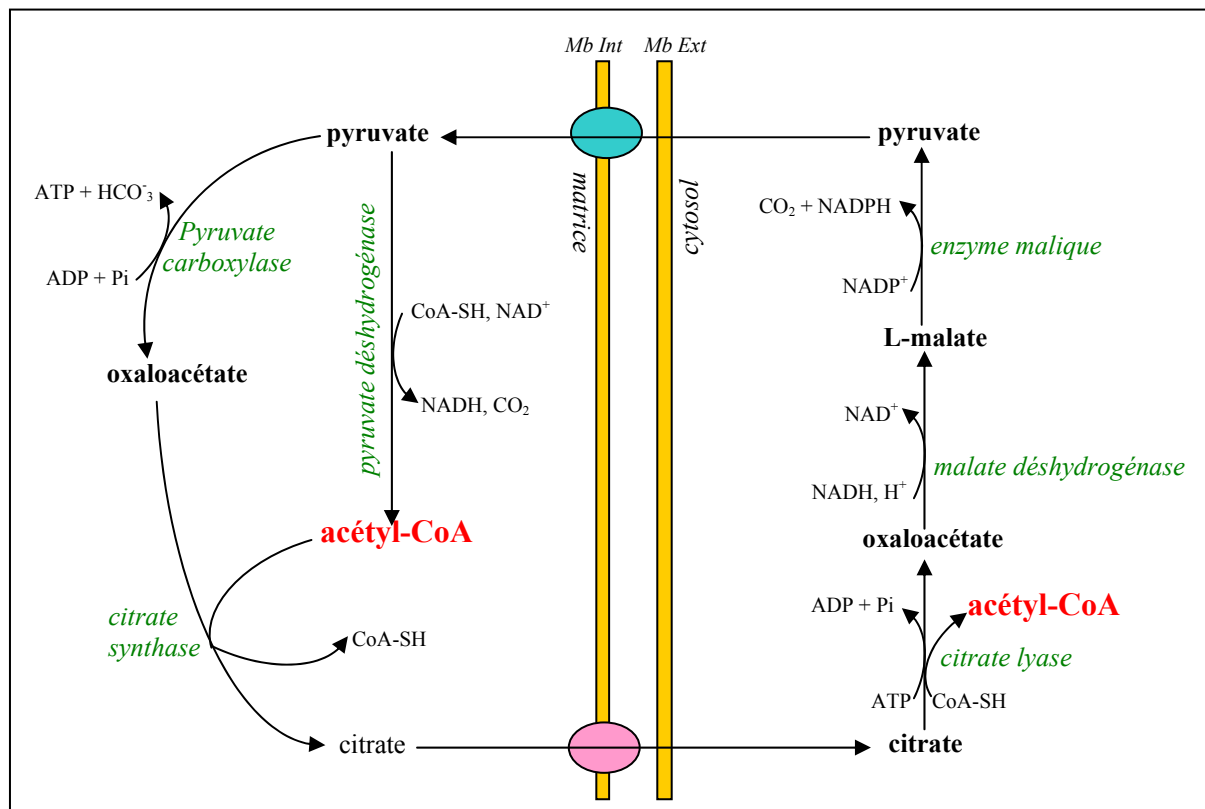


Figure 10 : Transfert de l'acétyl-CoA de la mitochondrie vers le cytosol.

b) Carboxylation de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA

L'acétyl-CoA carboxylase catalyse la carboxylation de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA (figure 11). Le groupement prosthétique de cet enzyme est une biotine. Grâce à l'hydrolyse de l'ATP, ce bras prosthétique transfère le groupement carboxyle d'une molécule de bicarbonate sur une

-Synthèse bibliographique-

molécule d'acétyl-CoA pour former du malonyl-CoA, molécule donneur de carbones au cours de la synthèse des acides gras.

Cette étape est limitante pour la synthèse des acides gras car l'acétyl-CoA carboxylase est soumise à divers systèmes de régulation :

- l'acétyl-CoA carboxylase est inhibée si la concentration d'acides gras activés (acyl-CoA) augmente dans le cytoplasme (lipogénèse ralentie, apports importants en acides gras alimentaires)
- l'interruption de la synthèse de malonyl-CoA bloque également la synthèse des acides gras.
- l'acétyl-CoA carboxylase est stimulée si la quantité de citrate (d'origine mitochondriale) augmente dans le cytosol
- les hormones contrôlent également l'acétyl-CoA carboxylase par interconversion. L'insuline active l'enzyme via une protéine phosphatase. Le glucagon et l'adrénaline l'inactivent via une protéine-kinase.

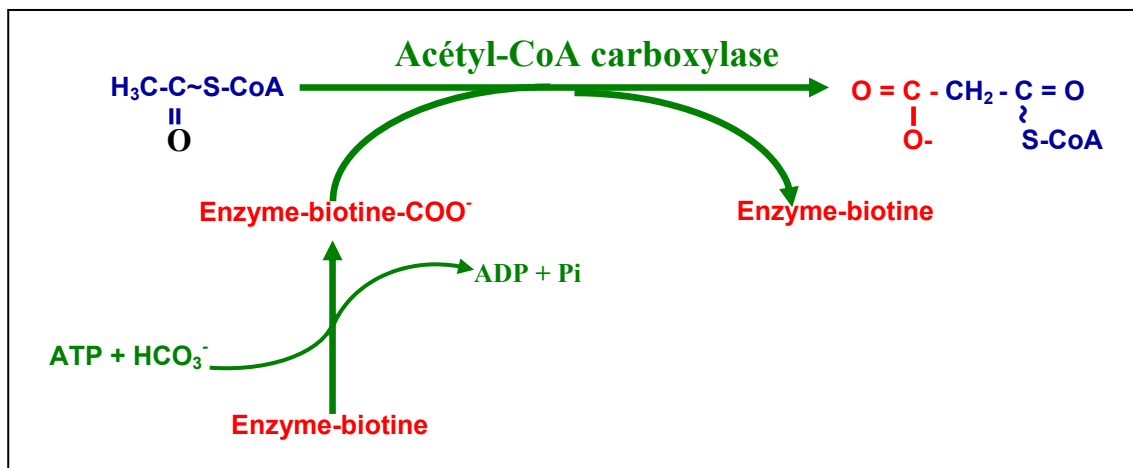


Figure 11 : Carboxylation de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA.

Après ces deux étapes indispensables, peut ensuite débiter la synthèse des acides gras. On distinguera la synthèse des acides gras saturés de 4 à 16 carbones, la synthèse des acides gras saturés de plus de 16 carbones, la synthèse des AGMI et la synthèse des AGPI.

➤ Synthèse des acides gras saturés entre 4 et 16 carbones

La synthèse des acides gras est catalysée par un complexe enzymatique : l'acide gras-synthase. Comme l'illustre la figure 12, l'acide gras-synthase est un homodimère dont chacune des chaînes peptidiques peut catalyser sept réactions distinctes nécessaires à la synthèse des acides gras saturés entre 4 et 16 carbones.

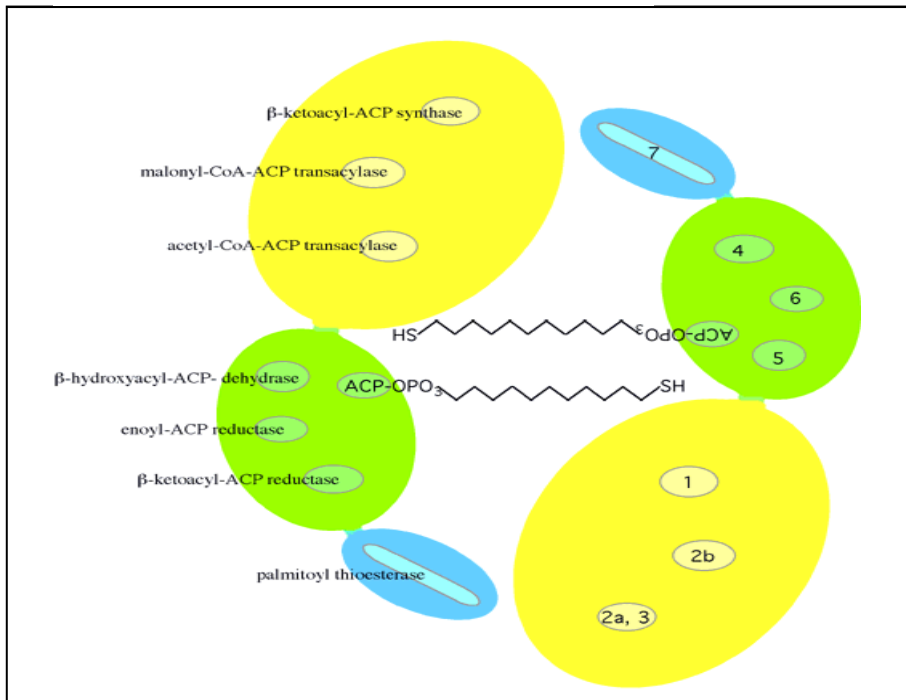


Figure 12 : Représentation schématique de l'acide gras synthase et de ses sites catalytiques.

Chaque moitié de l'acide gras-synthase peut lier le substrat (acétyl ou acyl) sous forme d'un thioester au niveau de deux groupements thiol : un résidu cystéine (Cys-SH) et un groupement 4'-phosphopantéthéine (Pan-SH). La Pan-SH est associée à un fragment du complexe que l'on nomme ACP (acyl carrier protein). Cette partie de l'enzyme fonctionne comme un long bras qui fixe le substrat et le déplace ensuite de centre actif en centre actif. Les activités enzymatiques se répartissent entre trois domaines distincts. Le premier catalyse l'introduction du substrat (acétyl-CoA ou acyl-CoA) et du malonyl-CoA grâce aux activités [ACP]-S-acétyl et [ACP]-S-malonyl-transférase. Les deux partenaires sont condensés par la 3-céto-acyl-[ACP]-synthase. Le deuxième domaine réduit la chaîne d'acide gras en cours de synthèse à l'aide de la cétoacyl-[ACP]-réductase, la 3-hydroxyacyl-[ACP] déshydratase et l'énoyl-[ACP]-réductase. Le troisième domaine sert finalement à libérer le produit fini, l'acyl-CoA, grâce à l'activité acyl-[ACP]-hydrolase.

La biosynthèse des acides gras commence par le transfert d'un groupement acétyl sur un résidu Cys-SH et du transfert d'un résidu malonyl sur la Pan-SH de l'ACP. L'élongation de la chaîne a lieu par transfert d'un groupement acétyl sur le C-2 du résidu malonyl tandis que le groupement carboxyle libre du malonyl est clivé pour former du CO₂. Cette étape de condensation est ensuite suivie de réduction, déshydratation et à nouveau réduction. La séquence de ces 4 réactions constitue un tour. Le premier tour permet de synthétiser un acide

-Synthèse bibliographique-

gras à 4 carbones. A l'issue de ce tour, la synthèse peut être achevée, l'acide gras est alors libéré du complexe AGS par l'acyl-[ACP] hydrolase. L'élongation peut également continuer, le produit intermédiaire est alors transféré de l'ACP sur le résidu Cys-SH par l'acyl-transférase et un nouveau tour recommence quand le produit intermédiaire se condense à une nouvelle molécule de malonyl.

Après n-1 tours, l'acyl-CoA a 2n atomes de carbones et est libéré du complexe acide gras-synthase par l'acyl-[ACP] hydrolase. Ce complexe enzymatique peut réaliser au maximum 7 tours et permet donc de synthétiser des acides gras jusqu'à 16 atomes de carbones (= palmitate). L'équation bilan est alors la suivante :



➤ **Synthèse des acides gras saturés au-delà de 16 atomes de carbones**

Au delà d'une longueur de chaîne de 16 carbones, l'élongation des acides gras saturés s'effectue par un complexe enzymatique localisé sur la face cytoplasmique de la membrane du réticulum endoplasmique. Ce système d'élongation des acides gras est appelé système élongase ou FACES (Fatty Acid Chain Elongase System) et fut mis en évidence par Lazarow et de Duve en 1976 (Lazarow et de Duve, 1976). On retrouve ce système dans tous les tissus investigués à savoir : le foie, le cerveau, le pancréas, les poumons, rétine, testicules, gros intestin, les lymphocytes, les neutrophiles et les fibroblastes (Cinti et al, 1992).

Le système FACES réalise 4 réactions en chaîne (Nugteren, 1965; Seubert et Podack, 1973; Bernert et Sprecher, 1977;) décrites sur la figure 13:

- **condensation** de l'acyl-CoA avec du malonyl-CoA par l'acide gras Co-A ligase. Formation du β -kétacyl-CoA.
- **réduction** du β -kétacyl-CoA en β -hydroxyacyl-CoA par la β -kétacyl-CoA réductase. Réaction qui nécessite la présence des équivalents réduits NADH ou NADPH associés respectivement aux activités de la NADH cytochrome b5 réductase et de la NADPH cytochrome P-450 réductase (Keyes, 1979; Nagi et Cook, 1983). Une hémoprotéine, la cytochrome b5, est chargée de transférer des 2 électrons du β -kétacyl-CoA vers la réductase (Pugh and Kates, 1977).
- **déshydratation** du β -hydroxyacyl-CoA en trans-2-enoyl-CoA par la trans-2-enoyl-CoA.
- **réduction** du trans-2-enoyl-CoA en (acyl + 2C)-CoA par une trans-2-enoyl-CoA réductase et nécessite la présence des équivalents réduits NADH ou NADPH.

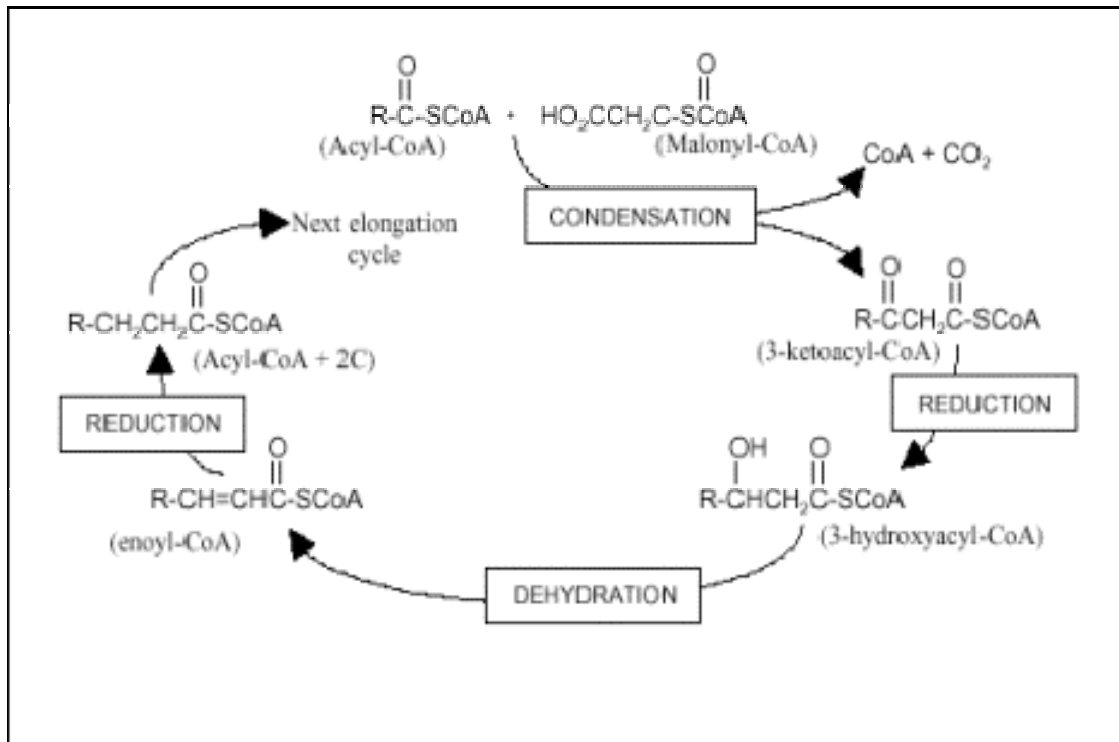


Figure 13 : Elongation des acides gras.

➤ Synthèse des AGMI

La synthèse des AGMI est réalisée grâce à la Δ^9 désaturase, un système enzymatique localisé principalement au niveau : du foie, du cerveau, du pancréas, du tissu adipeux et des poumons (Kaestner *et al.*, 1989). La réaction se déroule dans le réticulum endoplasmique et consiste à synthétiser du palmitoléyl-CoA et de l'oléyl-CoA à partir des acides gras saturés correspondants. La Δ^9 désaturase porte alors le nom de l'acide gras à désaturer, il y aura donc la palmitoyl-CoA désaturase et la stéaroyl-CoA désaturase.

Le système microsomal de la désaturase Δ^9 réalise 4 réactions en chaîne (figure 14) :

- **transfert** de l'acyl-CoA sur le système désaturase grâce à l'acyl-transférase
- **réduction** de l'acyl en hydroxyacyl par la NADH cytochrome b5 réductase ou la NADPH cytochrome P-450 réductase. La réaction nécessite également la présence de cyt b5 et d' O_2 .
- **déshydratation** de l'hydroxyacyl en enoyl par une hydratase
- **libération** de l'énoyl sous forme d'énoyl-CoA par transfert d'un groupement CoA-SH sur l'énoyl par l'acyl-transférase.

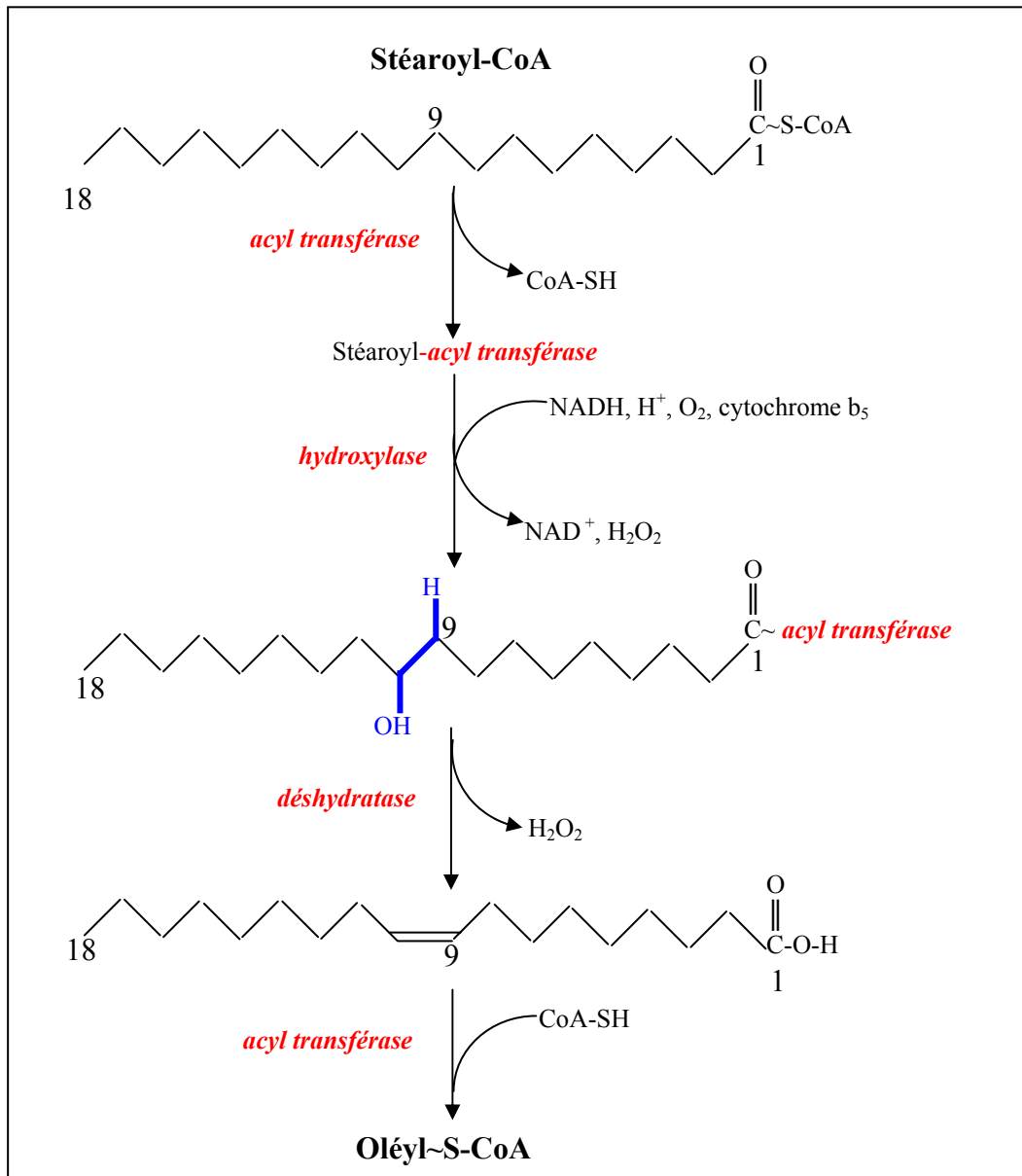


Figure 14 : Synthèse des acides gras monoinsaturés.

➤ Synthèse des AGPI

La synthèse des AGPI est réalisée dans le réticulum endoplasmique et le peroxysome. La synthèse des AGPI débute avec des précurseurs, les acides gras essentiels LA et ALA. En effet, les désaturases Δ^{12} et Δ^{15} n'existent pas dans le règne animal, il nous est donc impossible de produire du LA et de l'ALA. Voilà pourquoi notre alimentation doit nous fournir quotidiennement ces acides gras essentiels précurseurs respectivement des AGPI-TLC n-6 et n-3. La synthèse des AGPI-TLC est également réalisée à partir des AGPI-TLC d'origine alimentaire ou issus de la synthèse *de novo*.

Les AGPI n-6 et n-3 suivent deux voies de synthèse parallèles impliquant au moins 3 systèmes enzymatiques: l'élongase, la désaturase Δ^6 et la désaturase Δ^5 . Le fonctionnement de

-Synthèse bibliographique-

ces enzymes est identique à celui décrit pour la synthèse des acides gras saturés et monoinsaturés. La seule différence étant que la désaturase Δ^6 insère une double liaison entre les carbones C-6 et C-5 et la désaturase Δ^5 insère une double liaison entre les carbones C-5 et C-4.

Comme l'indique la figure 15, la majorité des AGPI-TLC sont synthétisés dans le réticulum endoplasmique après désaturations et élongations successives. Après un maximum de deux désaturations et trois élongations, on aboutit au C24:5 n-6 et au C24:6 n-3 (Klenk et Mohrhauer, 1960). Pour palier à l'inexistence de la désaturase Δ^4 (Voss *et al.*, 1991), le C22:5 n-6 et du le C22:6 n-3 sont synthétisés à partir des AGPI-TLC à 24 carbones par β -oxydation partielle peroxysomale (Osmundsen *et al.*, 1991). Cette rétroconversion peroxisomale est réalisée par des enzymes de la β -oxydation des AGPI-TLC : acyl-CoA oxydase, énoyl-CoA hydratase, 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase et 3-kétoacyl-CoA thiolase (Lazarow, 1978) (voir section 2.5. pour plus de détails).

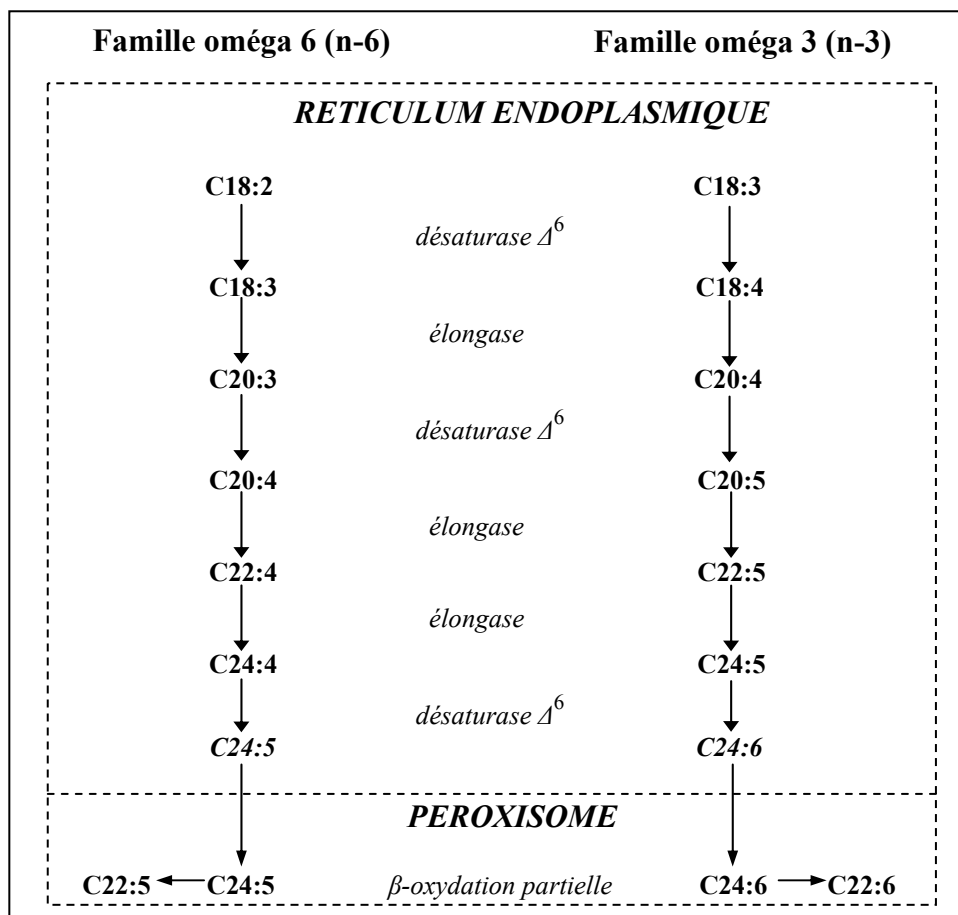


Figure 15 : Synthèse des acides gras polyinsaturés à très longues chaînes.

2.5. Catabolisme des acides gras

2.5.1 Généralités

Les acides gras sont des substrats énergétiques très importants pour les cellules. Cependant, toutes les cellules ne sont pas capables de synthétiser des acides gras. Des systèmes sont donc mis en place pour que la cellule puisse bénéficier d'acides gras à tout instant. La principale source en acides gras est le tissu adipeux. Les acides gras sont stockés sous forme de triglycérides dans le cytoplasme des adipocytes. Le clivage de ces triglycérides (lipolyse) aboutit à la libération de glycérol et d'acides gras dans le plasma. Les acides gras circulants sont ensuite prélevés par les cellules utilisatrices. A l'exception des cellules du tissu adipeux, du foie, des poumons, des reins et des glandes mammaires, la lipolyse est une source essentielle en acides gras pour les cellules incapables de synthétiser des acides gras. Parallèlement à cette voie, d'autres systèmes existent pour fournir des acides gras aux cellules. Quand des cellules extrahépatiques (essentiellement tissu adipeux et muscle) nécessitent des apports importants en acides gras (hors période post-prandiale), le foie peut également libérer ses triglycérides dans le plasma sous forme de VLDL. Enfin, en période post-prandiale, ces mêmes tissus pourront capter des acides gras d'origine alimentaire grâce aux chylomicrons délivrés par les entérocytes.

Captés par les cellules utilisatrices, les acides gras sont ensuite métabolisés dans le peroxyosome et/ou la mitochondrie au cours de différentes voies de dégradation : β -oxydation des acides gras saturés, dégradation des acides gras insaturés, dégradation des acides gras à nombre impairs de carbones, β -oxydation peroxyosomale et α -oxydation des acides gras. La β -oxydation des acides gras saturés est quantitativement majoritaire toutefois l'absence ou le dysfonctionnement des autres voies de dégradation peut entraîner des maladies graves. Le syndrome de Zellweger se caractérise par une absence totale de peroxyosome. En conséquence, la synthèse des acides gras à 22 carbones est impossible et les AGPI-TLC à 24 carbones s'accumulent (Martinez 1989; Christensen *et al.*, 1993).

2.5.2. De la mobilisation des triglycérides au site d'oxydation des acides gras

Après la mobilisation des lipides alimentaires, de réserve et du foie, les lipides sont transportés vers les cellules utilisatrices où les acides gras sont libérés dans le cytosol (voir section 2.4.2. pour plus détails). Cependant la plupart des acides gras sont insolubles en milieu aqueux. Pour rejoindre leurs sites de catabolisme (mitochondrie et/ou peroxyosome), les acides gras doivent s'associer aux protéines de transport cytoplasmiques, les FABP.

2.5.3. Dégradation des acides gras

Suivant la longueur de la chaîne carbonée et de son degré d'insaturation, un acide gras est dégradé selon différents processus décrits ci-après.

2.5.3.1. β -oxydation mitochondriale

La majorité des acides gras sont dégradés au cours de la β -oxydation mitochondriale. Hormis le cerveau et les érythrocytes, tous les tissus sont capables de réaliser ce type de catabolisme. La β -oxydation mitochondriale se déroule en plusieurs phases décrites ci-après:

a). Activation et entrée des acides gras dans la mitochondrie

Les acides gras à courtes chaînes traversent directement les deux membranes mitochondriales puis sont activés par une acyl-CoA synthétase dans la matrice mitochondriale. Quant aux acides gras entre 10 et 18 atomes de carbones, une acyl-CoA synthétase (située au niveau de la membrane mitochondriale externe) transfère un groupement CoA-SH sur le radical acyl des acides gras. Une fois activée, ces acides gras traversent la membrane mitochondriale interne grâce à la navette carnitine (figure 16). Après formation du complexe acyl-carnitine par l'acyl-carnitine transférase 1 (située sur la face externe de la membrane interne), le complexe acyl-carnitine et le CoA-SH traversent la membrane mitochondriale interne grâce à une acylcarnitine translocase et sont libérés dans l'espace matriciel. Sous l'action de l'acyl-carnitine transférase 2 (située sur la face matricielle de la membrane interne), le radical acyl est à nouveau transféré sur le CoA-SH et l'acyl-CoA est prêt pour la β -oxydation matricielle.

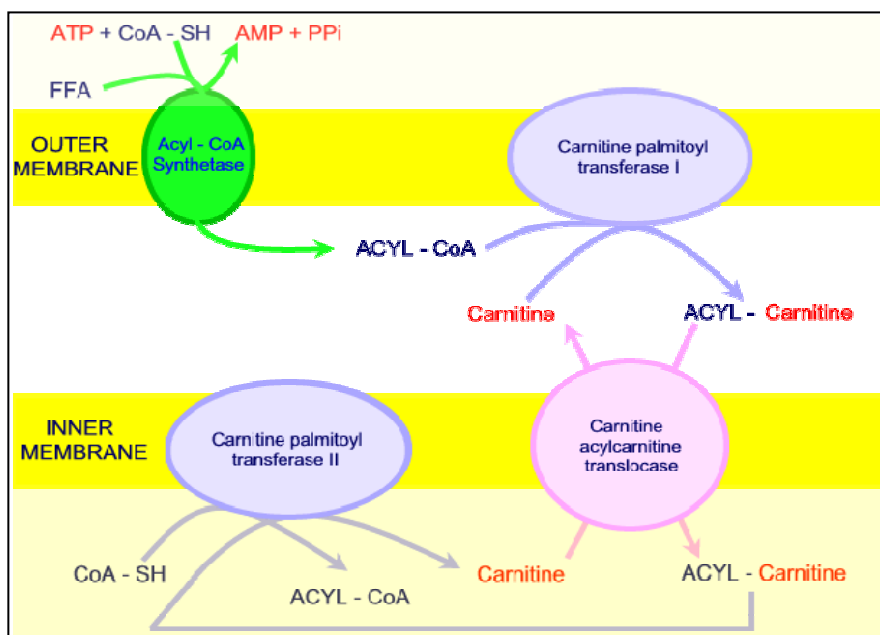


Figure 16: Transfert des acides gras par la navette carnitine.

b). β -oxydation

La β -oxydation est réalisée sur des acides gras n'excédant pas 18 atomes de carbones. Elle résulte d'une séquence de réactions (= tour) répétée en boucle. Un tour correspond aux 4 réactions suivantes (figure 17):

- **déshydrogénation** de l'acide gras activé en un acide gras possédant une double liaison *trans* entre le carbone C-2 et C-3. L'hydrogène est ensuite transféré à une protéine contenant du FAD^+ qui assure le contact avec la chaîne respiratoire.
- **hydratation** au niveau de la double liaison de l'acide gras insaturé
- **déshydrogénation** du groupement hydroxyle en C-3 pour donner un groupement carbonyle. Formation d'un acide β -cétonique. L'accepteur des équivalents réduits est le NAD^+ qui aboutit ensuite à la chaîne respiratoire.
- **clivage thioclastique** de l'acide β -cétonique par une acyl-transférase (beta-cétothiolase). Formation d'un acide gras activé raccourci de 2 unités C_2 (acyl-CoA avec n-2 atomes de C) et libération d'un acétyl-CoA.

A chaque tour, une unité C_2 est clivée entre les carbones C-2 et C-3 sous forme d'acétyl-CoA. L'oxydation complète d'un acide gras à $2n$ atomes de carbones nécessite donc n-1 tours.

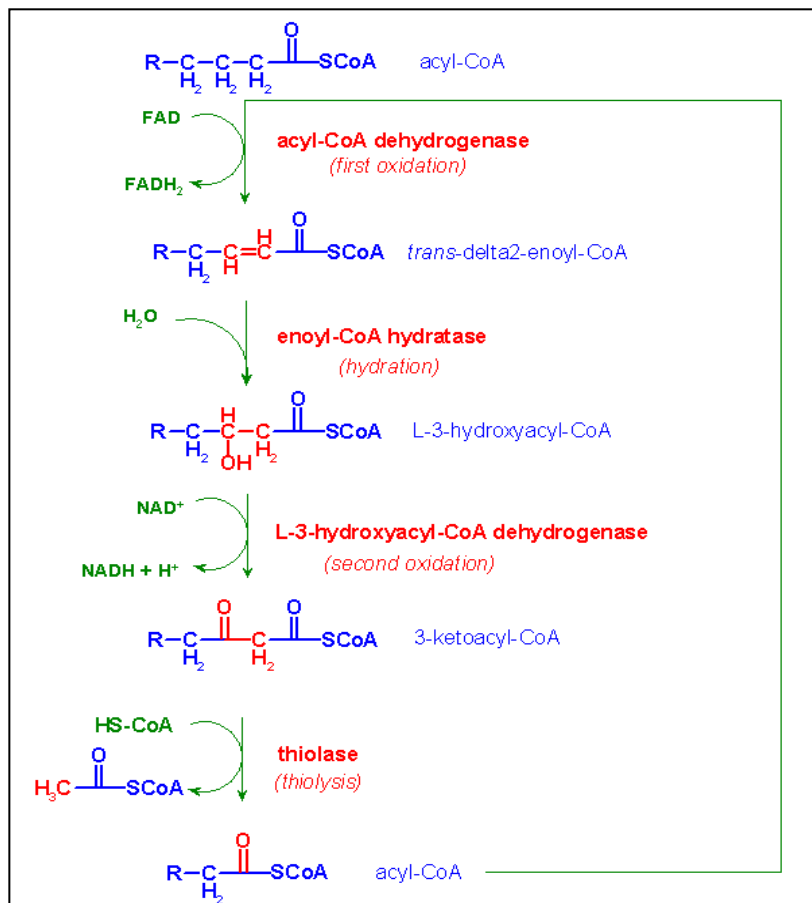


Figure 17 : La β -oxydation: un cycle de réactions.

Bilan énergétique

L'oxydation d'un acide gras est une source en ATP quantitativement importante pour la cellule. Par exemple, pour un acide gras à 16 carbones (palmitate), après l'activation du palmitate en palmitoyl-CoA et la consommation de 2 ATP, l'oxydation totale est réalisée après 7 tours β -oxydation et à chaque tour de β -oxydation, sont formés :

- 1 FADH₂ qui aboutit à la production de 2 ATP au niveau de la chaîne respiratoire.
- 1 NADH₂ qui aboutit à la production de 3 ATP au niveau de la chaîne respiratoire.
- 1 acétyl-CoA qui aboutit à la production de 12 ATP au cours du cycle de l'acide citrique (figure 22) et de la chaîne respiratoire (figure 25).

Au final, l'oxydation complète d'un acide gras saturé à 16 carbones fournit : $[(2 \text{ ATP} + 3 \text{ ATP}) \times 7] + (12 \times 8) - 2 = 129 \text{ ATP}$ soit 70% de plus qu'une molécule de glucose!

Régulation de la β -oxydation

La vitesse de la β -oxydation dépend de la vitesse de transfert des acides gras dans la mitochondrie. La première régulation intervient au niveau de l'acyl-carnitine transférase 1 dont l'activité augmente en cas de jeûne, d'élévation du taux sanguins en acides gras et en glucagon. En revanche, en cas de satiété, le malonyl-CoA (produit de carboxylation de l'acétyl-CoA) s'accumule et entraîne l'inhibition de l'acyl-carnitine transférase 1 (ce qui maintient les acides gras dans le cytoplasme). La β -oxydation est alors inhibée, l'acétyl-CoA carboxylase est en revanche activée et la synthèse des acides gras est donc stimulée. Cet enzyme sera à son tour inhibé en cas d'accumulation d'acyl-CoA.

2.5.3.2. Dégradation des acides gras insaturés

Cette voie concerne les acides gras insaturés jusqu'à 18 atomes de carbones. Les acides gras insaturés sont dégradés de la même façon que les acides gras saturés. Une isomérase et une épimérase sont toutefois nécessaires pour l'oxydation complète de ces acides gras. L'action de l'isomérase peut être illustrée par la dégradation de l'acide gras oléique (double liaison *cis* entre les carbones 9 et 10) en C18. Les trois premiers tours de β -oxydation enlèvent 6 carbones sous forme de 3 acétyl-CoA. La molécule restante a une double liaison *cis* entre C3 et C4, ce qui empêche la formation de la double liaison de la β -oxydation entre C2 et C3. L'isomérase transforme la liaison *cis* en *trans* et la déplace entre C2 et C3, ce qui permet à la β -oxydation de se poursuivre.

Pour les AGPI possédant entre 2 doubles liaisons *cis* (18:2;12,9) et 4 doubles liaisons *cis* (18:4;15,12,9,6), 3 ou 2 tours de β -oxydation sont nécessaires afin que le C9 ou le C6 se

-Synthèse bibliographique-

retrouvent en position C2. Deux enzymes supplémentaires sont alors nécessaires pour la dégradation des AGPI : une réductase et une épimérase (figure 18). Après hydratation de la première double liaison et épimérisation du composé, la β -oxydation peut ensuite se poursuivre. Réduction, épimérisation et β -oxydation s'enchaînent ainsi jusqu'à métabolisation complète de l'AGPI.

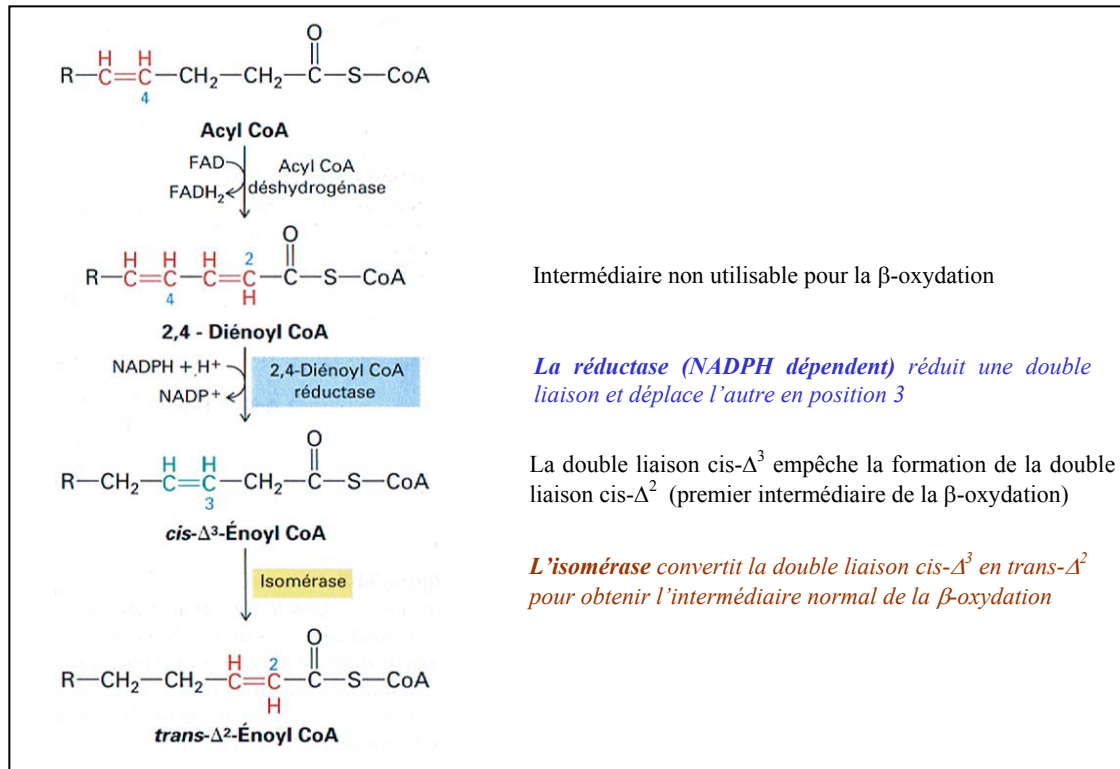


Figure 18 : Réduction et épimérisation : réactions nécessaires avant la β -oxydation des acides gras polyinsaturés.

2.5.3.3. Dégradation des acides gras à nombre impairs de carbones

Ces acides gras sont traités comme les acides gras à nombre pair de carbone. A la différence que le produit final est du propionyl-CoA, résidu à 3 atomes de carbones. Ce dernier est carboxylé en méthylmalonyl-CoA grâce à la propionyl-CoA-carboxylase, lequel sera isomérisé en succinyl-CoA par la méthylmalonyl-CoA-mutase (coenzyme: vitamine B₁₂). Le succinyl-CoA participe ensuite au cycle de l'acide citrique et à la néoglucogénèse.

2.5.3.4. α -oxydation des acides gras

L' α -oxydation des acides gras est peu importante sur le plan quantitatif. Elle se déroule dans le peroxysoxe et permet la dégradation des acides gras ramifiés (provenant de l'alimentation

-Synthèse bibliographique-

végétale). Elle se déroule par élimination successive de résidus en C₁ après hydroxylation et formation de radical carboxyl sur le C₁. Cette voie ne nécessite pas de coenzyme A et ne fournit pas ATP. L'α-oxydation est catalysée par:

- l'acyl-CoA synthétase qui produit du 3-méthylacyl-CoA
- la 3-méthylacyl-CoA 2-hydroxylase qui produit du 2-hydroxy-3-méthylacyl-CoA
- la 2-hydroxy-3-méthylacyl-CoA lyase qui clive le 2-hydroxy-3-méthylacyl-CoA en aldéhyde-2-méthyl ramifié et formyl-CoA.
- l'aldéhyde déhydrogénase oxyde l'aldéhyde méthylé en acide gras-2-méthyl ramifié. Le formyl-CoA est hydrolysé en formate puis converti en CO₂ dans le cytosol.

2.5.3.5. β-oxydation peroxisomale

Cette β-oxydation se déroule au niveau de la face cytoplasmique de la membrane peroxisomale. Elle permet de raccourcir les acides gras saturés et les AGPI-TLC de telle sorte à obtenir des chaînes carbonées à 18 atomes de carbones. Les acides gras peuvent ensuite rejoindre la mitochondrie pour y être totalement oxydés (Osmundsen *et al.*, 1991) (figure 19).

La β-oxydation peroxisomale est composée de 4 réactions successives:

- **activation** de l'acide gras sous forme d'énoyl-CoA par une acyl-CoA oxydase
- **hydratation** et **déshydrogénation** de l'énoyl-CoA par la DBP, protéine bifonctionnelle à activités énoyl-hydratase (crotonase) et 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase
- **clivage** de l'acide gras par une 3-kétoacyl-CoA thiolase.

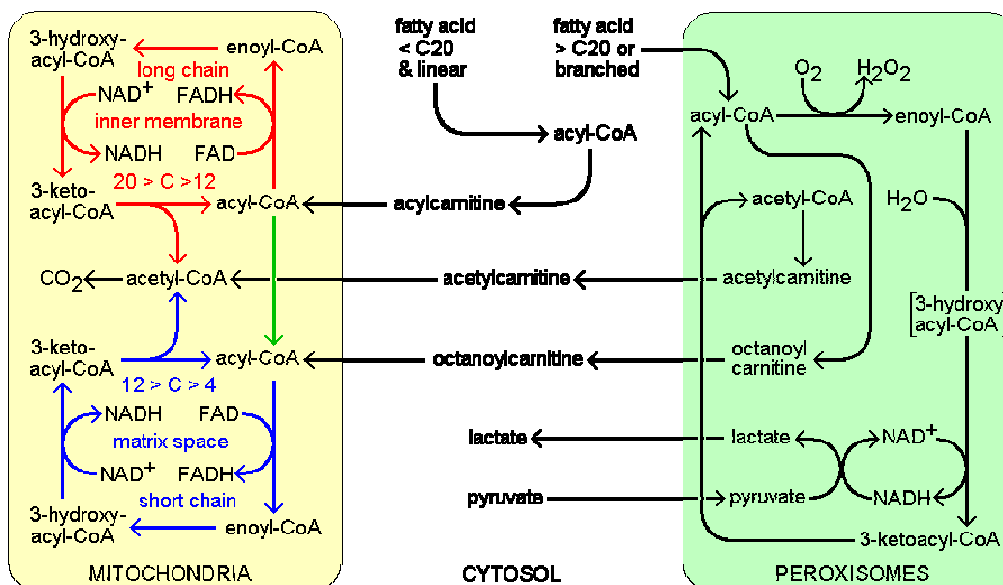


Figure 19 : Peroxysome et mitochondrie, siège de la dégradation des acides gras à chaînes longues.

III. Généralités sur le muscle cardiaque

3.1. Description générale

Le muscle cardiaque présente des caractéristiques structurales et fonctionnelles intermédiaires entre celles du muscle squelettique et celles du muscle lisse. Il est strié comme le muscle squelettique mais involontaire comme le muscle lisse. Comme pour le muscle squelettique, ses contractions sont puissantes et consomment une grande quantité d'énergie, comme pour le muscle lisse, elles sont continues et initiées par des mécanismes intrinsèques.

Les fibres cardiaques se ramifient librement et sont reliées par des disques intercalaires (épaississements transversaux irréguliers de la membrane plasmique). Ces disques intercalaires contiennent des desmosomes et des jonctions ouvertes. Les desmosomes empêchent les cellules cardiaques de se séparer pendant la contraction. Quant aux jonctions ouvertes, elles laissent passer librement les ions d'une cellule à l'autre et permettent la transmission directe du potentiel d'action dans tout le tissu cardiaque. Les jonctions ouvertes couplent électriquement toutes les fibres cardiaques permettant au myocarde de se comporter comme un syncytium, c'est-à-dire fonctionner d'un bloc (électriquement et mécaniquement).

En outre, le cœur est également constitué d'1% de cellules non contractiles ou cellules cardionectrices qui présentent un automatisme leur permettant de déclencher d'elles-mêmes des potentiels d'action. Ces cellules forment le système de conduction du cœur ou système cardionecteur qui est composé du nœud sinusal, du nœud auriculo-ventriculaire, du faisceau auriculo-ventriculaire et de ses branches ainsi que des myofibrilles de conduction cardiaque. Ce système coordonne la dépolarisation et les battements du cœur. Comme le nœud sinusal à la fréquence de dépolarisation spontanée la plus rapide, il constitue le centre rythmogène. Des hormones et divers neurotransmetteurs du système nerveux autonome peuvent influencer sur ce centre régulateur et en modifier la fréquence cardiaque.

3.2. Anatomie microscopique du muscle

La description parfaite de la structure des cellules cardiaques a été faite par plusieurs équipes scientifiques (Sommer *et al.*, 1986; Schaper *et al.*, 1989; Barth *et al.*, 1992). Les mesures morphologiques quantitatives de cellules cardiaques provenant d'espèces animales différentes ont montré que le sarcoplasme occupe 10 à 20% du volume cellulaire, les myofibrilles occupent 50 à 60% et les mitochondries 25 à 35% du volume cellulaire (Schaper *et al.*, 1985; Barth *et al.*, 1992).

-Synthèse bibliographique-

Les **myocytes** ventriculaires sont de longues cellules cylindriques, 50 à 100 μm de longueur et 10 à 25 μm de diamètre (Opie, 1998). Chaque cellule est entourée par un **sarcolemme** (membrane plasmique).

A fort grossissement, le **sarcoplasme** (cytoplasme) apparaît rempli de petits filaments constituant les éléments contractiles du muscle strié : les **myofibrilles** (figure 20). Leur apparence striée est due à l'alternance régulière de bandes foncées (A) et claires (I). Les myofibrilles sont des chaînes de sarcomères; chaque sarcomère contient des filaments minces (d'actine) et épais (de myosine) disposés de façon régulière.

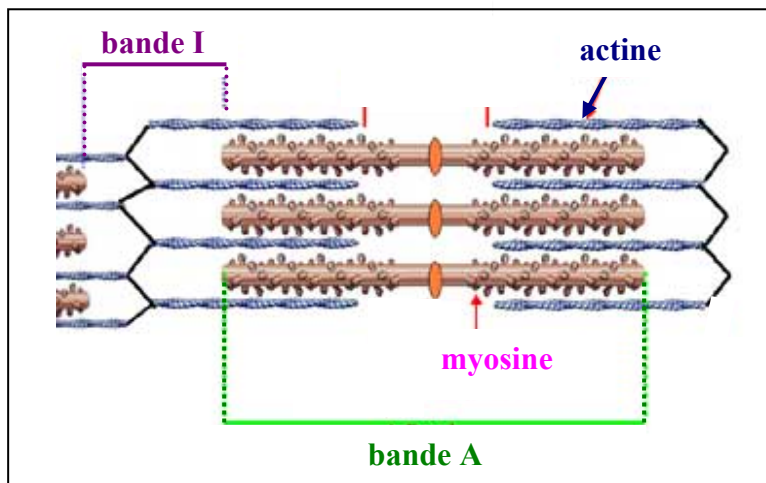


Figure 20: Représentation schématique d'un sarcomère.
(Source: www.enm.edu)

Les cardiomyocytes possèdent également **un ou deux noyaux** situés en leur centre et entourés de sarcomères.

Le sarcolemme s'invagine pour former des tubules transverses qui pénètrent dans les fibres musculaires. Ce **système de tubules transverses ou tubules T** (figure 21) permet la contraction synchronisée de tous les sarcomères d'une fibre musculaire. Possédant une lumière avec l'espaces extracellulaire, il permet ainsi de rapprocher l'extérieur et l'intérieur de la cellule et de faciliter les échanges ioniques.

Le **réticulum sarcoplasmique** (figure 21) est un réseau de tubes étanches et flexibles qui entourent les myofibrilles. Ces tubes sont dilatés à leurs extrémités et forment les citernes terminales qui sont accolées aux tubules T. Le réticulum sarcoplasmique est lieu de stockage du Ca^{2+} .

Les **mitochondries** (figure 21) sont disposées en rangées alignées entre les myofibrilles. Afin d'assurer le processus de contraction, ces organites sont situés stratégiquement proche des

protéines musculaires, grandes utilisatrices d'ATP mitochondriales. D'ailleurs, l'abondance des mitochondries témoigne des énormes besoins métaboliques requis pour l'activité musculaire cardiaque. La mitochondrie sera davantage détaillée au chapitre suivant.

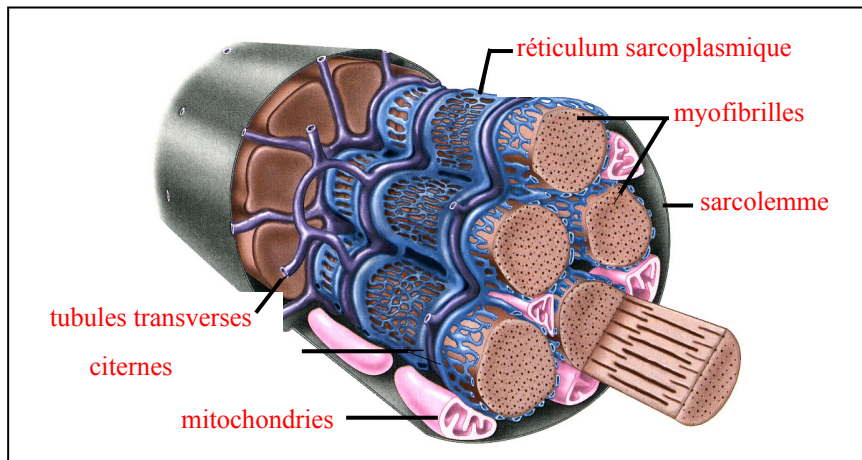


Figure 21 : Représentation schématique d'une fibre musculaire cardiaque.
(Source: Vander et coll. Physiologie humaine, Edition Maloine, 1989)

3.3. Métabolisme énergétique du myocarde

Le métabolisme du muscle cardiaque est presque exclusivement aérobie. Son abondance en mitochondries en témoigne. Les substrats énergétiques préférentiels du cœur sont les acides gras, le glucose et le lactate. Les voies de dégradation des lipides et des hydrates de carbone se rejoignent au niveau de la mitochondrie avec l'acétyl CoA qui est métabolisé au cours du cycle de l'acide citrique ou cycle de Krebs (Krebs, 1937) (figure 22).

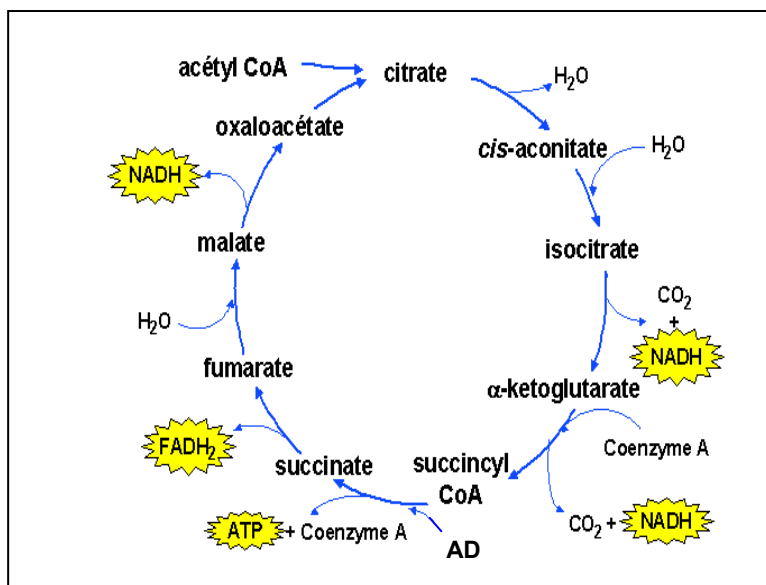


Figure 22 : Cycle de l'acide citrique.

-Synthèse bibliographique-

À la fin du cycle, une molécule d'acétyl CoA fournira 2 molécules de CO₂, 3 molécules de NADH, 1 molécule de FADH₂ et une molécule d'ATP. Les transporteurs d'hydrogène et d'électrons NADH et FADH₂, réagissent ensuite avec les enzymes de la chaîne respiratoire pour réduire l'oxygène en eau et synthétiser de l'ATP : c'est la phosphorylation oxydative, le processus majeur de fourniture d'énergie pour les fibres cardiaques.

En résumé, le cœur peut utiliser plusieurs voies métaboliques en fonction des substrats disponibles dans la circulation sanguine, mais au dépend d'une grande consommation d'oxygène. Le cœur sera de toute évidence plus sensible au manque d'oxygène plutôt qu'au manque de nutriments.

3.4. Ischémie et reperfusion du myocarde

3.4.1. L'ischémie myocardique

L'ischémie myocardique se définit par une diminution des apports en nutriments et en oxygène accompagnée d'une accumulation des déchets métaboliques. Le muscle cardiaque utilisant des substrats à catabolisme oxydatif strict (acides gras libres, lactate) ou très largement oxydatif (glucose) pour couvrir ses besoins énergétiques. En conséquence, toute situation d'ischémie aura des conséquences considérables sur le métabolisme et le bon fonctionnement du myocarde. Lors d'une occlusion coronaire prolongée, une ischémie sévère conduit progressivement à l'apparition de lésions d'abord réversibles qui, si l'ischémie est maintenue deviennent irréversibles et aboutissent inévitablement à la mort cellulaire (Hearse et de Leiris 1979; Mikelson *et al.*, 1990) (figure 23).

Les altérations précoces et réversibles sont caractérisées par un ralentissement (voire un arrêt total) du métabolisme oxydatif qui entraîne une diminution marquée de la production mitochondriale d'ATP. Malgré l'activation de la glycolyse, la production d'ATP ne compense que partiellement le déficit énergétique et ne permet pas de couvrir les besoins du myocarde.

Par ailleurs, du fait de la réduction du débit coronaire, les intermédiaires de la voie glycolytique ainsi que les produits du catabolisme de l'ATP s'accumulent et entraînent une acidose intracellulaire qui va progressivement bloquer la glycolyse. De plus, l'activation de l'échangeur Na⁺/H⁺, sous l'effet de l'acidose, conduit à l'expulsion des protons vers l'extérieur de la cellule, couplée à une entrée anormale de sodium. Celle-ci est à l'origine d'un déséquilibre osmotique et à l'apparition d'un œdème intracellulaire (Feuvray, 1981). Dans ces conditions, l'échangeur Na⁺/Ca²⁺ fait pénétrer du calcium dans la cellule ce qui conduit progressivement à l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire. La phase tardive des altérations liées à l'ischémie se caractérise par l'apparition de lésions irréversibles.

-Synthèse bibliographique-

Les perturbations existantes s'aggravent : l'arrêt total de la production d'ATP par la glycolyse anaérobie est associé à une diminution importante du contenu tissulaire en composés énergétiques ce qui contribue à l'amplification de la surcharge calcique via la défaillance des mécanismes ATP-dépendant qui assurent la régulation de l'homéostasie calcique. L'ultrastructure des myocytes est désorganisée (gonflement des mitochondries, ruptures de la membrane plasmique...) et les altérations membranaires entraînent la fuite de nombreux constituants (ions, lactate, enzymes...) vers le compartiment extracellulaire (Jennings et Reimer, 1983; Jennings et Ganote, 1974).

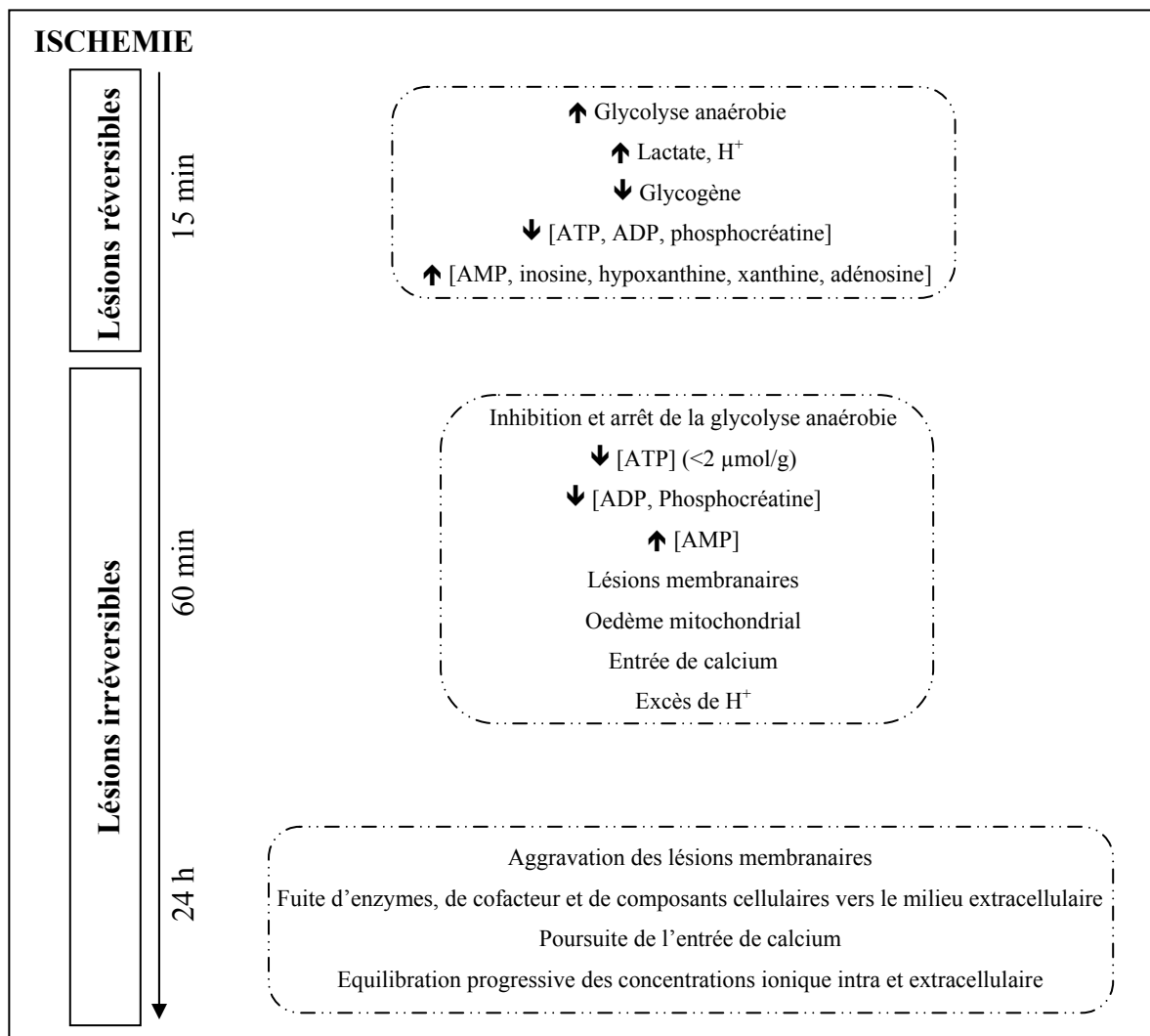


Figure 23 : Séquence des altérations cellulaires induites par l'ischémie myocardique.

3.4.2. Reperfusion myocardique

La principale complication de l'infarctus du myocarde est la perte de masse contractile. Les cellules cardiaques ne pouvant se régénérer, le tissu infarcté n'est plus en mesure de se

-Synthèse bibliographique-

contracter et la fonction globale du cœur peut-être sévèrement et irréversiblement altérée. Cette situation peut alors mener à la défaillance cardiaque. A l'heure actuelle, le moyen le plus couramment utilisé permettant de limiter les conséquences d'une situation de sténose ou d'occlusion coronaire et de restaurer durablement la fonction contractile cardiaque, consiste à revasculariser le plus rapidement possible le territoire ischémié: c'est la reperfusion. Pour être efficace, la reperfusion doit intervenir précocement, c'est-à-dire à un stade où les altérations cellulaires induites par l'ischémie sont encore réversibles (Jennings *et al.*, 1960). Cependant, indépendamment des caractères de réversibilités et d'irréversibilité de la lésion ischémique, la reperfusion n'est pas toujours salvatrice. Dans certains cas, l'œdème cellulaire est tel, que le diamètre des vaisseaux capillaires de la zone ischémique est considérablement réduit, ce qui peut-être à l'origine du phénomène de non-reperfusion (« non flow ») (Kloner *et al.*, 1974). Par ailleurs, même si la restauration du flux sanguin est mise en place de manière très précoce, la reperfusion du myocarde ischémique peut paradoxalement, conduire au développement d'altérations structurales et fonctionnelles (Jennings et Reimer, 1983) regroupées sous le terme de «syndrome de reperfusion». Les troubles caractéristiques du syndrome de reperfusion sont :

- des arythmies (Rochette *et al.*, 1980; Manning et Hearse, 1984)
- une sidération myocardique ou «stunning» (Braunwald et Kloner, 1982), un dysfonctionnement mécanique durable mais totalement réversible
- une accélération du processus de nécrose cellulaire.

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer le développement des altérations liés à la reperfusion du myocarde ischémique. les principaux mécanismes avancés sont:

- l'aggravation brutale de l'œdème
- l'aggravation de la surcharge calcique
- la libération de catécholamines endogènes
- les altérations cellulaires liées à la surproduction de radicaux libres au moment de la reperfusion

IV. La mitochondrie cardiaque

4.1. Caractéristiques générales

La mitochondrie est un organelle indispensable pour la majorité des cellules eucaryotes. Elle est le siège principale de la production de l'énergie.

Le nombre de mitochondries par cellule est relativement constant et caractéristique d'un type déterminé de cellules. La microscopie électronique a révélé que dans la cellule cardiaque intacte, les mitochondries mesurent 2 μm de long et moins d'1 μm de large.

La mitochondrie comporte une double membrane: une membrane externe et une membrane interne séparées par un espace intermembranaire. La membrane interne délimite un compartiment soluble appelé matrice dans lequel a lieu le cycle de Krebs. La membrane interne forme des replis appelés crêtes. La visualisation tridimensionnelle par tomographie électronique de mitochondries *in situ* a permis d'établir un nouveau modèle d'architecture membranaire: le modèle des jonctions entre crêtes. Contrairement à l'ancien modèle (originellement décrit par Palade) qui suggérait que de larges ouvertures connectaient l'espace intracrêtes à l'espace intermembranaire, cette technique moderne a pu mettre en évidence que d'étroites ouvertures tubulaires (les jonctions intercrêtes) connectaient en réalité ces deux espaces (figure 24).

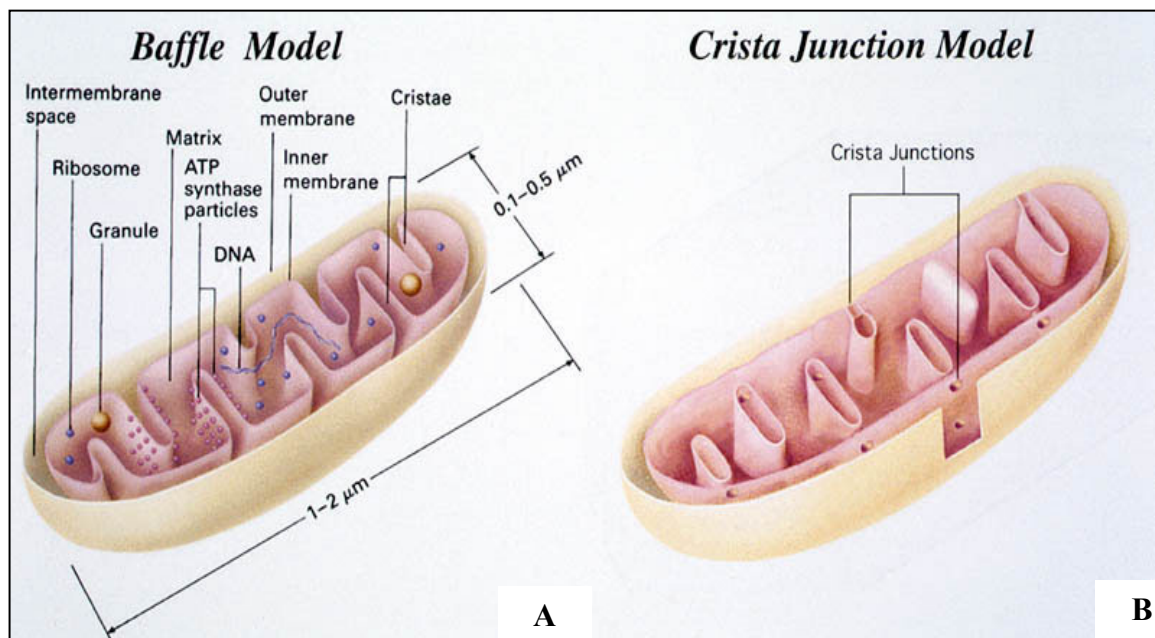


Figure 24 : Modèles de structures des membranes mitochondriales (Perkins *et al.*, 2000).
(A) Modèle le plus communément décrit depuis les années 50 (originellement décrit par Palade).
(B) Modèle de jonctions entre crêtes (jonctions entercrêtes ou crista junction) qui supplante le modèle de Palade dans toutes les mitochondries d'animaux supérieurs examinées à ce jour.

-Synthèse bibliographique-

Enfin, la mitochondrie est un organe semi-autonome qui possède son propre ADN. Ce génome lui permet de coder pour certaines sous-unités de protéines de sa structure et de son fonctionnement, cependant elle est obligée d'importer la plus grande majorité des protéines qui lui sont nécessaires.

4.2. Lipides de la mitochondrie

4.2.1. Composition phospholipidique

Comme l'illustre le tableau 3, la phosphatidylcholine et la phosphatidyléthanolamine sont les principaux phospholipides de la mitochondrie cardiaque, ils représentent environ 80% des phospholipides totaux. Quant à la cardiolipine, phospholipide spécifique de la mitochondrie, elle représente 10 à 20% des phospholipides totaux. Le phosphatidylglycérol, précurseur de la cardiolipine est peu représenté dans la mitochondrie excepté dans la mitochondrie de cœur de bœuf (Wheeldon *et al.*, 1965). Les mitochondries contiennent également 1 à 6 % de phosphatidylinositol et 1 à 3% de phosphatidylsérine, d'acide phosphatidique, de lysophosphatidylcholine et de sphingomyéline.

Source (référence)	Phospholipides (% phospholipides totaux)								
	PC	PE	CL	PI	PS	acP	LPC	SM	PG
Rat (Palmer <i>et al.</i> , 1981)	41	44	8	3	1	ni	1	1	ni
Porc (Comte <i>et al.</i> , 1976)	42	31	18	5	ni	ni	1	2	1
Mouton (Getz <i>et al.</i> , 1968)	43	35	10	1	1	2	ni	2	4
Bœuf (Wheeldon <i>et al.</i> , 1965)	38	30	16	6	1	ni	ni	3	11
Lapin (Nagamoto <i>et al.</i> , 1980)	40	41	11	1	1	ni	3	2	ni
Homme (Ansell <i>et al.</i> , 1968)	43	34	18	5	ni	ni	ni	ni	ni

Tableau 3 : Composition phospholipidique de la mitochondrie cardiaque chez différents mammifères.

AcP: acide phosphatidique; CL: cardiolipine; LPC: lysophosphatidylcholine; ni : non indiqué; PC: phosphatidylcholine; PE: phosphatidyléthanolamine; PG: phosphatidylglycérol; PI: phosphatidylinositol; PS: phosphatidylsérine; SM: sphingomyéline.

Bien que la membrane externe et la membrane interne soient reliées par des jonctions intercrêtes, ces deux membranes sont distinctes au niveau de leur composition, aussi bien

-Synthèse bibliographique-

lipidique que protéique. En effet, le rapport phospholipides/protéines est beaucoup plus haut dans la membrane externe que dans la membrane interne car la membrane externe contient davantage de lipides que la membrane interne. Hormis cette différence quantitative, la composition phospholipidique est également différente entre les deux membranes (tableau 4). Par exemple, la cardiolipine se trouve quasi-exclusivement dans la membrane interne alors que la membrane externe contiendra davantage de phosphatidylinositol.

	Phospholipides (% phospholipides totaux)						
	PL	PC	PE	CL	PI	LPC	SM
Membrane Interne	310	27	38	25	3	2	1
Membrane externe	510	56	28	<1	9	1	5

Tableau 4 : Composition phospholipidique des membranes mitochondriales interne et externe de cœur de porc (Comte *et al.*, 1976).

CL: cardiolipine; LPC: lysophosphatidylcholine; PC: phosphatidylcholine; PE: phosphatidyl-éthanolamine; PI: phosphatidylinositol; PS: phosphatidysérine; SM: sphingomyéline.

Quelques investigateurs ont également étudié l'orientation des phospholipides au niveau de la membrane interne (tableau 5). Les travaux de Harb (Harb *et al.*, 1978) et Krebs (Krebs *et al.*, 1979) ont montré que 75 à 90% de la cardiolipine était localisée au niveau de la face matricielle de la membrane interne, 50 à 60% de la phosphatidyléthanolamine était localisée au niveau de la face cytoplasmique. En revanche, la répartition de la phosphatidylcholine est controversée, soit répartie équitablement entre les deux faces de la membrane (Harb *et al.*, 1978), soit localisée au niveau de la face cytoplasmique (Krebs *et al.*, 1979).

	Pourcentage des phospholipides situés sur la face matricielle		
	PC	PE	CL
Cœur de bœuf (Krebs <i>et al.</i> , 1979)	75	62	30
Cœur de porc (Harb <i>et al.</i> , 1978)	90	20	50

Tableau 5: Distribution asymétrique des phospholipides de la membrane mitochondriale interne.

CL: cardiolipine; PC: phosphatidylcholine; PE: phosphatidyléthanolamine.

4.2.2. Composition en acides gras des phospholipides

La composition en acides gras des phospholipides de la mitochondrie est très variable d'un phospholipide à un autre (tableau 6). A noter que seule la composition en acide gras des trois principaux phospholipides mitochondriaux (phosphatidylcholine, phosphatidyléthanolamine et cardiolipine) sera discutée au cours de cette présente section.

La cardiolipine est excessivement riche en LA. La phosphatidyléthanolamine est très riche en stéarate et en AGPI-TLC: DHA et AA principalement. Pour les autres acides gras, on observe quelques différences entre les deux espèces. Par exemple, la phosphatidyléthanolamine de cœur de rat est riche en palmitate (Palmer *et al.*, 1981) tandis que celle de bœuf est riche en LA (Wheeldon *et al.*, 1965). Quant à la phosphatidylcholine, 30% des acides gras sont représentés par le palmitate et l'OA. Pour le reste des acides gras, des différences résident entre les 2 espèces. Chez le rat, la phosphatidylcholine contient environ 50% d'AA et de stéarate tandis que le LA représente presque 40% des acides gras de la phosphatidylcholine de bœuf.

4.2.3. Biosynthèse des phospholipides

Les membranes mitochondriales subissent continuellement un remodelage lipidique. La majorité des phospholipides de la membrane externe et de la membrane interne sont synthétisés dans le réticulum sarcoplasmique. La membrane interne catalyse la conversion de la phosphatidylsérine en phosphatidyléthanolamine via la phosphatidylsérine décarboxylase. La synthèse de la cardiolipine se déroule également dans la membrane interne. Les phospholipides synthétisés dans le réticulum sarcoplasmique sont transférés dans la mitochondrie au niveau de jonctions membranaires avec le réticulum appelées MAMs (mitochondria-associated membranes) (Achleitner *et al.*, 1999; Vance et Shiao, 1996). La phosphatidylsérine est transférée de MAMs à la membrane externe par un mécanisme à énergie non dépendant (Vance et Shiao, 1996; Shiao *et al.*, 1998). La phosphatidylsérine est transférée au niveau des jonctions intercrêtes et est décarboxylée par une phosphatidylsérine décarboxylase pour donner de la phosphatidyléthanolamine. La phosphatidyléthanolamine peut retourner dans le réticulum pour être méthylée et formée de la phosphatidylcholine (Vance et Shiao, 1996).

-Synthèse bibliographique-

	Phosphatidylcholine	Phosphatidyléthanolamine	Cardiolipine
C14:0			
Rat	0,1	0,2	0
Bœuf	ni	ni	ni
C16:0			
Rat	19,7	8,5	0,4
Bœuf	22,6	1,8	1,3
C16:1 n-7			
Rat	0,2	0,1	0,3
Bœuf	2,2	0,0	2,5
C18:0			
Rat	23,5	29,1	0,1
Bœuf	5,5	32,8	0,0
C18:1 n-9 (OA)			
Rat	10,1	6,0	3,1
Bœuf	13,5	4,4	9,0
C18:2 n-6 (LA)			
Rat	15,7	7,5	94,4
Bœuf	36,7	15,6	84,0
C18:3 n-3 (ALA)			
Rat	ni	ni	ni
Bœuf	2,5	0,8	2,7
C20:3 n-6			
Rat	0,3	0,1	0,5
Bœuf	5,9	3,6	0,0
C20:4 n-6 (AA)			
Rat	21,3	19,2	0,5
Bœuf	9,7	36,3	0,0
C20:5 n-3 (EPA)			
Rat	0,4	0,4	0,0
Bœuf	1,1	4,7	0,0
C22:4 n-6			
Rat	0,4	0,5	0,0
Bœuf	ni	ni	ni
C22:5 n-3 (DPA)			
Rat	1,9	2,6	0,2
Bœuf	ni	ni	ni
C22:6 n-3 (DHA)			
Rat	5,5	23,9	0,5
Bœuf	ni	ni	ni

Tableau 6: Composition en acides gras des trois principaux phospholipides de la mitochondrie cardiaque de rat (Palmer *et al.*, 1981) et de bœuf (Wheeldon *et al.*, 1965). Résultats exprimés en pourcentage des acides gras totaux. Ni : non indiqué.

4.2.4. Dégradation des phospholipides

Les phospholipases sont présentes dans toutes les membranes cellulaires. Au niveau de la mitochondrie, les phospholipases mitochondriales sont chargées d'hydrolyser les phospholipides des membranes mitochondriales. On peut distinguer la phospholipase A1, située sur la face externe de la membrane externe (Palmer *et al.*, 1981) et la phospholipase A2, une phospholipase Ca^{2+} dépendante située sur la face matricielle de la membrane interne (Nimmo *et al.*, 1995).

4.3. Fonction mitochondriale

4.3.1. Phosphorylation oxydative

La phosphorylation oxydative est primordiale pour toute vie cellulaire aérobie car elle constitue la principale source d'énergie utilisable. La phosphorylation oxydative est le mécanisme réalisant le couplage entre le transfert des électrons le long de la chaîne respiratoire et la synthèse d'ATP.

Le transport des électrons du NADH (origine mitochondriale) ou du FADH_2 (produit par le cycle du Krebs) vers l' O_2 est effectué grâce à la chaîne respiratoire. Selon la théorie chimiosmotique de Peter Mitchell (Mitchell, 1961), l'oxydation des équivalents réduits (NADH et FADH_2) le long de la chaîne de transport des électrons est couplée à un efflux de protons depuis la matrice vers l'espace intermembranaire. La membrane interne mitochondriale étant peu perméable aux protons, cette diffusion de protons génère un gradient électrochimique. Ce gradient de protons représente donc une force poussant les protons à retourner dans la matrice mitochondriale. Quand ces protons retournent dans la matrice par l'ATP synthase, l'énergie libérée permet alors la synthèse d'ATP (phosphorylation) d'où le couplage entre les oxydations et les phosphorylations (théorie chimiosmotique de Mitchell - section 4.3.1.2).

4.3.1.1. Organisation de la chaîne respiratoire

La chaîne respiratoire est constituée d'une cinquantaine de polypeptides qui s'associent en quatre complexes structurellement indépendants dont la plupart sont des protéines intrinsèques à la membrane mitochondriale interne. Chacun de ces complexes contient des groupements prosthétiques (tableau 7) engagés dans une série de réactions d'oxydoréduction. Les complexes sont disposés en fonction de leur potentiel d'oxydo-réduction. Les couples rédox sont des transporteurs d'électrons (par exemple $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ et $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$) ou des transporteurs d'électrons et de protons (c'est le cas des flavines et des quinones).

Complexe enzymatique	Masse (kDa)	Nombre sous-unités	Groupements prosthétiques
I. NADH-ubiquinone oxydoréductase	750	43	FMN, 8 centres Fe-S, 3 CoQ liés
II. Succinate-ubiquinone oxydoréductase	140	4	FAD, 3 centres Fe-S, 1-2 cytochromes de type b
III. Ubuquinol-cytochrome c oxydoréductase	250	11	2 hèmes type b, 1 centre Fe-S, 1 hème type c
IV. Cytochrome c oxydase	160	6-13	2 hèmes type a (a, a ₃), 3 ions Cu

Tableau 7 : Composants prosthétiques de la chaîne mitochondriale de transfert d'électrons.

La chaîne de transfert des électrons est donc une succession de réactions d'oxydo-réductions au niveau de la membrane mitochondriale interne où chaque complexe enzymatique a une activité bien spécifique (figure 25).

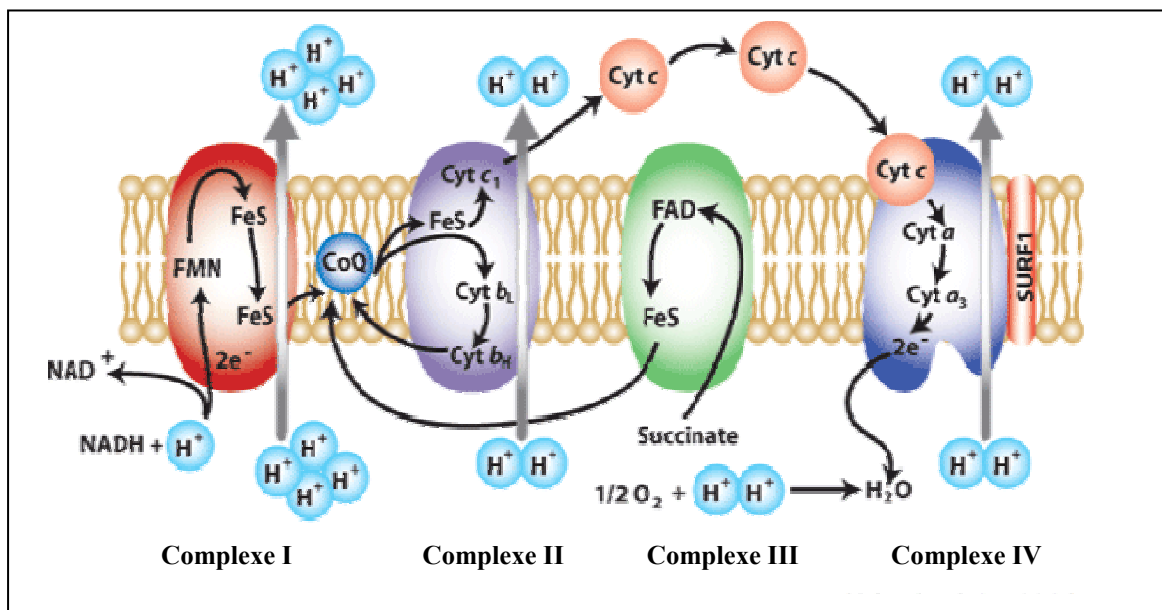


Figure 25 : Schéma de la chaîne respiratoire mitochondriale.

(Source: <http://public2.bcm.tmc.edu/pediatrics>)

➤ **Complexe I : NADH-ubiquinone oxydoréductase**

Le complexe I catalyse le transfert de deux électrons du NADH à l'ubiquinone. Cette réduction est couplée à l'efflux de quatre protons dans l'espace intermembranaire (H^+/e^-). Le NADH est réoxydé sur la face matricielle de la membrane par une NADH déshydrogénase en cédant 2 électrons (e^-) à la flavine mononucléotide (FMN). Ces deux électrons sont alors transférés à l'ubiquinone (ou coenzyme Q) par l'intermédiaire d'un centre fer-soufre.

➤ **Complexe II : succinate-ubiquinone oxydoréductase**

Ce complexe est composé de deux parties : la succinate-deshydrogénase hydrophile située sur la face interne de la membrane mitochondriale interne et une petite protéine hydrophobe contenant trois centres Fe-S. Le complexe II est ancré à la membrane par deux polypeptides membranaires contenant un ou deux cytochromes de type b. Ce complexe catalyse la réoxydation du succinate en fumarate en cédant directement deux hydrogènes à la flavine-adénine-nucléotide. Ensuite, les électrons sont transférés par l'intermédiaire d'une protéine fer-soufre à l'ubiquinone. Ce transfert d'électrons n'est pas couplé à l'efflux de protons.

➤ **Complexe II : ubiquinol-cytochrome c oxydoréductase (complexe bc₁)**

La réduction des ubiquinones est rendue possible grâce aux complexes I et II, à l' α -glycérophosphate déshydrogénase et à une autre déshydrogénase, une flavoprotéine impliquée dans la β -oxydation des acides gras. Les ubiquinones constituent un pool de coenzymes libres implantés dans la phase lipidique de la membrane. Les ubiquinones jouent un rôle de navettes des équivalents réduits entre les complexes protéiques membranaires et le complexe bc₁. Les électrons associés au cytochrome c₁ sont ensuite transférés sur le cytochrome c mobile qui les transmet au complexe IV (cytochrome c oxydase). Le transfert de deux électrons est couplé à l'éjection de quatre protons vers l'espace intermembranaire. Pour expliquer ce phénomène, Mitchell a proposé le mécanisme dénommé « Q cycle » ou « redox loop ». Selon ce mécanisme, il existe deux sites actifs pour lier l'ubiquinone :

- Q_o situé sur la face externe de la membrane, siège de l'oxydation de l'ubiquinone et de la libération des protons.
- Q_i situé sur la face interne de la membrane, siège de la réduction de l'ubiquinone et de la capture des protons.

Les électrons sont transférés du site Q_o au site Q_i. La caractéristique spécifique du cycle Q est la bifurcation des voies des électrons au niveau du site Q_o.

➤ **Complexe IV: cytochrome c oxydase**

Ce complexe catalyse la dernière réaction d'oxydoréduction de la chaîne de transport d'électrons. Le complexe IV bovin contient 13 sous-unités, les trois sous-unités majeures codées par l'ADN mitochondriale sont entourées par dix petites sous-unités codées par l'ADN nucléaire. La sous-unité I contient le centre actif – cytochrome a₃/Cu_B. La sous-unité II possède le centre binucléaire avec la valence mixte du cuivre – Cu_A qui reçoit les électrons du cytochrome c et du cytochrome a. La sous-unité III contient les phospholipides liés, leur rôle fonctionnel n'a cependant pas été encore établi. Le transfert d'électrons du cytochrome c à

-Synthèse bibliographique-

l'oxygène ainsi réduit en molécule d'eau est irréversible contrairement à celui qui a lieu au niveau des complexes I et III. Ce flux d'électrons est aussi associé au pompage de protons vers l'espace intermembranaire. Pour décrire le fonctionnement du complexe IV, Wilkstrom a proposé le mécanisme « pompe à proton ». Les électrons sont transférés par le cytochrome c vers le centre Cu_A de la sous-unité I puis vers l'hème du cytochrome a et ensuite vers le site actif du cytochrome a₃/ Cu_B de la sous-unité II. L'oxygène se lie directement avec l'hème a₃ et les protons passent par des canaux, dits canaux D et K pour accéder à la phase aqueuse du cytoplasme (Wilkstrom 2000). Au final, le complexe IV expulse quatre protons par molécule d'O₂ réduite en H₂O.

4.3.1.2. Théorie chimioosmotique de Mitchell

Selon la théorie chimioosmotique de Mitchell (Mitchell, 1961), l'énergie libre rendue disponible par l'écoulement du flux d'électrons à travers les différents complexes de la chaîne respiratoire est couplée à un transport de protons hors de la matrice mitochondriale. Le pompage des protons par les complexes I, III et IV (20 protons sont pompés par molécule d'O₂ réduite en H₂O) conduit à un gradient de concentration de protons de part et d'autre de la membrane interne qui se manifeste par un potentiel membranaire ($\Delta\Psi$) ainsi qu'une différence de pH (ΔpH) entre la matrice et l'espace intermembranaire.

La théorie chimioosmotique postule que le gradient de concentration de protons crée de part et d'autre de la membrane interne sert de réservoir d'énergie libre pour la synthèse d'ATP par l'ATP synthase.

4.3.1.3. MgATP synthase mitochondriale

La MgATP synthase est intégrée dans la membrane mitochondriale interne et est responsable de la phosphorylation de l'ADP en ATP. La MgATP synthase mitochondriale est une protéine complexe composée de 2 parties :

- F₀ située dans la membrane interne de la mitochondrie
- F₁ orientée vers la matrice mitochondriale.

L'ATP synthase synthétise de l'ATP en utilisant l'énergie du gradient de protons par un mécanisme rotatoire (Boyer et Walker, prix Nobel 1997).

La partie F₀ est constituée des sous-unités *a* et *c*. La partie F₁ est constituée des sous-unités *b*, δ , α (3 copies) et β (3 copies). La sous-unité *a* forme un canal à protons tandis que les sous-

-Synthèse bibliographique-

unités b , δ , α_3 et β_3 constituent le stator et les sous-unités c , γ et ϵ constituent le rotor, structure rotative chargée de transférer l'énergie du flux de proton à la synthèse de l'ATP (Wang et Oster, 1998) (figure 26).

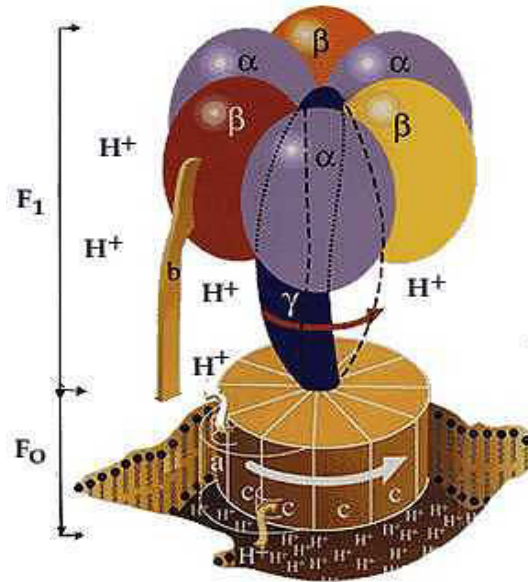


Figure 26 : Structure de la MgATP synthase.

(Source: <http://nobelprize.org/chemistry/laureates/1997/press.html>)

D'après Elston et collaborateurs (Elston *et al.*, 1998), chaque sous-unité c a un aspartate qui, protoné, est en contact avec les lipides. Seules deux positions permettent la déprotonation. Chaque sous-unité c doit être en contact avec la sous-unité a et être associée à un demi-canal vers l'une des surfaces de la membrane. Un proton doit faire un tour presque complet de l'anneau, entre son entrée du côté cytosolique et sa sortie vers la matrice. La protonation de l'aspartate par un proton venu du côté cytosolique lui permet de tourner dans la membrane et de venir sur la position déprotonable du côté de la matrice. Le proton dissocié part alors vers le bas. Le résultat de l'entrée par le haut d'un proton et de la sortie par le bas est la rotation de l'anneau de sous-unités c d'une unité vers la droite. La sous-unité ϵ fait partie du rotor et sa rotation peut être observée lors de l'hydrolyse de l'ATP. Ainsi, les sous-unités γ et ϵ tournent ensemble dans le même sens pendant la synthèse de l'ATP (Cross, 2000). Ce faisant, l'ATP synthase récupère l'énergie utilisée par les enzymes de la chaîne respiratoire pour accumuler les protons dans l'espace intermembranaire. Cette énergie est couplée à la réaction de phosphorylation de l'ADP par rotation de la sous-unité γ . Cette réaction de 31 kJ/mol nécessite la présence de magnésium. Une rotation complète du rotor produit 3 molécules d'ATP selon un mécanisme de liaison-échange (figure 27).

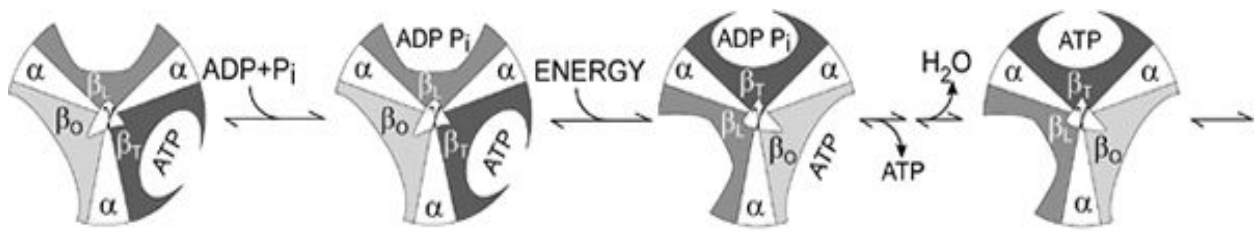


Figure 27 : Schéma du mécanisme de liaison-échange (Boyer 1993).

(Source: <http://www.nobel.se/chemistry/laureates/1997/press.html>)

La rotation de la tige γ déforme les 3 sous-unités β du stator qui contiennent les sites actifs de synthèse d'ATP. Selon sa conformation, la sous-unité β a une affinité différente pour l'ATP (Boyer 1993, Cross 2000). La conformation O (ouvert) possède une très faible affinité pour les ligands et elle est inactive catalytiquement. La conformation L (lâche) possède un site de relâche pour les ligands et est également inactive catalytiquement. La conformation T (tendu).

La synthèse d'ATP se déroule en 3 étapes :

- 1°) liaison de l'ADP et de P_i sur le site L
- 2°) changement conformationnel du site L en site T, du site T en site O et du site O en site L
- 3°) synthèse de l'ATP sur le site T et libération de l'ATP du site O

Cette séquence de réactions se répète deux fois afin que l'enzyme revienne à l'état initial. L'énergie qui provoque le changement conformationnel est transmis vers l'ensemble catalytique $\alpha_3\beta_3$ par la rotation de l'ensemble $\gamma\varepsilon$.

La MgATPase F_0F_1 peut également catalyser la réaction inverse. En absence de gradient de protons, la même enzyme peut hydrolyser de l'ATP (ATPase pompe à H^+). En effet, l'affinité pour l'ATP est modifiée et γ se met à tourner dans le sens inverse afin de recréer elle-même un gradient de protons.

4.3.2. Transport de l'énergie de la mitochondrie vers le cytosol

Le système de transport d'énergie est constitué de l'adénine nucléotide translocase, des les créatines kinases, des adénylates kinases et de la porine.

4.3.2.1. L'adénine nucléotide translocase

L'adénine nucléotide translocase (ANT) est la protéine la plus abondante de la membrane interne mitochondriale, elle représente jusqu'à 9 à 10% de la totalité des protéines mitochondriales. La protéine ANT appartient à la famille des transporteurs métaboliques et est exprimée sous la forme de 3 isoformes : ANT1, ANT2 et ANT3. L'isoforme ANT1 est

-Synthèse bibliographique-

l'isoforme principal du cœur et du muscle squelettique. La protéine fonctionnelle ANT est un dimère (Hackenberg et Klingenberg, 1980 ; Klingenberg 1981) (figure 28) qui est ancré dans la membrane mitochondriale interne par l'intermédiaire de 6 molécules de cardiolipine (Beyer et Klingenberg, 1985) indispensables à son bon fonctionnement (Hoffmann *et al.*, 1994). ANT assure un système de transport électrogénique des nucléotides adényliques c'est-à-dire l'ATP et l'ADP sont échangés sous forme d'anions libres (Verdouw et Bertina, 1973; Vignais 1976).

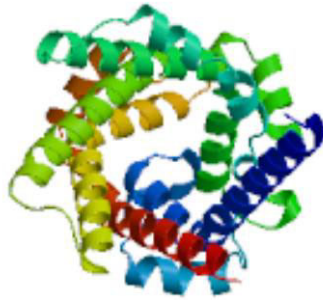


Figure 28 : Structure tridimensionnelle de l'adénine nucléotide translocase.
Cristallographie électronique de l'isoforme ANT1 de rat, résolution 2,20 Å.
(Source: <http://www.expasy.org/uniprot/Q05962>)

4.3.2.2. La porine

La membrane mitochondriale externe est rendue perméable grâce à la porine, encore appelée VDAC (voltage dependant anion channel) (Colombini, 1979). La microscopie électronique fournit de précieuses informations sur la taille et la forme de VDAC (figure 29).

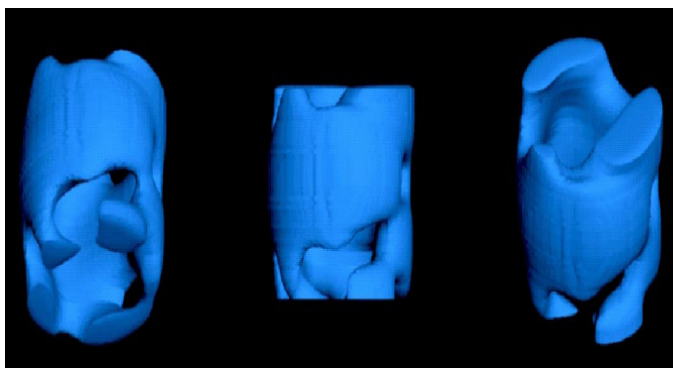


Figure 29 : Structure tridimensionnelle de VDAC (Mannella 1998).
Cristallographie électronique de l'isoforme VDAC1 de rat, résolution 17 Å.

La porine forme un canal de 31 kDa et a un diamètre interne de 2 à 4 nm et un diamètre externe de 4 à 5 nm. Le canal a une hauteur équivalente à l'épaisseur de la bicouche (5 nm) et

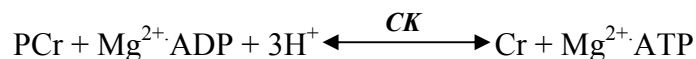
-Synthèse bibliographique-

forme un cylindre à l'intérieur aqueux (Mannella, 1987). VDAC est également constitué de seize feuillets β constituant les parois du canal et d'une extrémité N-terminal formant une hélice α mobile située à la lumière du canal. Protéine transmembranaire, VDAC assure les échanges entre l'espace intermembranaire et le cytosol. VDAC est un canal non spécifique et perméable aux molécules de petites tailles (<10 kDa) comme par exemple les anions, les cations, les acides gras, le pyruvate et des nucléotides. Grâce à VDAC, la composition de l'espace intermembranaire est comparable à celui du cytosol.

L'ouverture/fermeture de VDAC est influencée par le pH et le potentiel membranaire. A partir d'une valeur pH inférieure à 5, la protéine subit des modifications conformationnelles impliquant un abaissement des feuillets β et une élévation de l'hélice α , à l'origine d'une perméabilité transitoire de VDAC (Manella, 1998). Des expériences réalisées sur membrane artificielle ont montré que pour un voltage inférieur à 30 mV, le pore s'élargit et devient sélectif aux anions. Pour un voltage supérieur à 30 mV, le diamètre du pore se resserre, la conductance diminue et la sélectivité ionique devient préférentielle pour les cations (Colombini, 1987; Zhang et Colombini, 1990).

4.3.2.3. Les créatines kinases

Les cellules à métabolisme énergétique élevé expriment la créatine kinase (CK). La CK catalyse le transfert réversible d'un groupe phosphate riche en énergie de la phosphocréatine (PCr) vers l'ADP pour former de la créatine (Cr) et de l'ATP selon la réaction de Lohmann :



La famille des CK est codée par quatre gènes indépendants qui code pour un isoforme monomérique différent. Les isoformes de CK sont classés suivant leur compartimentation intracellulaire. On distingue alors :

- l'isoforme cytosolique M-CK exprimé dans le cytoplasme du cœur et des muscles squelettiques
- l'isoforme cytosolique B-CK exprimé dans le cytoplasme des cellules du cerveau, du cœur, des muscles lisses, de l'utérus, du placenta, du côlon et dans les lignées de culture cellulaire.
- l'isoforme mitochondrial Mi_a -CK (ubiquitaire), exprimé au cours du développement pré-natal dans l'intestin, le cerveau, les reins, le placenta, l'utérus.
- L'isoforme mitochondrial Mi_b -CK (sarcomérique), exprimé uniquement dans le cœur et les muscles squelettiques.

-Synthèse bibliographique-

L'association de ces monomères donne naissance à différents isoenzymes de CK. Dans le cytosol, la CK est présente sous forme de dimère et est exprimée différemment suivant le tissu. On aura alors :

- la BB-CK présente dans le cerveau, le cœur, les muscles lisses, l'utérus, le placenta, le côlon et dans les lignées de culture cellulaire.
- la MB-CK détectée en faible quantité dans le cœur et durant le développement prénatal des mammifères.
- la MM-CK présente dans le cœur et les muscles squelettiques (figure 30). La MM-CK cardiaque est localisée au niveau des myofibrilles. Au niveau de ces sites d'utilisation de l'ATP, MM-CK est couplée fonctionnellement aux ATPases myofibrillaires (Ventura-Clapier et al., 1998; Krause et Jacobus, 1992) et aux Ca^{2+} ATPases du réticulum sarcoplasmique (Grosse et al., 1980) pour régénérer localement de l'ATP à partir de PCr et d'ADP.
- Quant aux isoformes mitochondriales (Ckmit), ils génèrent des homodimères et des homooctamères d'isoenzymes mitochondriaux (Schnyder et al., 1988; Schlattner et al., 1998) localisés au niveau de la surface externe de la membrane mitochondriale interne (Jacobs et al., 1964). Cheneval et Carafoli ont montré que la CKmit se fixe au niveau des regroupements de cardiolipine de la membrane interne (Cheneval et Carafoli, 1988). La CKmit génère de l'ADP et de la PCr à partir de Cr et d'ATP produit au niveau de la mitochondrie. Par l'intermédiaire de la navette créatine-phosphocréatine, l'activité de la CK permet ainsi de transférer l'énergie jusqu'aux sites d'utilisation.



Figure 30 : Structure tridimensionnelle de la créatine kinase mitochondriale. Cristallographie électronique de la Ckmit sarcomérique de rat, résolution 2,70 Å. (Source: <http://www.expasy.org/uniprot/P09605>)

4.3.2.4 Théorie du couplage fonctionnel

Depuis une trentaine d'années, on connaît le rôle stimulant de la créatine sur la respiration mitochondriale (Bessam et Fonyo, 1966). A la suite de ce travail, le rôle fonctionnel de la

-Synthèse bibliographique-

Ckmit a pu être élucidé (Vial *et al.* 1972, Jacobus et Lehninger 1973; Saks *et al.*, 1974). Ces travaux ont montré que le rapport PCr/O = rapport ADP/O \approx 3. La conclusion commune a été alors de dire que la PCr était le produit final de la respiration mitochondriale.

La Ckmit est fonctionnellement couplée avec ANT (Saks *et al.*, 1976). L'interaction de la Ckmit avec ANT forme un complexe qui délimite un microcompartiment des nucléotides adényliques. L'ATP mitochondrial est canalisé par ANT vers ce microcompartiment. L'ATP sature alors rapidement les sites actifs de la Ckmit. L'ADP, issu de la réaction de phosphorylation de la créatine avec l'ATP mitochondrial, est alors à son tour libéré dans ce microcompartiment. L'ADP est ensuite rapidement transporté dans la matrice par ANT en change d'ATP.

L'ANT lie fortement six cardiolipines (Beyer *et al.*, 1985), la protéine peut parfois se localiser à l'intérieur du regroupement de cardiolipines (Drees et Beyer, 1988). Un tel cluster de cardiolipines lie également la Ckmit (Schlame et Augustin, 1985; Cheneval et Carafoli, 1988) d'où une interaction entre Ckmit et ANT. L'utilisation d'anti-corps anti-Ckmit a permis de montrer qu'en se fixant sur la Ckmit, les anti-corps empêchaient toute interaction de la Ckmit avec ANT et donc empêchait la formation d'un microcompartiment nécessaire au bon déroulement des oxydations phosphorylantes (Saks *et al.*, 1987).

Pour prouver que le couplage fonctionnel n'est pas le simple résultat d'une compartimentation de l'ATP dans l'espace intermembranaire (Erickson-Viitanenn *et al.*, 1982), Saks et collaborateurs ont mis en évidence l'existence d'un couplage fonctionnel sur des mitoplastes de cœurs de rat respirant en présence de créatine (Saks *et al.*, 1985). Dans ce travail, la composition du milieu avait été établie de telle sorte que le rapport $\frac{[PCR][ADP]}{[Cr][ATP]}$ soit supérieur à la constante d'équilibre de la CK. Dans ces conditions, si le système est régulé par des mécanismes thermodynamiques, la production de PCr est impossible et le système doit évoluer vers l'équilibre. Cependant, les auteurs ont observé l'inverse. Le rapport $\frac{[PCR][ADP]}{[Cr][ATP]}$ s'est éloigné de l'équilibre du fait de la production continue de PCr. Ce n'est que lorsque la phosphorylation oxydative a été inhibée par l'oligomycine que la réaction a changé de direction et s'est rapprochée de l'équilibre. En conséquence, si la réaction de la CK est couplée à la phosphorylation oxydative alors la réaction de la CK est déplacée de son équilibre vers la production de PCr.

4.3.2.5. Les adénylates kinases

L'adénylate kinase (AK) est une ATP/AMP phosphotransférase qui catalyse la réaction réversible : $Mg:ADP + ADP \longleftrightarrow Mg:ATP + AMP$.

Une des fonctions majeures de l'AK est de maintenir une homéostasie temporelle des concentrations en nucléotides adényliques, c'est une sorte de tampon temporel d'énergie.

-Synthèse bibliographique-

Cette hypothèse est d'ailleurs renforcée par le fait que la constante d'équilibre de la réaction AK est voisine de 1 et que les activités AK sont suffisamment élevées pour catalyser une réaction proche de l'équilibre (Pradet et raymon, 1983).

La réaction directe de l'AK ($2ADP \longrightarrow ATP + AMP$) permet de maintenir un rapport ATP/ADP élevé et de minimiser l'énergie libre nécessaire pour le fonctionnement des enzymes ATP-dépendants .

La réaction inverse de l'AK ($ATP + AMP \longrightarrow AMP + 2ADP$) permet de stocker un excédent d'ATP sous forme d'ADP. En maintenant un rapport ATP/ADP bas, l'AK favorise l'échange d'ATP contre celui d'ADP par ANT et permet ainsi maintenir un rapport ATP/ADP bas dans la matrice, lequel est favorable à une phosphorylation de l'ADP par les ATP synthases. Ces mécanismes ne sont pas en conflit avec l'homéostasie des nucléotides adényliques observé au niveau cellulaire car les changements se produisent d'une manière strictement localisée et sont vite équilibrés par d'autres pools de nucléotides adényliques cellulaires.

4.3.2.6. L'unité énergétique intracellulaire

Au sein du cardiomyocyte, les mitochondries sont incluses en complexes fonctionnels avec les myofibrilles et le réticulum sarcoplasmique. Selon Saks, ces complexes pourraient former des unités énergétiques intracellulaires ou ICEUs (the intracellular energetic units) (Saks *et al.*, 2001) représenté par la figure 31. D'après cette théorie, le métabolisme énergétique d'une cellule serait le résultat du fonctionnement synchronisé des unités métaboliques répétitives. La respiration mitochondriale serait contrôlée par l'ADP issu de l'activité des systèmes enzymatiques de proximité, indépendamment des concentrations de la phase cytosolique ou des unités voisines. Etant donné l'hétérogénéité morphologique et fonctionnelle des mitochondries (Collins *et al.*, 2002), le niveau d'organisation serait variable et par conséquent, indépendant d'une mitochondrie à l'autre au sein d'une même cellule. Arguments qui confortent la théorie de l'ICEU. Etant donné l'organisation structurale et fonctionnelle du cardiomyocytes, la fonction mitochondriale est régulée *in vivo* par la canalisation de l'ADP et ATP. Cette régulation est effectuée grâce au couplage fonctionnel entre les enzymes et les interactions intimes protéine-protéine (Dzeja *et al.*, 1998 ; Kay *et al.*, 2000).

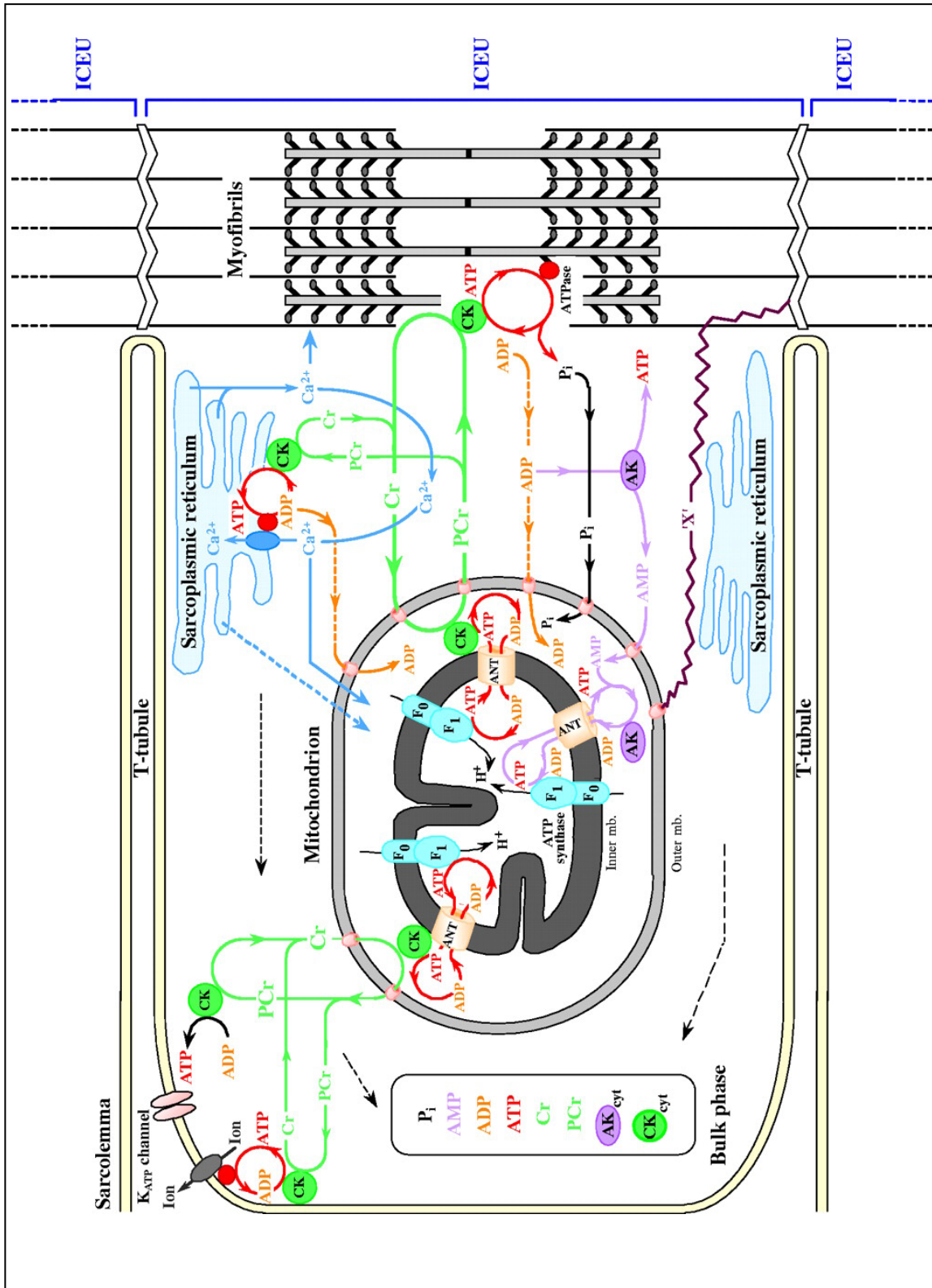


Figure 31: Organisation schématique de l'unité énergétique intracellulaire (ICEU) (Saks et al., 2001).

4.4. Influence des lipides mitochondriaux sur la fonction mitochondriale

4.4.1. Influence des lipides sur les enzymes de la mitochondrie

De nombreux enzymes de la membrane interne interagissent avec les phospholipides membranaires (tableau 8).

Enzyme	Fonction du lipide		
	Liaison	Activation	Inhibition
Cytochrome c oxydase (Awasthi <i>et al.</i> , 1971; Fry <i>et al.</i> , 1980; Robinson <i>et al.</i> , 1980)	CL	CL, PE, PC	
MgATP synthase (Santiago <i>et al.</i> , 1973; Brown <i>et al.</i> , 1982)	CL, PS	CL, PS	PE
Complexe I (Fry <i>et Green</i> , 1981)	CL, PE, PC	CL, PC	
Complexe III (Fry <i>et Green</i> , 1981)	CL, PE, PC	CL	

Tableau 8: Interactions et modulation des enzymes membranaires par les phospholipides de la mitochondrie cardiaque.

CL: cardiolipine; PC: phosphatidylcholine; PE: phosphatidyléthanolamine; PS: phosphatidylsérine.

Le cytochrome c oxydase se lie très étroitement à deux ou trois molécules de cardiolipine (Awasthi *et al.*, 1971; Fry *et al.*, 1980), la phosphatidylcholine et la phosphatidyléthanolamine se lient également cette protéine. Robinson et collaborateurs ont défini trois sites de liaison aux phospholipides sur la cytochrome c oxydase (Robinson *et al.*, 1980). Le premier site a la plus faible affinité et n'est pas essentiel à l'activité de l'enzyme. Le second site se lie plus étroitement aux phospholipides mais n'est pas essentiel à l'activité de l'enzyme. Le troisième site a une très forte affinité pour la cardiolipine, 2 à 3 cardiolipines sont d'ailleurs nécessaires au bon fonctionnement de l'enzyme. Autre protéine, la MgATP synthase, dont l'activité est stimulée par la liaison à de la cardiolipine ou de la phosphatidylsérine (Santiago *et al.*, 1973; Brown *et al.*, 1982). Les complexes I et III ont également une activité optimale si ils sont liés à de la cardiolipine, de la phosphatidylcholine et de la phosphatidyléthanolamine (Fry *et Green*, 1981).

4.4.2. Influence des lipides sur la phosphorylation oxydative

La production d'énergie est une des plus importantes fonctions de la mitochondrie. La respiration et la phosphorylation oxydative sont hautement sensibles à la composition lipidique de la mitochondrie et spécialement à celle de la membrane interne. Burstein et

-Synthèse bibliographique-

collaborateurs (Burstein *et al.*, 1971 et 1971b) ont étudié les effets d'un traitement à la phospholipase sur la structure et la fonction de la mitochondrie de cœur de bœuf. Les auteurs ont montré que les vitesses d'oxydation et de phosphorylation sont diminuées après une exposition aux phospholipases. L'effet inhibiteur de faibles concentrations de phospholipase A2 sur la phosphorylation ont été évités ou réversés par du sérum albumine bovine. Pour de fortes concentrations en phospholipase A2, ni le sérum albumine bovine, ni la phosphatidylcholine ont été efficaces pour restaurer le couplage.

En revanche, après un régime enrichi en huile d'arachide (Blomstrand et Svensson, 1983) ou en huile de tournesol (Hsu et Kummerow, 1977), les mitochondries cardiaques ont une consommation d'oxygène, un contrôle respiratoire et un rapport ADP/O plus élevés que des mitochondries cardiaques de rats supplémentés avec de l'huile de colza ou de la graisse hydrogénée.

V. Evidences épidémiologiques du rôle cardioprotecteur de l'éthanol

L'association inverse entre la consommation modérée d'alcool et le risque de morbi-mortalité cardiovasculaire a été documentée dans divers types d'études épidémiologiques comme :

- ***les études dites écologiques ou d'observation*** de populations ou de pays qui comparent les données de morbidité ou de mortalité avec les données de consommation. Ces données sont typiquement collectées par des agences gouvernementales ou des programmes de surveillance internationale.
- ***les études cas-témoins*** dans lesquelles les sujets ayant une maladie coronaire sont sélectionnés rétrospectivement et leur consommation d'alcool est comparée à un groupe de sujets appariés sans maladie coronaire. Cependant les études cas-témoins peuvent produire des biais: en particulier ceux dus au défaut de comparabilité avec les témoins, ou aux difficultés à préciser la consommation passée d'alcool.
- ***les études prospectives de cohorte*** où la consommation d'alcool est déterminée au départ chez chaque sujet d'une cohorte bien définie et qui est ensuite suivie régulièrement. Plusieurs études de ce type ont été réalisées.
- ***les études de prévention ou d'intervention*** qui consiste à comparer un groupe contrôle avec un groupe expérimental pour lequel la consommation d'alcool a été imposée. Ce type d'étude est méthodologiquement plus démonstratif. Néanmoins, cela n'a jamais été réalisé avec le vin car évidemment, éthiquement impossible à réaliser.

Cette présente section se propose donc de faire le point sur les différentes études épidémiologiques de ces 30 dernières années en décrivant successivement les résultats des études écologiques, des études cas-témoins et des études prospectives de cohorte.

5.1. Etudes écologiques

Depuis 1979, une dizaine d'études écologiques ont étudié l'association entre la consommation d'alcool et la mortalité coronarienne (tableau 9). La première étude écologique fut menée par l'équipe de Léger (Léger *et al.*, 1979) et a consisté à évaluer la relation entre la consommation de boissons alcoolisées et la mortalité par cardiopathies ischémiques dans 18 pays développés, chez les hommes et les femmes âgés de 55 à 64 ans. Les résultats ont révélé une forte relation négative entre vin et mortalité coronaire, une relation négative moins forte avec les spiritueux, et une relation positive entre bière et mortalité coronaire. Cependant, l'analyse en régression multiple a permis de préciser que seul le vin était significativement relié à la mortalité coronaire. Par ailleurs, les auteurs ont également trouvé une relation positive entre la mortalité coronaire et la consommation de graisses saturées et une relation négative entre la mortalité coronaire et la consommation de graisses mono- et polyinsaturées. Laporte (Laporte *et al.*, 1980) a également reporté que la consommation modérée d'alcool était associée à une baisse de la mortalité coronaire au cours d'une étude menée à travers 20 pays industrialisés chez des hommes entre 55 et 64 ans. Quant à l'équipe de Werth (Werth *et al.*, 1980), leur étude a consisté à suivre la consommation annuelle de vin des hommes et des femmes de chaque état des USA entre 1969 et 1978 et a trouvé une relation négative très significative avec la mortalité coronaire. Dans la même période, d'autres études ont également observé que si une relation inverse liait la mortalité cardiaque avec la consommation de vin, en revanche cette relation était plus faiblement prononcée voire parfois inexistante pour la consommation de bière ou de spiritueux (Schmidt *et al.*, 1981; Nanji *et al.*, 1985 et 1986; Hegsted *et al.*, 1988). Depuis une quinzaine d'années, est apparu le terme de "French Paradox", phénomène d'origine française qui définit le faible taux de cardiopathies ischémiques observé dans un pays où la diète est paradoxalement riche en graisses saturés (Renaud et de Lorgeril, 1992; Artaud-Wild S *et al.*, 1993). Ce particularisme a été mis en évidence au cours du projet MONICA qui a consisté à étudier la relation entre graisses alimentaires, vin et mortalité coronaire dans 40 pays développées (figure 32).

Corrélation entre le type d'alcool consommé et la mortalité coronarienne

Référence	Date	Echantillon	Vin	Bière	Spiritueux	Commentaires
St Léger <i>et al.</i> , 1979	1970	Hommes et femmes de 18 pays, âge: 55-64.	Hommes: -0,70 Femmes: -0,61	Hommes: 0,23 Femmes: 0,31	Hommes: -0,26 Femmes: -0,32	Pas d'ajustement
Laporte <i>et al.</i> , 1980	1972	Hommes de 20 pays, âge: 55-64 ans.	-0,62	0,15	-0,29	Ajustement: repas
Werth 1980	1969 à 1978	Hommes et femmes, USA	-0,49 à -0,58	ni	ni	Pas d'ajustement
Schmidt <i>et al.</i> , 1981	1970	Hommes et femmes, USA	-0,28 (p<0,05)	-0,06 (ns)	-0,26 (p<0,05)	Ajustement: tabac
Nanji 1985	1970	Hommes dans 27 pays développés.	0,75 (p<0,001)	0,60 (p<0,001)	Pas d'association	Pas d'ajustement
Nanji <i>et al.</i> , 1986	1970 à 1980	Hommes dans 22 pays développés	0,50 (p<0,01)	0,32 (p<0,05)	ni	Pas d'ajustement
Hegsted 1988	1971 et 1973	Hommes dans 18 pays	p<0,01 (inverse)	ns	ns	Ajustement: apports en graisses saturées et polyinsaturés
Renaud et de Lorgeril, 1992	1987	Hommes de 17 pays, âge: 35-64 ans.	-0,87 (p<0,0001)	ns	ns	Ajustement: apports lipidiques quotidiens
Artaud-Wild <i>et al.</i> , 1993	1977	Hommes de 40 pays, âge: 55-64 ans.	-0,16 (ns)	ni	ni	Consommation d'alcool significativement corrélée avec la mortalité (r=0,35) mais inversement corrélée avec la mortalité pour les pays grands consommateurs de graisses saturées et de cholestérol
Criqui <i>et al.</i> , 1994	1965 1970 1980 1988	Hommes et femmes de 21 pays, âge: 35-74 ans.	p<0,07 (inverse) p<0,01 inverse p<0,01 (inverse) p=0,12 (inverse)	ns 0,09 (inverse) ns ns	P=0,12 (inverse) ns ns ns	Contrôle de la consommation de graisses, légumes et fruits

Tableau 9 : Corrélation entre la consommation d'alcool et la mortalité coronarienne.
Ns : non significatif; ni : non indiqué.

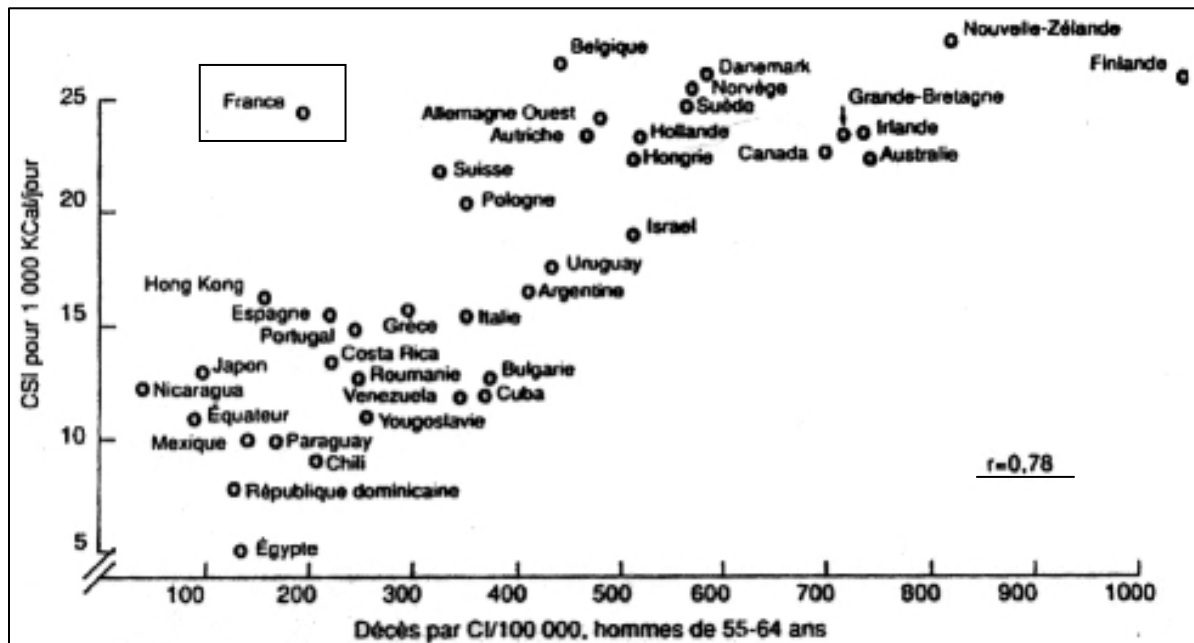


Figure 32 : Who Monica Project : corrélation entre le risque de mortalité coronaire et une alimentation riche en cholestérol et en graisses saturées (CSI). Corrélation valable pour quarante pays développés excepté la France (Artaud-Wild et al, 1993). CSI : cholesterol saturated fat index.

Malgré sa forte consommation de graisses saturées, la France est apparue le pays avec le plus bas taux de mortalité cardiaque et la consommation modérée de vin semblerait être la clé de ce mystère français (Renaud et de Lorgeril, 1992).

Criqui et collaborateurs (Criqui et Ringel, 1994) ont également menée une vaste étude dans 21 pays développés. Les sujets étaient âgés entre 35 et 74 ans et étaient évalués à quatre périodes: 1965, 1970, 1980 et 1988. Les variables indépendantes étaient la consommation de: vin, bière, spiritueux, graisses animales, légumes et fruits. Cette étude révéla que le vin était la boisson alcoolisée la plus fortement corrélée (négativement) avec le risque de maladies coronaires tandis que les graisses animales présentaient une tendance à la corrélation positive et les fruits à une corrélation négative.

En résumé, ces études montrent généralement une forte association inverse entre la consommation de vin et la mortalité cardiaque tandis que cette relation n'apparaît pas ou peu avec les autres boissons alcoolisées. Toutefois, les études écologiques ont certaines limitations. Certaines caractéristiques alimentaires associées à la consommation d'alcool ne sont pas prises en compte, créant ainsi des biais et surestimant le pouvoir de l'alcool sur les risques cardiovasculaires. D'autre part, si la consommation d'alcool d'une population est considérée comme légère, moyenne ou modérée, cela peut toutefois masquer une

consommation élevée d'un petit groupe au sein de cette population. Enfin, dans certains pays, certains buveurs de vin ont un statut socio-économique plus élevé, un style de vie plus sain, un meilleur accès aux soins médicaux; ceci peut également constituer un biais dans la relation entre la consommation d'alcool et la fréquence de maladies coronaires.

5.2. Etudes cas-témoins

Trois études cas-contrôles fournissent des estimations sur le risque relatif de maladies coronaires en fonction du type d'alcool consommé (tableau 10). Hennekens (Hennekens *et al.*, 1979) et Rosenberg (Rosenberg *et al.*, 1981) ont reporté une association inverse entre le type de boisson alcoolisée et le risque de maladies coronaires. Chez les hommes, la consommation de spiritueux était plus fortement associée avec la réduction des risques de mortalité coronarienne (Hennekens *et al.*, 1979) tandis que chez les femmes, c'est la consommation de vin qui était associée à une réduction des risques d'infarctus non mortel (Rosenberg *et al.*, 1981). En revanche, Kaufman a trouvé que la bière, les spiritueux et surtout le vin étaient positivement associés à un risque d'infarctus du myocarde (Kaufman *et al.*, 1985).

En résumé, les résultats des études cas-contrôles sont contrastés. Aucune boisson alcoolisée n'apparaît plus cardioprotective qu'une autre. Cependant, si ces études cas-témoins permettent de créer des relations entre la consommation d'un nutriment et le risques d'une pathologie donnée, parfois des biais peuvent se produire: défaut à comparer les groupes témoins ou difficultés à préciser la consommation passée d'alcool.

Type d'alcool consommé et risque relatif de maladies coronaires					
Référence	Echantillon	Vin	Bière	Spiritueux	Commentaires
Hennekens <i>et al.</i> , 1979	1136 hommes, âge: 30-70 ans. Lieu: Boston. 568 victimes d'une maladie coronaire fatale vs 568 contrôles.	oz/jour 0 ≤2 >2 RR 1,0 0,3 (p<0,001) 1,0	oz/jour 0 ≤2 >2 RR 1,0 0,3 (p<0,001) 1,0	oz/jour 0 ≤2 >2 RR 1,0 0,2 (p<0,001) 1,1	Ajustement: tabac, poids, hospitalisation antérieure pour arrêt cardiaque
Rosenberg <i>et al.</i> , 1981	1431 femmes, âge<50 ans. Lieu: Boston New York et Philadelphie. 513 femmes victimes d'un infarctus vs 918 contrôles.	Verre/jour 0 1 RR 1,0 0,4 (p<0,001)	Verre/jour 0 1 RR 1,0 0,8	Verre/jour 0 1 RR 1,0 0,9	Résultats similaires avec ou sans ajustement des facteurs confondants. Les femmes qui boivent plus d'un verre/jour ont un risque relatif de 0,6
Kaufman <i>et al.</i> , 1995	3151 hommes, âge<50 ans. Lieu: nord-est des Etats-Unis. 2170 hommes victimes d'un infarctus vs 981 contrôles.	oz/semaine 0 <5 5-9 10-19 ≥20 RR 1,0 1,2 1,82 2,4	oz/semaine 0 <5 5-9 10-19 ≥20 RR 1,0 1,3 1,1 1,2 1,1	oz/semaine 0 <5 5-9 10-19 ≥20 RR 1,0 1,1 1,3 1,7 1,0	Ajustement: âge et tabac

1oz d'alcool = 28,3 g d'alcool

Tableau 10 : Type d'alcool consommé et risque de maladie coronarienne (résultats issus d'études cas-contrôles).
RR : risque relatif.

5.3. Etudes prospectives de cohorte

De nombreuses études ont examiné la relation entre consommation de boissons alcoolisées et morbi-mortalité cardiovasculaire. Pratiquement toutes les études prospectives ont montré que la relation entre la consommation d'alcool et la mortalité toutes causes était une courbe en U (Shaper *et al.*, 1988; Bofetta *et al.*, 1990; Klatsky *et al.*, 1993; Maxwell *et al.*, 1994; Gaziano *et al.*, 1999) ou en J (Friedman et Kimball, 1986; Klatsky *et al.*, 1992; Camargo *et al.*, 1997). Les figure 33 et 34 illustrent d'ailleurs ces données.

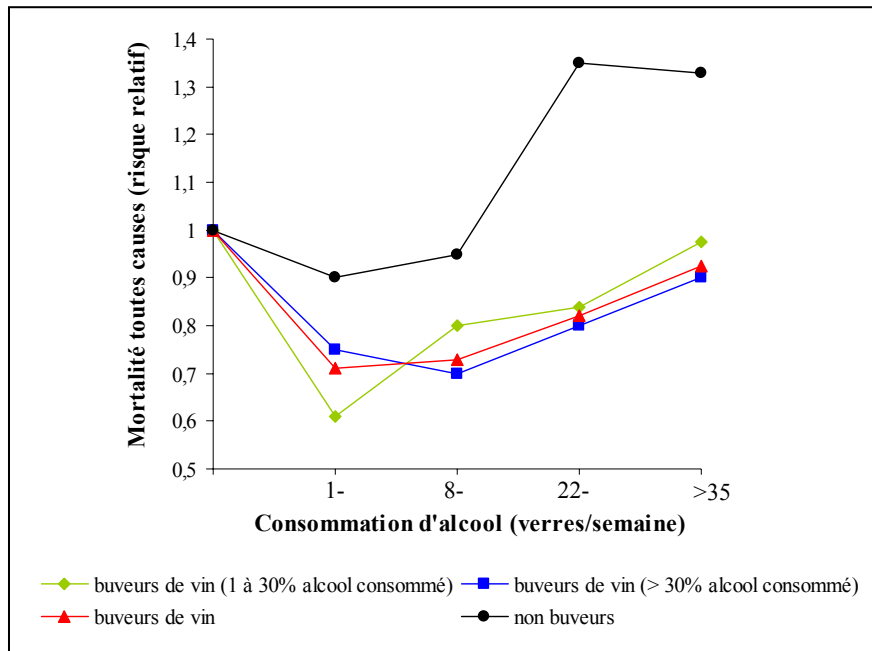


Figure 33 : Consommation d'alcool et risque de mortalité toutes causes (Renaud *et al.*, 1999).

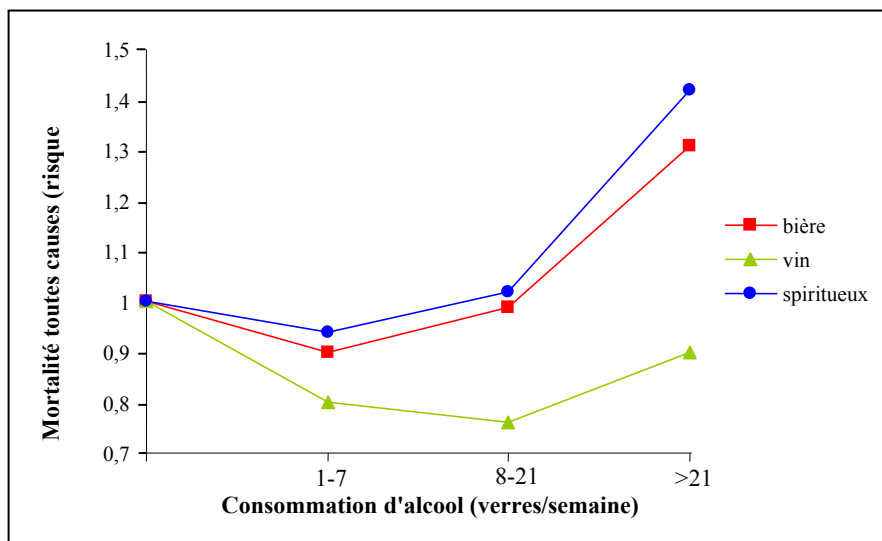


Figure 34 : Consommation d'alcool et risque de mortalité toutes causes (Renaud *et al.*, 1999).

-Synthèse bibliographique-

En ce qui concerne la mortalité cardiovasculaire, les résultats sont discordants. Les études montrent une relation inverse, une courbe en U, en L ou en J. Dans tous les cas, pour la majorité de ces travaux, une consommation légère à modérée d'alcool est associée à une nette protection contre la morbi-mortalité cardiovasculaire et plus exactement contre les risques d'infarctus du myocarde, de maladies coronaires, de mortalité par coronaropathie, de mort subite et de crise cardiaque (figure 35).

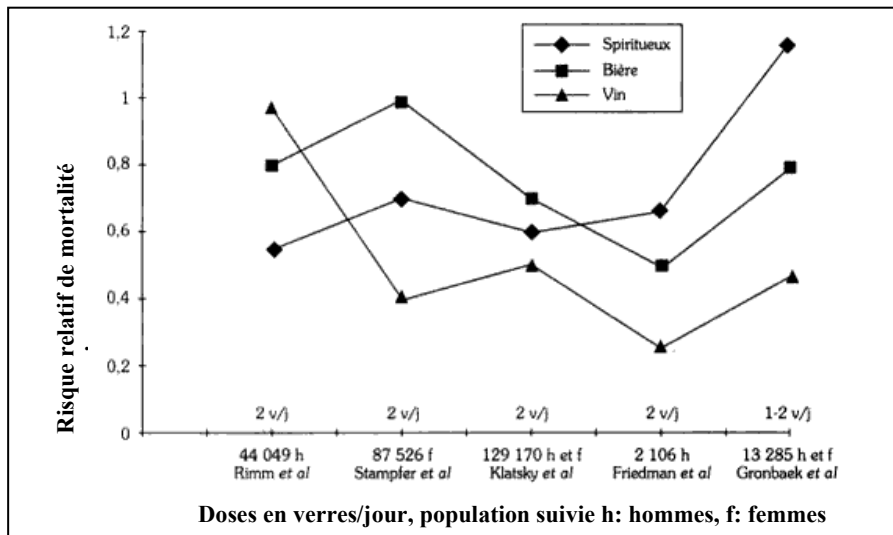


Figure 35: Alcool et risque de mortalité coronarienne (Ellison 1990).

a) Infarctus du myocarde et maladies coronaires

Rimm et collaborateurs ont mené une étude, la Health Professionals Follow-up Study (Rimm *et al.*, 1991) effectuée dans une population de professionnels de Santé (51529 hommes de 40 à 75 ans suivis pendant 10 ans). Les investigateurs ont constaté qu'une consommation d'alcool jusqu'à 50 g/j était reliée à une réduction des risques de maladies coronaires. L'étude fut poursuivie pendant encore 2 ans sur 38077 personnels de santé qui ne présentaient aucune maladie cardiovasculaire au départ de l'étude. Le but était d'étudier l'association entre le type d'alcool consommé et le risque d'infarctus du myocarde. Les résultats démontrèrent que la consommation de 3 à 4 verres d'alcool était inversement associée au risque d'infarctus du myocarde. Ni le type de boisson, ni la quantité d'alcool consommée au cours du repas altéraient cette association (Mukamal *et al.*, 2003). Une relation inverse entre alcool et maladies coronaires a été également observée chez les hommes de la Framingham Heart Study (Gordon et Kannel, 1983), de la Yugoslavia Cardiovascular Disease Study (Kosarevic *et al.*, 1982), de la Physician's Health Study (Camargo *et al.*, 1997b) et pour les hommes âgés entre 51 et 64 ans de l'Honolulu Heart Program (Goldberg *et al.*, 1995).

-Synthèse bibliographique-

On note des observations semblables chez les femmes de la Nurses' Health Study (Stampfer *et al.*, 2000). Cette étude a été réalisée sur 87526 infirmières âgées entre 34 à 59 ans et pour lesquelles la consommation d'alcool (bière, vin et liqueur) et les événements cardiovasculaires ont été enregistrés pendant 4 ans. Après ajustement des facteurs de risque, une nette réduction du risque d'infarctus du myocarde était observée chez les consommatrices de boissons alcoolisées comparées aux non-buveuses. Des résultats comparables ont été également obtenus sur les femmes de Framingham Heart Study (Gordon et Kannel, 1983).

En ce qui concerne les consommateurs de grandes quantités d'alcool, la majorité des études n'ont pas montré une augmentation de l'incidence des maladies coronaires pour cette catégorie de la population (Stampfer *et al.*, 1988; Goldberg *et al.*, 1994; Camargo *et al.*, 1997b; Wannamethee et Shaper, 1997 et 1999; Romelsjö *et al.*, 1999). Exceptions faites pour l'étude First Health and Nutrition Examination Survey (NHANES I) Epidemiologic Follow-up Study (Rehm *et al.*, 1997) où les consommatrices de 28 verres et plus par semaine avaient un risque plus élevé de maladies coronaires comparées aux non buveuses. Et pour les hommes, seul les gros consommateurs d'alcool de l'étude d'Honolulu avaient un risque plus élevé de maladies coronaires comparés aux consommateurs modérés d'alcool âgés entre 65 et 75 ans (Goldberg *et al.*, 1995).

Enfin, certaines études ne relèvent aucune relation entre consommation d'alcool et coronaropathies. C'est par exemple le cas pour les buveurs de la British Regional health Study (Wannamethee et Shaper, 1997 et 1999) et de la First Health and Nutrition Examination Survey Epidemiologic Follow-up Study (Rehm *et al.*, 1997).

b) Mortalité par maladies coronaires

Certaines études ont mis en évidence une relation entre la consommation d'alcool et la diminution du risque de mortalité coronarienne. En revanche, pour d'autres études, la consommation d'alcool ne semble pas reliée à une baisse du risque de mortalité coronarienne. Dans la Multiple Risk Factor Intervention Trial (The MRFIT research group, 1989), une relation inverse a été observée entre le nombre de verres d'alcool consommés par semaine et la mortalité coronaire, en précisant toutefois que les grands buveurs étaient exclus de l'analyse. Des résultats comparables ont été retrouvés pour les hommes de la Japanese Male Physicians (Kono *et al.*, 1986), de la Kaiser Permanente Study (Klatsky *et al.*, 1992), de la First Health and Nutrition Examination Survey Epidemiologic Follow-up Study (Rehm *et al.*, 1997), de la Physicians Health Study Enrollment Cohort (Gaziano *et al.*, 2000) et des buveurs de bière de la Copenhagen City Heart Study (Gronbaek *et al.*, 1995).

-Synthèse bibliographique-

Chez les femmes, une nette réduction du risque de mortalité coronarienne a été observée pour les consommatrices modérées de boissons alcoolisées (1,5 à 29 g alcool/jour) de la Nurses' Health Study (Fuchs *et al.*, 1995). Au delà de cette consommation, les risques de mortalité augmentaient surtout pour les cancers du sein et des cirrhoses. Également, l'étude de Busselton (Cullen, 1991) a mis en évidence que les femmes consommatrices d'alcool (quelle que soit la quantité), avaient une mortalité coronaire plus faible que les non-buveuses.

Beaucoup d'études ont montré que la relation entre consommation d'alcool et mortalité coronarienne était une courbe en L c'est-à-dire que la mortalité par maladie coronaire diminue avec la consommation d'alcool jusqu'à un plateau, sous-entendant que le risque de mortalité cardiaque n'est pas augmenté chez les lourds consommateurs d'alcool. Dans la région de Nancy, Renaud et collaborateurs (Renaud *et al.*, 1999) ont suivi 36250 hommes sans antécédent cardiovasculaire pendant 10 à 15 ans. Cette étude appelée l'Eastern France Study, a permis de montrer qu'une consommation quotidienne de vin ou de bière (22 à 54 g alcool/jour) était associée à un plus bas risque de mortalité cardiovasculaire.

Par ailleurs, de nombreuses études prospectives ont montré que la relation entre consommation d'alcool et mortalité coronarienne était une courbe en U signifiant que le risque de mortalité cardiaque augmente chez les non buveurs et les grands consommateurs d'alcool. Cette relation a été retrouvée dans une importante étude réalisée par l'American Cancer Society et publiée en 1990 (Bofetta *et al.*, 1990) où 276.802 hommes ont été suivis pendant 12 ans. Les sujets consommant 1 à 5 verres de boisson alcoolisée par jour avaient un risque de mortalité coronaire significativement plus bas que les non buveurs et les grands buveurs. Cette importante étude prospective a également fait l'objet d'une publication en 1997 où cette fois-ci 490000 hommes et femmes ont été suivis pendant 9 ans. Au cours de l'étude, 46000 décès ont été relevés et les auteurs ont relié les différentes causes de mort avec la consommation habituelle de boissons alcoolisées. Les auteurs ont montré que la consommation d'un verre d'alcool/jour était reliée à une baisse des risques de mortalité cardiovasculaire de 30% pour les hommes et 40% pour les femmes comparés à des non buveurs. En revanche, le risque de mortalité cardiovasculaire augmentait pour les grands buveurs (Thun *et al.*, 1997). Des observations similaires ont été obtenus dans l'étude de Copenhague où 6051 hommes et 7234 femmes ont été suivis pendant 12 ans (Gronbaek *et al.*, 1995 et 2000). Après évaluation initiale de la consommation de vin, bière et spiritueux, les consommateurs de vin présentaient une diminution des risques de mortalité totale et d'accidents ischémiques cardiaques selon un effet dose et ce, jusqu'à une quantité équivalente de 3 à 5 verres/jour. Quant aux autres types de boissons, ces risques n'étaient pas modifiés par la consommation de bière sauf pour les consommateurs de 3-5 verres de spiritueux /jour qui

-Synthèse bibliographique-

avaient un risque plus élevé de mortalité. Des résultats comparables ont été obtenus dans le Lipid Research Clinics Follow-up Study (Criqui *et al.*, 1987), chez les hommes médecins de la British Male Physicians (Doll *et al.*, 1994) et de la Physicians Health Study (Camargo *et al.*, 1997), chez les buveurs de spiritueux de la Copenhagen City Heart Study (Gronbaek *et al.*, 1995), chez les femmes de la Kaiser Permanente Study (Klatsky *et al.*, 1992) et de la Nurses' Health Study (Fuchs *et al.*, 1995).

Cependant rares sont les études qui ne montrent pas de relation négative entre la consommation d'alcool et les maladies coronaires. Après 10 ans de suivi sur 6439 hommes, la British Regional Heart Study n'a pas montré d'évidences convaincantes sur les bienfaits de doses modérées d'alcool. Les buveurs légers, les buveurs modérés d'alcool aussi bien que les buveurs de thé et les buveurs de grandes quantités d'alcool avaient un risque de mortalité coronarienne comparable (Wannamethee et Shaper, 1997). Après 24 ans de suivi sur 2106 hommes de 30 à 59 ans, la Framingham Heart Study a montré que les risques relatifs de mortalité coronarienne étaient (après ajustement des facteurs de risque) de 0,25 pour le vin ($p < 0,07$), de 0,49 pour la bière ($p < 0,15$) et de 0,66 pour les spiritueux ($p < 0,21$), donc des résultats non significatifs pour la bière et les spiritueux, et des résultats limites pour le vin (Friedman et Kimball, 1986). Enfin, une étude finnoise a été menée sur 4532 hommes âgés entre 40 et 64 ans. Après 5 ans de suivi, les non buveurs présentaient une mortalité coronarienne plus basse que les consommateurs d'alcool (Suhonen *et al.*, 1987).

c) Mort subite cardiaque

L'association entre alcool et risque d'événements coronaires peut être différemment étudiée, selon que l'on considère les infarctus du myocarde ou la mort subite cardiaque. Pour la Physicians Health Study, les hommes qui consommaient des quantités légères à modérées d'alcool (2 à 6 verres/jour) avaient un risque réduit de mort subite cardiaque comparés à ceux qui buvaient rarement ou jamais d'alcool (Albert *et al.*, 1999). En Finlande, la Social Insurance Institution's Mobile Clinic Health Survey (Suhonen *et al.*, 1987) menée sur 4532 hommes de 40 à 64 ans pendant 5 ans, a relevé que la survenue d'infarctus du myocarde était plus élevée chez les non buveurs que chez les consommateurs de plus de 200 g d'alcool par mois. En revanche, l'incidence des morts subites était plus faible chez les non buveurs ce qui tend à montrer que les gros buveurs ont un risque accru de mort subite. Également, les résultats de la British Régional Heart Study (Wannamethee et Shaper, 1992) ont révélé que les consommateurs importants d'alcool (plus de 6 verres/jour) présentant également une forte incidence à la mort subite.

Cependant, d'autres études n'ont pas reporté une telle association entre alcool et mort subite, c'est le cas de la Yugoslavia Cardiovascular Disease Study (Kosarevic *et al.*, 1982), de la Puerto Rico heart Health Program (Kittner *et al.*, 1983) et de la Framingham Heart Study (Gordon et Kannel, 1983).

d) Crise cardiaque

L'alcool est reconnu comme un facteur de risque pour les crises cardiaques depuis le XVII^{ème} siècle (Hillbom 1987). Toutefois, les données prospectives sont seulement disponibles depuis les années 70. L'augmentation de la consommation d'alcool est en effet reliée à une augmentation de l'incidence de toutes les crises cardiaques (mortelles et non mortelles) chez les hommes de Honolulu Heart Program (Donahue *et al.*, 1986), de la Swedish Conscripts Study (Romelsjö *et al.*, 1999) et les fumeurs de la Finnish Cancer Prevention Study (Leppälä *et al.*, 1999). La consommation d'alcool a aussi été associée à une augmentation de la mortalité par crise cardiaque chez les hommes de la Yugoslavia Cardiovascular Disease Study (Kosarevic *et al.*, 1980) et de la Japanese Male Physicians (Kono *et al.*, 1986).

D'un autre côté, des études ont remarqué que la relation alcool/crise cardiaque suit une courbe en L. La Cancer Prevention Study II a montré que les consommateurs de moins de 4 verres/jour ont un risque de mourir d'une crise cardiaque comparable aux non buveurs (Thun *et al.*, 1997). La Physicians Health Study rapporte qu'à partir d'un verre/jour, les participants avaient un risque réduit de faire une crise cardiaque comparé à ceux qui buvaient un verre/semaine (Berger *et al.*, 1999).

Cependant, quelques études ont suggéré une relation en J entre alcool et crise cardiaque, c'est-à-dire qu'une consommation légère d'alcool peut réduire le risque de crise cardiaque tandis que des hauts niveaux de consommation peuvent augmenter le risque. Le niveau d'alcool à partir duquel le risque de crise cardiaque augmente varie de 1 verre/jour pour la Physicians Health Study Enrollment Cohort (Gaziano *et al.*, 2000), à 4 verres/jour pour l'American Cancer Society Prospective Study (Bofetta *et al.*, 1990) et même jusqu'à 6 verres/jour pour la British Male Physicians (Doll *et al.*, 1994) et la British Regional Health Study (Wannamethee et Shaper, 1996).

En fait, la crise cardiaque existe sous différents sous-types et chaque sous-type présente une relation dose/effet distincte. C'est pour cela que le modèle épidémiologique de la crise cardiaque et de la consommation d'alcool est incertain. Certains décriront une relation inverse, d'autres observeront une courbe en J, en L voire même aucune relation entre l'alcool et la crise cardiaque.

e) Prévention secondaire

Un grand nombre d'études observent une relation inverse entre la consommation modérée d'alcool et le risque de morbi-mortalité cardiovasculaire. Toutefois, ces résultats sont contestés. Pour certains, ces observations sont le résultat d'un groupe de référence biaisé. Les non buveurs seraient représentés par des abstinents de toujours et des ex-buveurs (Shaper *et al.*, 1988; Shaper, 1990; Marmot et Brunner, 1991). Ces ex-buveurs pourraient alors être associés à une augmentation de la morbi-mortalité cardiovasculaire (Wannamethee et Shaper, 1988). Parmi ces ex-buveurs, il y a des «sick quitters», des individus devenus malades et qui ont décidé d'arrêter de boire de l'alcool. Inclure ces «sick quitters» dans la population de référence pourrait contribuer à une relation inverse entre la consommation d'alcool et la mortalité cardiovasculaire (Shaper, 1990). Cependant, aucune étude n'a pu vérifier cette théorie (Bofetta et Garfinkel, 1990; Klatsky *et al.*, 1990; Jackson *et al.*, 1991; Rimm *et al.*, 1991). Selon elles, inclure des «sick-quitters» dans le groupe de référence ne permettrait pas d'expliquer l'effet cardioprotecteur apparent d'une consommation modérée d'alcool.

Autre cause de biais: la catégorie des buveurs occasionnels. Dans beaucoup d'études, ces buveurs occasionnels sont classés dans une catégorie souvent mal définie car ces participants sont classés suivant des intervalles de fréquence de consommation (exemple: 0, 1, <3, 3-7 verres/jour ou semaine). Etant donné que cette consommation est difficile à estimer, cette catégorie de buveurs est souvent sous ou surclassée par rapport à son véritable mode de consommation. Ces buveurs occasionnels ont alors fait l'objet d'investigations. D'après ces études, ce mode de consommation est relié à un risque de maladies coronaires et est également associé à des facteurs de risques cardiovasculaires. Par exemple, la Kaiser permanente Study rapporte que les buveurs occasionnels et les abstinents ont un risque similaire d'être hospitalisés pour maladie coronaire (Klatsky *et al.* 1986). Une association inverse a été également relevée entre la consommation de moins de 1,5 g d'alcool/jour et l'incidence de maladies coronariennes chez les femmes de la Nurses' Health Study (Stampfer *et al.*, 1988). Dans la Physicians' Health Study, l'antigène activateur du plasminogène tissulaire étaient en concentration similaire pour les buveurs occasionnels et les abstinents (Ridker *et al.*, 1994). Les buveurs occasionnels constitue donc une catégorie à ne pas négliger et leur consommation devrait être classée dans un intervalle de consommation adapté pour éviter tout biais sur la classe des buveurs légers et réguliers, une catégorie à partir de laquelle l'alcool est reconnu exercer des effets cardioprotecteurs.

Toutes les données prospectives décrites au cours de cette section sont récapitulées dans le tableau 11 ci-après.

Etude		Méthodologie						Résultats (en nombre de cas)			
Nom	Référence	Echantillon	Effectif	Consommation d'alcool	Durée suivi (an)	Mortalité totale	Maladie coronaire	Mortalité coronaire	Crise cardiaque		
Framingham Heart Study	Gordon et Kannel, 1983	Hommes, femmes de Framingham, âge : 29-62 ans	4745 (survivants après la 2 ^{ème} visite de contrôle)	Hommes: 0; 1; 2-3; 4-7; 8-19 et ≥20 oz/ semaine. Femmes: 0; 1; 2-3; 4-9; et ≥10 oz/semaine.	24	1490		-400			
	Friedman et Kimball, 1986		4625 (survivants après 7 ^{ème} visite de contrôle)	Nombre oz/mois	22		809		288		
Honolulu Heart program	Goldberg <i>et al.</i> , 1995	Hommes japonais d'Hawaii et de Oahu, âge: ≥45 ans	7878	Abstinent; buveur léger (1-14 oz/mois); modéré (15-39 oz/mois) et lourd (≥40 oz/mois)	12				290		
	Donahue <i>et al.</i> , 1986		6069 (survivants après 3 ^{ème} visite de contrôle)	Abstinent; buveur léger (1-14 oz/mois); modéré (15-39 oz/mois) et fort (≥40 oz/mois)	15	819		132	70 (mortelle)		
Puerto Rico Heart Health program	Kittner <i>et al.</i> , 1983	Hommes de Puerto Rico, âge: 35-79 ans	9150	0; 1-14; 15-39; 40-79 et ≥80 g/jour	12	1383	164 (INM)	306			
Yugoslavia Cardiovascular Disease Study	Kosarevic <i>et al.</i> , 1982	Hommes de Bosnie et Croatie, âge : 35-62 ans	11121	≤1 fois/mois; >1 fois/mois et ≤1 fois/semaine; >1 fois/semaine et ≤1 fois/jour; >1 fois/jour	7		164 (INM)	95			
	Stampfer <i>et al.</i> , 1988	Infirmières de 11 pays, âge: 34-59 ans	87526	0; <1,5; 1,5-4,9; 5-14,9; 15-24,9 et ≥25 verres/jour	4		200		141		
	Fuchs <i>et al.</i> , 1995		85709	0; 0,1-1,4; 1,5-4,9; 5-14,9; 15-29,9 et ≥39 g/jour	12	2658		320			

Nom	Référence	Echantillon	Effectif	Consommation d'alcool	Durée suivi (an)	Mortalité totale	Maladie coronaire	Mortalité coronaire	Crise cardiaque
Finnish Cancer Prevention Study	Leppälä <i>et al.</i> , 1999	Fumeurs, âge : 50-69 ans	26556	Abstinent, buveur léger (≤ 24 g/jour); modéré (24,1-60 g/jour) et lourd (> 60 g/jour)	6				960
Physicians Health Study	Camargo <i>et al.</i> , 1997	Professionnels de santé masculin, âge: 40-84 ans	22071	< 1 ; 1; 2-4; 5-6; 7-13 et ≥ 14 verres/jour	11	1206		394 (MCV)	60 (mortelle)
	Albert <i>et al.</i> , 1999		21537	< 1 ; 1; 2-4; 5-6 verres/semaine, 1 verre/jour et ≥ 2 verres/jour	12			141 (MS)	
	Berger <i>et al.</i> , 1999		21870	< 1 ; 1; 2-4; 5-6 verres/semaine et ≥ 1 verre/jour	12				679
Physicians Health Study enrollment cohort	Gaziano <i>et al.</i> , 2000	Professionnels de santé masculin, âge: 40-84 ans	89299 (cohorte initial de la Physicians Health Study)	Abstinent; buveur occasionnel; 1-3 verres/mois; 1; 2-4; 5-6 verres/semaine; 1 verre/jour et ≥ 2 verres/jour	5	3216		514 (IM) 1450 (MCV)	150 (mortelle)
Health Professionals Follow-up Study	Rimm <i>et al.</i> , 1999	Professionnels de santé masculin, âge: 40-75 ans	44059	0; 0,1-2; 2-5; 5,1-10; 10,1-15; 15,1-30; 30,1-50 et ≥ 50 g/jour.	2		350		
American Cancer Society	Bofetta <i>et al.</i> , 1990	Hommes volontaires, âge: 40-59 ans	276802	0; occasionnel; 1; 2; 3; 4; 5; ≥ 6 verres/jour	12	42756		18771	2512 (mortelle)
Cancer Prevention Study II	Thun <i>et al.</i> , 1997	Hommes et femmes volontaires, âge: ≥ 30 ans	489626	0; < 1 verre/jour; 1 verre/jour; 2-3 verres/jour et ≥ 4 verres/jour	9	46325		10252	2379 (mortelle)
Kaiser Permanent Study	Klatsky <i>et al.</i> , 1992	Hommes, femmes	128934	Abstinent; ex-buveur; < 1 fois/mois; > 1 fois/mois à < 1 fois/jour; 1-2 fois/jour; 3-5 fois/jour ≥ 6 verres/jour	8	4503		940 1685 (MCV)	

Nom	Référence	Echantillon	Effectif	Consommation d'alcool	Durée suivi (an)	Mortalité totale	Maladie coronaire	Mortalité coronaire	Crise cardiaque
NHANES I Epidemiologic Follow-up Study	Rehm <i>et al.</i> , 1997	Echantillon repré-sentatif des EU, âge : 40-72 ans	6788	Abstinent; <2; 2-7; 8-14; 15-28, 29-42 et >42 verres/jour	15		1560	552	
Lipid Research Clinics Follow-up Study	Criqui <i>et al.</i> , 1987	Hommes, femmes, âge: ≥30 ans	7461	0; 1-9; 10-19; 20-29 et ≥30 ml/jour	9			91 178 (MCV)	
Post-évaluation de la MRFIT	Groupe de recherche MRFIT, 1998	Hommes à haut risque coronarien et survivants de la MRFIT	11688	0; 1-7; 8-14; 15-21 et ≥22 verres/semaine	4			190	
British Male Physicians	Doll <i>et al.</i> , 1994	Hommes médecins britanniques	12321	0; 1-7; 8-14; 15-21; 22-28; 29-42 et ≥43 unités/semaine	13	3328		1061	380 (mortelle)
Social Insurance Institution's Mobile Clinic Health Survey	Suhonen <i>et al.</i> , 87	Hommes finlandais, âge: 40-64 ans	4532	0; <200 g/mois et ≥200 g/mois	5	314		140 89 (MS)	
Swedish Conscripts Study	Romelsjö <i>et al.</i> , 1999	Militaires conscrits, âge: 17-21 ans	49618	0; 0, 1-14,9; 15-30 et >128 g/jour	25	1473	279 (INM)		
Copenhagen City Heart Study	Gronbaek <i>et al.</i> , 1995	Échantillon rando-misé, âge: 30-79 ans	13285	Abstinent; buveur mensuel; hebdomadaire; 1-2 verres/jour; 3-5 verres/jour	11	2229		1119 (MCV)	
Eastern France Study	Renaud <i>et al.</i> , 1999	Hommes, âge: 40-60 ans	34014	0; buveur occasionnel; 1-21; 22-32; 33-54; 55-76; 77-128 et >128 g/jour	13	2642		284 427 (MCV)	

Nom	Référence	Echantillon	Effectif	Consommation d'alcool	Durée suivi (an)	Mortalité totale	Maladie coronaire	Mortalité coronaire	Crise cardiaque
British Regional Health Study	Wannamethe et Shaper, 1999	Hommes de 24 villes britanniques, âge: 40-59 ans	7272	0; buveur occasionnel (<1 unité/semaine); léger (1-15 unités/semaine); modéré (16-42 unités/semaine) et lourd (≥6 unités/jour)	17	1308	901	445	
	Wannamethe et Shaper, 1996		7273	0; buveur occasionnel; festif: 1-2; 3-6 ou >6 verres/jour; buveur régulier: 1-2; 3-6 ou >6 verres/jour	14				216
	Wannamethe et Shaper, 1997	Survivants 5 ans après le recrutement	6439	Buveur de thé; ex-buveur; buveur occasionnel (<1 verre/semaine); léger (1-15 verres/semaine); modéré (16-42 verres/semaine); lourd (>42 unités/semaine)	10	929	490	472 (MCV)	
Lyon Heart Study	de Loregril et al., 2002	Survivants à un IM	437	Consommation d'éthanol (% apport énergétique total) quartile 1 : 0 quartile 2 : <5,41 quartile 3 : <9,84 quartile 4 : ≥ 9,84	4	Risque de complications cardiovasculaires (vs non buveurs) → 59% pour le quartile 3 (2 verres/jour) → 52% pour le quartile 4 (4 verres/jour)			
Japanese male physicians	Kono et al., 1986	Hommes médecins japonais	5135	abstinent; buveur occasionnel; <54 ml/jour et ≥54 ml/jour	19	1283	184	525 (MCV)	230
Physicians Health Study	Muntwyler et al., 1998	Survivants à un IM	5358	0 ou occasionnel 1-4 verres/mois 2-6 verres/semaines 1 verre/jour >2 verres/jour	5	Risque de mortalité totale (vs buveurs occasionnels et non buveurs) → 15% pour les buveurs de 1-4 verres/mois → 28% pour les buveurs de 2-6 verres/semaine → 21% pour les buveurs de 1 verre/jour → 16% pour les buveurs ≥ 2 verres/semaine			

Tableau 11: Consommation d'alcool et risque de maladies cardiovasculaires.

INM= infarctus du myocarde non mortel, IM= infarctus du myocarde; MCV = maladies cardiovasculaires, MS= mort subite.
1oz d'alcool = 28,3 g d'alcool.

5.4. Cardioprotection par l'éthanol. Type et dose d'alcool à consommer

La relation entre alcool et cardiopathies ischémiques est-elle différente pour les différents types de boissons alcoolisées?



Cette question a fait l'objet d'un grand nombre de publications. Beaucoup sont en accord pour dire que la consommation modérée de boissons alcoolisées est bénéfique pour le cœur. Étant donné que l'éthanol est la molécule commune à toutes ces boissons, il est probable que ce nutriment soit à l'origine des effets cardioprotecteurs de ces boissons. Par ailleurs, le vin pourrait exercer un effet cardioprotecteur supérieur aux autres boissons alcoolisées grâce à la présence de substances non alcooliques, comme les antioxydants.

Néanmoins, certaines études comparatives n'ont pas réussi à démontrer une association inverse entre le type d'alcool consommé et le risque cardiovasculaire. On ne peut cependant pas en tirer de conclusions formelles. En effet, beaucoup de sujets consomment plusieurs types de boissons alcoolisées et la définition de buveur spécifique d'une seule boisson peut varier d'une étude à l'autre (Rimm *et al.*, 1996). D'autre part, la façon de consommer ces boissons (pendant ou en dehors des repas) varie beaucoup d'un pays à l'autre et ceci pourrait expliquer des divergences selon les études.

Dans la majorité des études épidémiologiques, un risque réduit de mortalité cardiovasculaire a été observé chez les consommateurs modérés de boissons alcoolisées (5 à 30 g d'éthanol par jour) par rapport aux abstinents (Rimm *et al.*, 1999). Les effets favorables apparaissent dès la consommation de faibles quantités d'alcool (quelques verres par semaine). Cependant le vin semble exercer un facteur préventif supérieur aux autres boissons alcoolisées. Une consommation quotidienne de 2 à 4 verres de vin (25 à 50 cl) pour les hommes et de 1 à 2 verres de vin (12,5 à 25 cl) pour les femmes semble jouer un rôle préventif contre les maladies cardiaques (Coate, 1993; Rimm *et al.*, 1999; Gronbaek *et al.*, 2000). L'effet cardioprotecteur du vin a donc été constaté pour des consommations pouvant être considérées comme faibles à modérées. Pour ce qui est de l'effet de fortes doses d'alcool (plus de 40 g/j d'alcool), l'effet préventif du vin s'atténue au delà d'une certaine dose, on a peut même observer une augmentation du risque de cardiopathies ischémiques pour des apports quotidiens supérieurs à 8 à 10 verres soit environ 1 litre de vin (Friedman et Kimball, 1986).

VI. Autres nutriments protecteurs: les acides gras oméga 3

De nombreuses études épidémiologiques et cliniques ont démontré les bienfaits des AGPI n-3 dans la prévention et le traitement des maladies cardiovasculaires. Les études expérimentales ont quant à elles tentées de déterminer les mécanismes cardioprotecteurs des AGPI n-3.

Cette présente section se propose donc de retracer l'histoire de la recherche sur les AGPI n-3, d'expliquer l'importance de ces nutriments pour notre santé cardiovasculaire, de récapituler les différents travaux menés chez l'homme et l'animal afin de mieux comprendre pourquoi les AGPI n-3 sont-ils si bénéfiques dans la prévention et le traitement des maladies cardiovasculaires.

6.1. Intérêts pour les acides gras oméga 3. Depuis plus de 60 ans déjà !

De nos jours, il est largement reconnu que la consommation de poissons gras et de capsules d'huile de poissons riches en AGPI-TLC n-3 diminuent le risque de maladies cardiovasculaires et protègent contre la mort subite (Albert *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2002; Marchioli *et al.*, 2002). Cependant, cet intérêt pour les AGPI n-3 n'est pas nouveau. Dès les années 40, le physiologiste britannique Hugh Sinclair fut le premier à proposer le potentiel cardioprotecteur des acides gras d'origine marine. Au cours d'étude écologique sur les Eskimos, Sinclair nota que cette population ne présentait aucune trace de sénilité et de tendance au saignement et suggéra qu'une possible déficience en ces acides gras pouvait expliquer l'augmentation des maladies occidentales telles que les maladies cardiovasculaires (Sinclair, 1956).



I've got something to tell you, Dad - I don't like fish...I mean I REALLY don't like fish..I HATE fish, Dad - there, I've said it now

-Synthèse bibliographique-

Plus tard, des études écologiques (Bjerregaard *et al.*, 1988 et 1997; Dyerberg 1994) ont été menées sur les Eskimos du Groenland et toutes ont observé que cette population présentait une faible mortalité cardiovasculaire malgré un régime alimentaire riche en graisses (environ 40% de leurs apports énergétiques totaux). Ce phénomène fut alors baptisé «Eskimos paradox» (Dyerberg, 1988). La population Inuite fit également l'objet d'une série d'études épidémiologiques dans les années 70. Parmi elles, une étude danoise révéla que cette population présentait une faible incidence de maladies cardiovasculaires malgré une forte consommation de poissons et de mammifères marins (phoques, morses, baleines) riches en AGPI-TLC n-3 (Dyerberg *et al.*, 1975, Bang *et al.*, 1980). Les investigateurs remarquaient que les Inuits consommaient peu de graisses saturées (9% de la ration énergétique totale) mais davantage d'AGPI n-3 (4,2% de la ration énergétique totale). Leurs apports en AGPI n-3 étaient majoritairement représentés par l'EPA et le DHA, deux AGPI exclusivement présents dans le monde marin. En fait, ces habitudes alimentaires étaient très éloignées des habitudes occidentales et notamment du Danemark, pays d'origine des investigateurs. A titre d'exemple, la diète danoise apporte environ 42% de lipides, avec pas moins de 22% des calories totales représentées par les graisses saturées et seulement moins de 1% par les AGPI n-3 (Dyerberg *et al.*, 1975, Bang *et al.*, 1980; Kromhout, 1989). Par la suite, des études écologiques ont été réalisées sur des populations côtières du Japon et de l'Alaska et ont abouti aux mêmes conclusions, à savoir que la consommation de poissons riches en AGPI n-3 est inversement associée à la fréquence de maladies cardiovasculaires (Hirai *et al.*, 1989; Newmann *et al.*, 1993; Parkinson *et al.*, 1994; Dewailly *et al.*, 2001). Et c'est ainsi que la recherche sur les AGPI n-3 a débuté!

6.2. Pourquoi les acides gras oméga 3 sont-ils si importants physiologiquement ?

Composants tissulaires

Les AGPI n-3 sont des composants majeurs des phospholipides membranaires, ils jouent un rôle non négligeable sur la fluidité membranaire et le transport ionique. On les retrouve en abondance dans les membranes cellulaires du myocarde, du cerveau et de la rétine (Connor, 2000) où ils sont indispensables pour le bon fonctionnement de ces tissus. Il est donc peu surprenant que les AGPI n-3 soient impliqués dans la prévention ou la guérison de nombreuses pathologies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires, la maladie de Crohn, le cancer du côlon, l'arthrose rhumatoïde (Simopoulos, 1991 et 1999, Connor, 2000).

Les acides gras essentiels, précurseurs des AGPI-TLC

Le LA est l'AGPI n-6 prédominant dans notre organisme. Il peut-être allongé et désaturé en AGPI-TLC n-6. Quant à l'ALA, cet AGPI n-3 peut-être allongé et désaturé en AGPI-TLC n-3. Le LA et l'ALA sont des acides gras essentiels (voir section II). Les AGPI n-3 et n-6 ne sont pas interconvertibles et sont des constituants importants pour la majorité des cellules.

Synthèse des eicosanoïdes

Les AGPI n-3 et AGPI n-6 à 20 carbones, EPA et AA sont respectivement les précurseurs des eicosanoïdes (prostaglandines, leucotriènes) (figure 36). Par exemple, les dérivés eicosanoïdes de l'AA ont une action pro-inflammatoire, pro-agrégante tandis que ceux dérivés de l'EPA inhibent l'aggrégation plaquettaire et sont anti-inflammatoires (Simopoulos, 1991 et 1999).

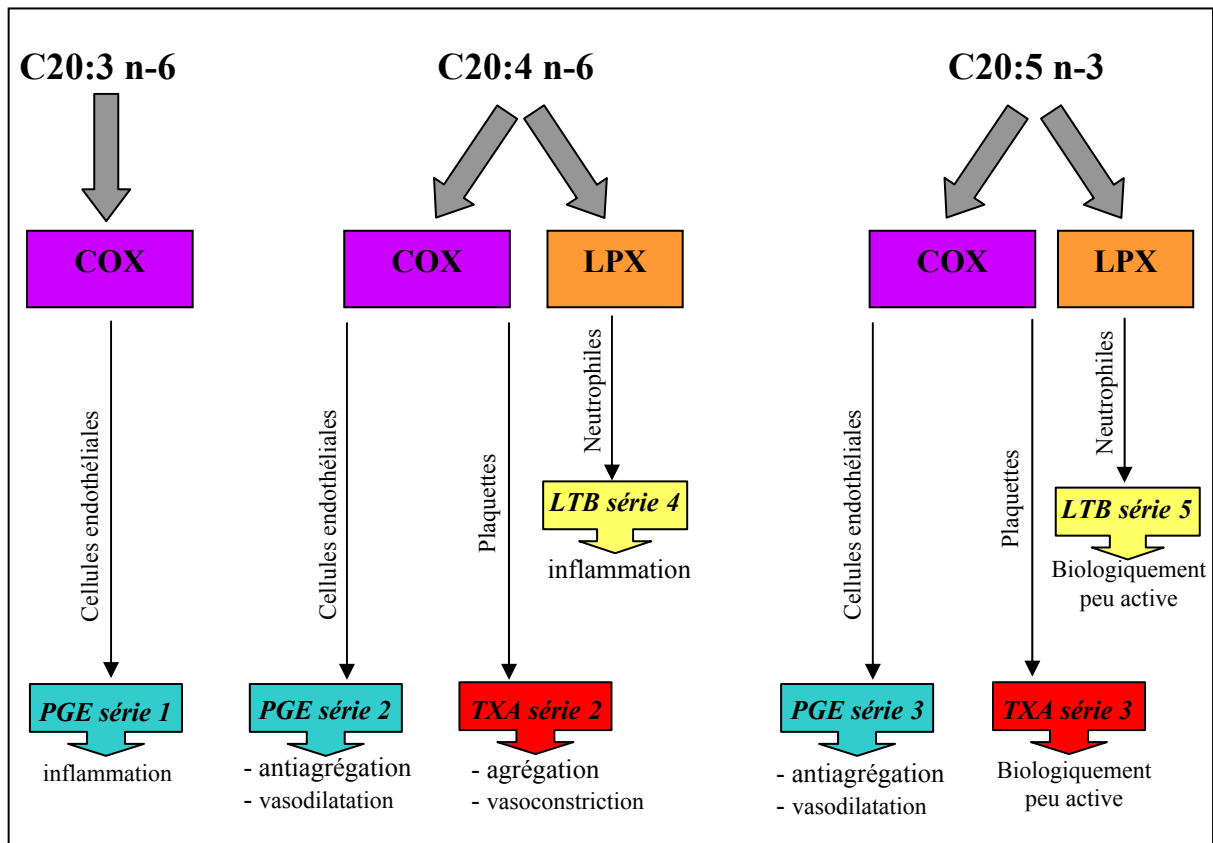


Figure 36 : Synthèse des eicosanoïdes.

COX : cyclooxygénase; LPX : lypoxigénase; LTB: leucotriène; PGE : prostaglandine ; TXA : thromboxane.

6.3. Apports alimentaires en acides gras oméga 3

La consommation d'AGPI n-3 est primordial pour de nombreux processus métaboliques. Les AGPI n-3 d'origine alimentaire sont notamment les précurseurs des AGPI-TLC, des

-Synthèse bibliographique-

eicosanoïdes. En conséquence, ces synthèses seront plus ou moins perturbées suivant nos apports en AGPI n-3.

Importance des apports alimentaires en LA et ALA

Le rapport LA/ALA permet de rendre compte du rôle important de nos apports alimentaires en LA et ALA car sa valeur peut être critique pour la survenue de maladies cardiovasculaires. En raison de voies métaboliques similaires, les AGPI n-6 et AGPI n-3 se retrouvent en compétition. Premier site de compétition : la synthèse des AGPI-TLC à partir des deux acides gras essentiels LA et ALA. Un rapport LA/ALA inférieur à 4 (Renaud, 1990) est en effet reconnu optimal pour obtenir des bénéfices cardiovasculaires et permettre une conversion adéquate de l'ALA en AGPI-TLC n-3 (Indu *et al.*, 1992). Second site de compétition : la synthèse des eicosanoïdes à partir de l'AA et de l'EPA (de Lorgeril et Salen, 2002). Un haut ratio LA/ALA tend à accentuer le déficit en AGPI-TLC n-3 (Connor, 1999) et donc à stimuler la synthèse des eicosanoïdes anti-aggrégants et anti-inflammatoires. A l'inverse, un faible ratio LA/ALA augmente la conversion endogène de l'ALA en AGPI-TLC n-3 et donc stimule la production des eicosanoïdes anti-agrégants et anti-inflammatoires.

L'utilisation d'indicateurs biologiques comme le profil en acides gras du plasma ou des globules rouges permet d'apprécier les apports alimentaires en AGPI n-3 et le métabolisme de ces derniers. Excepté une anomalie métabolique, une augmentation des apports alimentaires en AGPI n-3 (par exemple en consommant davantage de poissons) est toujours suivie d'une élévation des teneurs en EPA et DHA dans le sang et les membranes cellulaires (Holub, 1989; McLennan, 2001; Christensen *et al.*, 1999). En particulier, les membranes des cardiomyocytes sont très sensibles aux variations des apports alimentaires en acides gras. On observe très souvent un enrichissement en AGPI n-3 des membranes des cardiomyocytes après une supplémentation en huile de poissons (Nair *et al.*, 1997 et 1999; McLennan, 2001). A noter qu'une supplémentation en ALA peut augmenter les niveaux d'EPA dans le sang et les cellules sanguines. Toutefois, un enrichissement tissulaire en AGPI-TLC sera davantage efficace après une augmentation des apports alimentaires en AGPI-TLC n-3 plutôt qu'après une augmentation des apports alimentaires en ALA. En utilisant des isotopes stables, des études cliniques ont en effet démontré que la conversion de l'ALA en EPA était lente et limitée voire même que la conversion de l'ALA en DHA était marginale même si les sujets avaient des apports corrects en AGPI n-3 (rapport n-6/n-3 satisfaisant) (Sanderson *et al.*, 2002; Brenna, 2002).

Apports recommandés en AGPI n-3

Depuis longtemps, les occidentaux utilisent des huiles végétales riches en LA (huile de tournesol, huile de maïs, huile de soja, huile de carthame) pour cuisiner. C'est une habitude alimentaire caractéristique de la «Western diet» qui fournit malheureusement des apports massifs en AGPI n-6 mais minuscules en AGPI n-3. Il n'est alors pas étonnant de retrouver des rapports sanguins LA/ALA équivalents à 100:1 dans la population occidentale. Normalement, ce rapport devrait être de 4 pour 1 (Simopoulos, 1991 et 1999) de telle sorte que la synthèse des AGPI-TLC n-3 puisse être assurée et permettre une synthèse efficace d'eicosanoïdes anti-aggrégants et anti-inflammatoires. Pour obtenir de tels effets, les apports alimentaires recommandés en ALA devraient être de 2g/jour soit 0,6 à 1% de l'énergie totale. Cette dose en ALA peut-être facilement obtenue en consommant de l'huile de lin, de l'huile de colza, des noix, de la mâche et des herbes sauvages comme le pourpier (Simopoulos, 1991 et 1999, Connor, 1999; Kris-Etherton *et al.*, 2000) (figure 37).



Figure 37 : Exemples de sources alimentaires en acides gras oméga 3.

Les poissons gras (maquereau, hareng, sardine, truite...) et les compléments nutritionnels à base d'huile de poissons sont les principales sources en AGPI-TLC n-3 de notre régime alimentaire (figure 37). Consommer 2,5 à 3 fois de poisson/semaine équivaut à des apports de

500 mg d'EPA et DHA/jour. Cependant, la consommation occidentale de poisson est d'environ 1 fois/semaine ce qui équivaut à seulement 150 mg d'EPA et de DHA/jour (source: British Nutrition Foundation, 2002).

6.4. Acides gras oméga 3 et cardioprotection

Depuis une trentaine d'années, la thématique cœur et AGPI n-3 a été le sujet de nombreuses études épidémiologiques, cliniques et expérimentales. Pour la majorité de ces travaux, la consommation d'AGPI n-3 d'origine végétale (ALA) et la consommation d'AGPI-TLC n-3 d'origine marine (EPA et DHA essentiellement) est associée à une réduction du risque de maladies cardiovasculaires. Cette présente section se propose donc de faire le point sur les différentes études épidémiologiques et d'intervention en décrivant successivement les effets des AGPI-TLC n-3 puis les effets de l'ALA.

6.4.1. Effets des acides gras oméga 3 d'origine marine

6.4.1.1. Etudes épidémiologiques

Après les études écologiques menées chez les eskimos et les japonais, se sont succédées de nombreuses études d'observation. Dans la Zutphen Study, une des plus importantes études de cohorte, les hommes qui consommaient au minimum 30 g de poisson/jour avaient des risques de mortalité coronaire divisé par deux comparés aux individus qui ne mangeaient jamais de poisson (Kromhout *et al.*, 1985). De manière comparable, la Chicago Western Electric Study, une étude de suivi de cohorte sur 30 ans, a montré que les hommes consommant au moins 35 g de poisson/jour avaient un risque beaucoup plus bas de mourir d'une maladie coronaire (-38%) et d'un infarctus du myocarde (-67%) comparés aux hommes ne mangeant pas de poisson (Daviglus *et al.*, 1997). Après 20 ans de suivi, la Seven Countries Study a également montré que la consommation d'au moins 30g de poisson/jour permettait de réduire de 50% le risque de mortalité coronaire (Sandker *et al.*, 1993). Aux USA, la Multiple Risk Factor Intervention Trial (MFRIT) a aussi observé que la consommation régulière d'AGPI-TLC n-3 (<665 mg/jour pendant 10,5 ans) était associée à une réduction des maladies coronaires et de la mortalité totale (Dolecek *et al.*, 1992).

Autre étude prospective, l'US Physicians Health Study réalisée sur une cohorte de 20551 médecins américains, âgés entre 40 et 85 ans et sains de toutes maladies cardiovasculaires (Albert *et al.*, 1998). Après 11 ans de suivi, cette étude a montré qu'une consommation hebdomadaire de poisson, comparée à une consommation mensuelle de poisson, était reliée à une réduction du risque de mort subite (-50%) et de mortalité totale (-50%). Cependant, cette

-Synthèse bibliographique-

étude n'avait pas révélé d'association entre la consommation de poisson (ou d'AGPI n-3) et la réduction du risque d'infarctus, mort cardiaque non subite et mortalité cardiovasculaire totale (Morris *et al.*, 1995). Cette étude a été poursuivie pendant 6 années supplémentaires sous forme d'étude cas-contrôle (94 hommes touchés par une mort subite cardiaque versus 184 témoins) et a révélé une relation inverse entre le taux sanguin d'AGPI n-3 et le risque de mort subite (Albert *et al.*, 2002). Plus exactement, le quartile de participants avec le plus haut taux sanguin en AGPI n-3 avaient 81% de risque en moins de faire une mort subite cardiaque. L'ensemble des résultats de l'US Physicians Health Study suggère donc que c'est à travers les AGPI n-3 que la consommation poisson induit des effets cardioprotecteurs. Cette étude met également en évidence qu'une consommation hebdomadaire de poisson est une consommation seuil au delà de laquelle on n'observe plus de bénéfice cardiovasculaire supplémentaire.

Une autre étude cas-contrôle a été réalisée à Seattle sur 334 sujets victimes d'un premier arrêt cardiaque et 493 contrôles. L'étude a conclu qu'un apport diététique en AGPI-TLC n-3 (5,5g AGPI n-3/mois, équivalent à 2 portions de poisson/semaine) est associé à une réduction de 50% du risque de premier arrêt cardiaque comparé à une alimentation dépourvue d'AGPI-TLC n-3 (Siscovick *et al.*, 1995). Par ailleurs, les AGPI n-3 représentent environ 3,3% des acides gras totaux des globules rouges. Suite à une consommation régulière en AGPI n-3, la teneur en AGPI-TLC n-3 s'élevait jusqu'à 5% et était alors associée à une baisse de 70% du risque de premier arrêt cardiaque (Siscovick *et al.*, 2000). Les auteurs ont observé une relation dose/effet entre la consommation de poissons, la teneur en AGPI-TLC n-3 des membranes érythrocytaires et le risque d'arrêt cardiaque.

Chez les femmes, une importante étude prospective, la Nurses' Health Study (Hu *et al.*, 2000) a été menée récemment chez 84688 professionnelles de santé âgées entre 34 et 59 ans. Après 16 ans de suivi, les travaux ont montré que les femmes qui mangeaient rarement du poisson (moins d'une fois/mois) avaient un risque 21%, 29%, 31% et 34% plus élevé de décéder d'une maladie coronaire que les femmes consommant du poisson de 1 à 3 fois/mois, 1 fois/semaine, 2 à 4 fois/semaine et au-delà de 5 fois/semaine. Cette étude mis également en évidence que les AGPI-TLC n-3 réduisaient le risque de crise cardiaque de manière dose dépendante. Ainsi, une consommation de poisson variant entre 1-3 fois/semaine à plus de 5 fois/semaine permettaient de réduire le risque de crise cardiaque de 7 à 52%. En tenant compte de divers facteurs d'ajustement (âge, tabac, prise d'aspirine, ménopause, etc...), les auteurs ont alors conclu que plus les femmes consommaient d'AGPI n-3, plus le risque de morbi-mortalité coronarienne diminuait.

-Synthèse bibliographique-

Cependant, certaines études ne remarquent pas de bénéfices cardiaques significatifs avec une consommation fréquente de poisson. Dans l'US Health Professionals Follow-up Study, une étude de suivi menée pendant 6 ans sur 44895 professionnels de santé américains âgés entre 40 et 75 ans, n'a pas montré d'association entre la consommation d'AGPI-TLC n-3 ou la consommation de poisson et le risque de maladies coronaires (Ascherio *et al.*, 1995). Egalement, l'étude EURAMIC (European multicenter cas-control study on Antioxidants, Myocardial Infarction and breast Cancer) n'a pas trouvé de relation inverse entre le contenu en DHA du tissu adipeux et le risque d'infarctus du myocarde (Marckmann *et al.*, 1999).

Comment expliquer les résultats contradictoires de ces études prospectives ? Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces différences et notamment la définition du groupe de référence. Certaines études de cohortes sont réalisées sur des populations initialement consommatrices de grandes quantités de poissons. En conséquence, le groupe de référence présente déjà une protection maximale. De ce fait, lorsque le groupe expérimental reçoit un supplément en AGPI n-3, la dose additionnelle en AGPI n-3 n'est alors pas accompagnée de bénéfice cardiaque observable car le seuil maximal de protection est déjà atteint. En conséquence, l'ensemble de la cohorte est donc protégé contre les risques de maladies cardiovasculaires et donc aucune nuance est observable. Pour étudier les effets de l'augmentation de la consommation de poisson sur la prévention des risques cardiovasculaires, Marckmann et Gronbaek ont suggéré qu'il était préférable de choisir une cohorte à haut risque plutôt qu'une population à bas risque (Marckmann et Gronbaek, 1999).

Le choix du poisson à consommer n'est également pas sans importance pour le résultat d'une étude. Certains poissons se nourrissent de plancton parfois contaminé par des métaux lourds (mercure, plomb) et la chair de ces poissons se retrouve alors polluée. Malheureusement, ces métaux lourds sont lents et difficiles à éliminer. En conséquence, si le consommateur mange ce type de poisson, l'ingestion du métal lourd est alors inévitable et on peut alors craindre à un défaut de bénéfice de la part des AGPI n-3 (de Lorgeril et Salen, 2002).

Enfin, d'autres biais peuvent expliquer ces résultats contradictoires, on peut encore citer : les critères choisis pour établir un cas de mort subite, la méthodologie utilisée pour évaluer le poisson consommé....

6.4.1.2. Etudes d'intervention

L'étude Diet And Reinfarction Trial (DART) est une étude de prévention secondaire menée pendant 2 ans sur 2003 hommes gallois récemment victimes d'un infarctus du myocarde et randomisés pour consommer au moins 2 portions de poisson/semaine (200-400 g/semaine) ou

-Synthèse bibliographique-

prendre 3 capsules d'huile de poissons/jour (soit 900 mg d'EPA et DHA /jour) si le patient n'aimait ou ne pouvait pas consommer de poisson. Dès le 4^{ème} mois de ce régime et jusqu'à la fin des 2 années de suivi, le groupe poisson avait une mortalité coronarienne et une mortalité totale réduites de 29% comparé au groupe témoin (Burr *et al.*, 1989 et 1994). Etant donné que les AGPI-TLC n-3 diminuaient rapidement les risques de mort subite, les auteurs ont supposé que les AGPI n-3 pourraient protéger le myocarde contre les risques ischémiques par une action anti-arythmique plutôt qu'anti-thrombique ou anti-artériosclérotique (Burr *et al.*, 1989). Autre étude importante, la Prevenzione Trial (Gruppo Italiano per lo Studio Della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico, 1999), menée sur 11324 patients victimes d'un infarctus au cours des 3 derniers mois. Pendant 3,5 ans, les patients ont été randomisés pour suivre un régime de type méditerranéen enrichi en AGPI-TLC n-3 (1 gélule d'huile de poissons/jour contenant 1 g d'AGPI dont 600 mg d'éthyl ester d'EPA et 300 mg de DHA) ou un régime enrichi en vitamine E (1 gélule de 300 mg d' α -tocophérol) ou en AGPI n-3 et en vitamine E ou aucune supplémentation. Alors que la prise chronique de vitamine E n'a entraîné aucun bénéfice cardiovasculaire significatif, une supplémentation en AGPI-TLC n-3 a été associée à une baisse de 15% du risque global de : mortalité cardiovasculaire, d'infarctus non mortel et de crise cardiaque non mortelle. Considérés séparément, les risques de mortalité totale et de mort subite ont été aussi réduits respectivement de 30% et 45%. Résultats encore plus incroyables si l'on précise que les patients non supplémentés continuaient à prendre leurs traitements préventifs (aspirine, β -bloquants, inhibiteurs des enzymes convertisseurs d'angiotensine, statines). Les AGPI n-3 sont donc des agents véritablement très puissants pour la prévention secondaire des maladies coronaires.

Bien que simples nutriments, les AGPI-TLC n-3 sont donc des agents beaucoup plus efficaces que certains médicaments (hypolémiant, hypocholestérolémiant, hypotenseurs, β -bloquants) prescrits dans le cadre de la prévention secondaire. En outre, les AGPI-TLC n-3 sont moins coûteux que toutes ces drogues et de plus, dénués de tout effets secondaires.

A titre d'exemple, l'étude d'intervention, Scandinavian Simvastatine Survival Study (Scandinavian Simvastatine Survival Study investigators, 1994) montre que les statines permettent de sauver 1 vie sur 28,8 en 5,4 ans. En contraste, 2 portions de poisson/semaine permettent de sauver 1 vie sur 28 en 2 ans dans l'étude DART (Burr *et al.*, 1989). Les statines sont donc 2,6 moins efficaces que les 2 portions hebdomadaires de poisson.

D'autres exemples ? L'étude CARE ou Cholesterol And recurrent Events (Sacks *et al.*, 1996) a révélé que la pravastatine ne permet de sauver qu'1 vie sur 7,4 en 5 ans! soit 10 fois moins efficace que la consommation d'AGPI-TLC n-3. Dans le cadre de l'étude de prévention secondaire de la GISSI Prevenzione Trial, c'est 5,7 vies sur 1000/an qui étaient sauvées et ce,

grâce à la prise quotidienne d'huile de poissons/jour (GISSI-Prevenzione investigators, 1999). Une nouvelle analyse des données de la GISSI Prevenzione Trial (Marchioli *et al.*, 2002) a montré que la courbe de survie des patients supplémentés en AGPI-TLC n-3 commençait à diverger très tôt après la randomisation. En effet, le risque de mortalité totale diminuait de 41% dès le 3^{ème} mois. Cette survie totale était principalement due à une réduction du risque de mort subite cardiaque dès le 4^{ème} mois. Comme pour DART, les investigateurs de la GISSI Prevenzione Trial ont proposé qu'un effet anti-arythmique des AGPI-TLC n-3 pourrait-être à l'origine des effets précoces des AGPI n-3 sur la mortalité totale et la mort subite cardiaque.

6.4.2. Effets de l'acide gras oméga 3 d'origine végétale, l'acide linoléique

6.4.2.1. Etudes épidémiologiques

De nombreuses études épidémiologiques, cliniques et expérimentales rapportent les bénéfices cardiovasculaires induits par la consommation de poisson ou de capsules d'huile de poissons riches en AGPI-TLC n-3. En revanche, moins d'études se sont intéressées aux bienfaits cardiaques de l'ALA. Cependant, cet AGPI n-3 mérite qu'on lui apporte une attention particulière. En effet, l'alternative ALA n'est pas négliger pour les personnes qui ne peuvent pas ou ne veulent pas manger de poisson ou d'autres produits marins riches en AGPI-TLC n-3. En respectant certaines règles diététiques notamment l'équilibre entre AGPI n-6 et AGPI n-3, consommer de l'ALA permet ainsi d'éviter une carence en AGPI-TLC n-3 (voir section §6.3).

De nombreuses études de cohortes ont rapporté une relation inverse entre l'ALA (mesuré dans l'alimentation, le plasma ou le tissu adipeux) et le risque de maladies coronaires. L'étude MRFIT a suivi 6250 hommes pendant 10,5 ans et a démontré que la consommation d'ALA est inversement associée à la mortalité coronaire, aux maladies cardiovasculaires et à toutes les causes de mortalité (Dolecek *et al.*, 1992). Dans le cas de la Health Professional's Study, la consommation d'ALA de chaque participant a été évaluée par questionnaire et après 2 ans, l'étude a montré que les hommes ayant des apports en ALA équivalents à 1,4-1,5 g/jour, avaient 59% de risque en moins de faire un infarctus (Ascherio *et al.*, 1996). En ce qui concerne les femmes de la Nurses's Health Study, la consommation d'ALA des 76283 participantes a été également évaluée par questionnaire. Après 10 ans, l'étude a mis en évidence que la mortalité coronaire diminuait de 0%, 1%, 10%, 33% et 45% chez les femmes qui avaient des apports en ALA respectivement compris entre 0-0,71g, 0,72-0,86g, 0,87-0,97g, 0,98-1,11g, 1,12-1,35g et supérieurs à 1,36g. Les investigateurs ont alors relevé une relation dose/effet entre l'ALA et le risque de cardiopathies ischémiques mortelles (Hu *et al.*,

1999). En revanche, certaines études comme la Zutphen Elderly Study (Oomen *et al.*, 2001) n'ont montré aucun effet bénéfique de l'ALA sur l'incidence de maladies coronaires.

6.4.2.2. Etudes d'intervention

La Lyon Diet Heart Study est la premier essai clinique de prévention secondaire sur l'ALA. Cette étude française a eu pour but de tester si une diète méditerranéenne enrichie en ALA pouvait améliorer le pronostic des survivants à un premier infarctus du myocarde (204 contrôles versus 219 sujets expérimentaux, âge moyen 53 ans). Durant cette étude, un traitement pharmacologique traditionnel de prévention secondaire était prescrit aux patients du groupe contrôle tandis que le groupe expérimental suivait un régime méditerranéen enrichie en ALA (consommation d'huile de colza et de margarine à base d'huile de colza) de telle sorte d'obtenir un apport en ALA équivalent à 1,8 g/jour et d'atteindre un rapport LA/ALA égal à 4:1 (vs 0,7 g d'ALA/jour et un rapport LA/ALA égal à 10:1 pour le groupe contrôle). Très vite, les investigateurs ont relevé que le profil en acides gras circulants du plasma et des membranes cellulaires étaient significativement remodelés dans le groupe expérimental (de Lorgeril *et al.*, 1998). Dès les deux premiers mois de randomisation, la concentration plasmatique en ALA était inversement associée avec le risque de récurrence de maladies coronaires et en particulier avec des récurrences mortelles incluant le risque de mort subite (de Lorgeril *et al.*, 1999). A la suite des 46 mois de suivi, les investigateurs ont observé une réduction spectaculaire de 50 à 70% du risque de récurrence d'infarctus (mortel et non mortel) après un régime méditerranéen enrichi en ALA (de Lorgeril *et al.*, 1999).

Une autre étude randomisée, l'Indian Diet Heart Study a été menée sur 505 victimes d'un infarctus datant de moins de 48 h). Les patients ont été randomisés pour suivre soit une diète légèrement appauvrie en graisses (environ 24% des apports énergétiques totaux) soit une diète contrôle (environ 28% des apports énergétiques totaux) ou (Singh *et al.*, 1992). Après 1 an de suivi, cette étude rapporta une réduction significative du risque de mortalité cardiaque (-42%) et de la mortalité totale (-45%) pour le groupe expérimental. En fait, les manifestations de maladies coronaires commençaient à diminuer dès la 6^{ème} semaine de randomisation. Dans cet essai, le groupe expérimental était encouragé à manger très sainement : beaucoup de fruits et de légumes, des légumineuses et des noix ce qui permettait de maximiser les apports en ALA tout en respectant la restriction lipidique imposée par l'étude. Les bienfaits de la noix sur la réduction des maladies coronariennes ont d'ailleurs été rapportés par Seventh Day Adventists (Fraser *et al.*, 1992) et la Nurses's Health Study (Hu *et al.*, 1998).

-Synthèse bibliographique-

Une autre étude de prévention, l'Indian Experiment of Infarct Survival, a été menée sur 4360 patients recrutés moins de 1 jour après leur infarctus du myocarde (Singh *et al.*, 1997) et randomisés pour recevoir une supplémentation en AGPI-TLC n-3, (capsule d'huile de poissons équivalant à 1,08 g EPA/jour et 0,72 g DHA/jour) ou un régime riche en ALA (20g huile de graines de moutarde/jour soit 2,9 g ALA/jour) ou recevoir une gélule (100 mg hydroxyde d'aluminium /jour). Après 1 an d'étude, les groupes consommant de l'huile de poissons et de l'huile de graines de moutarde présentaient une réduction des évènements cardiaques (mortalité cardiaque totale et infarctus non mortel) de respectivement 29,4% et 19,3% ainsi qu'une réduction du risque d'arythmies cardiaques de respectivement 54,4 et 52,7% comparés au groupe placebo.

Cependant, certaines études n'ont pas réussi à démontrer les bénéfices cardiaques de l'ALA. La Norwegian Vegetable Oil Experiment est une étude en double aveugle où plus de 13000 hommes (âgés entre 50 et 59 ans) ont été randomisés pour consommer soit 5,5g ALA/jour (=10 ml d'huile de lin) soit 5,5g LA/jour (=10 ml d'huile de tournesol) pendant 1 an. Il y a eu 40 et 43 cas de mortalité totale dans les groupes contrôle et expérimental respectivement ainsi que 27 nouveaux cas de maladie coronaire ou de mort subite pour chaque groupe (Ascherio *et al.*, 1995). Autre étude, la Mediterranean Alpha Linolenic Enriched Groningen Dietary Intervention (MARGARIN), réalisée sur 124 hommes et 158 femmes (présentant des facteurs de risque cardiovasculaires multiples) randomisés pour consommer quotidiennement une margarine enrichie en LA ou une margarine enrichie en ALA. Après 2 ans d'étude, aucun bénéfice était observable, les groupes LA et ALA présentaient un risque comparable de cardiopathies ischémiques (Simonsen *et al.*, 1987).

Hormis les quelques résultats négatifs que nous venons de citer, la consommation d'AGPI n-3, qu'elle soit aussi bien d'origine animale que végétale, apparaît incontournable dans la prévention et le traitement des maladies cardiovasculaires. Le tableau 12 récapitule d'ailleurs les résultats des principales études cliniques et épidémiologiques citées précédemment.

-Synthèse bibliographique-

Type d'étude	Référence	Echantillon	Consommation d'AGPI n-3	Effets d'une diète riche en AGPI n-3
Cas-contrôle	Siscovick <i>et al.</i> , 1995	334 cas de 1 ^{er} arrêt cardiaque vs 493 contrôles	Pendant 6ans: 5,5 g AGPI-TLC n-3/mois équivalent à 2 portions de poissons/ sem	↓ incidences de 1 ^{er} arrêt cardiaque (-50%)
Intervention	DART (Burr <i>et al.</i> , 1989)	2033 hommes victimes d'un infarctus	Pendant 2 ans: 200-400 g poisson/sem ou équivalent sous forme d'huile de poissons (900 mg EPA+ DHA par jour)	↓ mortalité cardiaque et totale (-29%) comparé à un régime riche en fibres ou à un régime pauvre en graisses saturés
	Indian Experiment of infarct survival (Singh <i>et al.</i> , 1997)	360 patients à fort risque d'infarctus	Pendant 1 an: - EPA : 1,08 g/jour et DHA : 0,72 g/jour ou - 20 g huile de graines de moutarde (2,9 g ALA)	↓ évènements CV (-29%), infarctus non mortels (- 49%), mortalité cardiaque (-48%) comparé à un placebo 0,1g Al(OH) ₃
	Lyon Heart Study (de Lorgeril <i>et al.</i> , 1999)	605 survivants à un 1er infarctus	Pendant 4 ans: Régime méditerranéen enrichi en ALA	↓ 50 à 70% des récives d'infarctus non mortel et de mortalité cardiaque comparé à un régime occidental tarditionnel
	GISSI Prevenzione Trial (GISSI-Prevenzione investigators, 1999)	11324 patients récemment victimes d'un infarctus	Pendant 3,5 ans: 0,85 g/jour d'EPA et DHA	↓ mortalité CV, crises cardiaques et infarctus non mortel (-20%), mortalité CV seule (-30%), mort subite (-45%) comparé à un régime occidental tarditionnel
cohorte	Chicago Western Electric Study (Daviglius <i>et al.</i> , 1997)	1822 hommes en bonne santé	Pendant 30 ans: - ≥35 g poisson/jour	↓ mortalité par maladies coronariennes (-38%), mort subite par infarctus (-67%) comparé à un régime sans poisson
	Physicians Health Study (Albert <i>et al.</i> , 1998)	20551 hommes en bonne santé	Pendant 11 ans: - ≥1 portion poisson/sem - ≥1 portion poisson /mois	↓ mort subite (-52%) pour une consommation de poissons ≥1 portion poisson/sem

Tableau 12 : Effets cardioprotecteurs des AGPI n-3 : évidences épidémiologiques et cliniques.

VII. Mécanismes cardioprotecteurs des acides gras oméga 3

Depuis quelques années, le rôle cardioprotecteur des AGPI n-3 est connu et reconnu. Cependant, les mécanismes à travers lesquels les AGPI n-3 confèrent ces bénéfices restent mal compris. Ces mécanismes sont probablement multifactoriels et pourraient inclure des processus sanguins, vasculaires et myocardiques. Cette présente section se propose donc de

faire le point sur les possibles mécanismes impliqués dans la cardioprotection induite par les AGPI n-3.

7.1. Sang et vaisseaux: cibles potentiels des mécanismes cardioprotecteurs des acides gras oméga 3

7.1.1. Triglycéridémie

Les effets hypotriglycéridémiants des AGPI-TLC n-3 ont bien été établis. Harris (Harris *et al.*, 1997) a observé qu'une supplémentation en huile de poissons équivalente à 4 g AGPI n-3/jour diminue le taux sérique de triglycérides de 25 à 30%, augmente les LDL-cholestérol de 5 à 10% ainsi que les HDL-cholestérol de 1 à 3%. Cette dernière étude a d'ailleurs montré un effet dose des AGPI n-3 sur la baisse des triglycérides. La triglycéridémie post-prandiale est très sensible à la consommation chronique d'AGPI n-3 (Harris *et al.*, 1988; Sanders *et al.*, 1997) car une consommation en AGPI n-3 inférieure à 2g/jour produit de significatives réductions des triglycérides (Roche *et al.*, 1996). L'huile de poissons peut avoir un rôle thérapeutique dans les cas d'hypertriglycéridémie lourde (> 750 mg/dL). Des supplémentations importantes en AGPI-TLC n-3 (3 à 5 g/jour) sont alors nécessaires pour ce genre de traitement cependant de telles doses peuvent être non recommandées pour des personnes sensibles aux saignements (source: US Food and Drug Administration, 2002). L'utilisation de telles doses d'AGPI-TLC n-3 ne semblent donc pas adéquates pour traiter une hypertriglycéridémie et exercer à la fois une protection cardiovasculaire adéquate. En revanche, 1 g d'AGPI-TLC n-3/jour est une dose facilement accessible par la diète et qui permet d'induire des bénéfices cardiaques significatifs sans effet secondaire. Etant donné le contraste entre les doses efficaces nécessaires à l'obtention d'effets cardioprotecteurs et les doses efficaces nécessaires à l'obtention d'effets hypotriglycéridémiants, tout laisse suggérer que la baisse des triglycérides n'est pas un mécanisme essentiel pour expliquer la cardioprotection induite par les AGPI-TLC n-3.

7.1.2. Thromboses

La thrombose définit l'obturation d'un vaisseau par un caillot sanguin (thrombus). La formation de thrombus est favorisée par l'activation des plaquettes et de leurs dépôts sur des plaques instables. Au niveau cardiaque, une thrombose peut entraîner infarctus et nécrose du tissu cardiaque. Eviter la formation de thrombus devient alors un objectif thérapeutique dans les cas de syndromes coronaires. Toutefois, l'effet des AGPI n-3 sur la fonction plaquettaire et la thrombose reste controversé. En effet, de fortes doses d'AGPI n-3 réduisent l'agrégation

-Synthèse bibliographique-

plaquettaire tandis que de faibles doses d'AGPI n-3 n'ont qu'un faible pouvoir anti-plaquettaire (Mori *et al.*, 1997). De plus, les études affichent des résultats contradictoires sur les effets des AGPI n-3 sur la fibrinolyse et la coagulation. Shahar indique une association négative entre la consommation d'AGPI n-3 et les teneurs en fibrinogène, facteur VIII et facteur de Von Willebrand (Shahar *et al.*, 1993). L'équipe de Johansen a également observé qu'après 6 mois de supplémentation en AGPI n-3 (5,1 g/jour), les patients coronariens présentent une réduction du facteur de Von Willebrand (128% versus 147% pour les contrôles) et de la thrombomoduline (25 versus 33 ng/ml pour les contrôles) (Johansen *et al.*, 1999). Toutefois, l'étude CARDIA menée chez de jeunes adultes n'a pas relevé d'association significative entre la consommation de poisson (4 à 39 g/jour) ou la consommation d'AGPI n-3 (0,9 à 4,1 g/jour) et la concentrations de ces facteurs de coagulation (Archer *et al.*, 1998). Marckmann et collaborateurs n'ont également pas relevé d'effets des AGPI n-3 sur les concentrations du facteur VII, du fibrinogène, de la fibrinolyse endogène, de la β -thromboglobuline et du facteur Von Willebrand (Marckmann *et al.*, 1997).

Les effets des AGPI n-3 sur la thrombose restent donc flous. Néanmoins, les doses en AGPI n-3 nécessaires à l'obtention d'effets cardioprotecteurs sont bien inférieures aux doses à partir desquelles les AGPI n-3 exercent des effets significatifs sur les plaquettes et l'hémostase. En conséquence, les effets anti-thrombotiques, anti-agrégants et hémostatiques observés avec des doses élevées d'AGPI n-3 n'expliquent certainement pas les bénéfices cardiaques observés avec de faibles doses d'AGPI n-3.

7.1.3. Inflammation

L'inflammation joue un rôle central dans le développement et la progression des maladies coronaires. Les AGPI-TLC n-3, EPA et DHA, exercent une action anti-inflammatoire en entrant en compétition avec l'AA au niveau de plusieurs voies :

- les AGPI-TLC n-3 inhibent l'activité de la désaturase Δ^6 pour inhiber la biosynthèse de l'AA (Garg *et al.*, 1998).
- les AGPI-TLC n-3 sont en compétition avec l'AA pour occuper la position en sn-2 dans les phospholipides membranaires. En conséquence, la consommation d'AGPI-TLC n-3 peut entraîner un enrichissement des phospholipides en AGPI-TLC n-3 au dépend d'un appauvrissement plasmatique et cellulaire en AA (Siess *et al.*, 1980).
- l'EPA est aussi un inhibiteur compétitif de l'AA pour la synthèse des eicosanoïdes : prostanoïdes et leucotriènes. L'EPA est en compétition avec l'AA pour la synthèse des prostanoïdes au niveau de la cyclooxygénase. Au niveau plaquettaire, l'EPA inhibe la

-Synthèse bibliographique-

synthèse du TXA₂ (dérivés de l'AA) en faveur de la synthèse du TXA₃ (Weber, 1983) qui a des pouvoirs agrégants, vasoconstricteurs et anti-hémostatiques bien inférieurs à celui du TXA₂. Au niveau des cellules endothéliales, l'EPA inhibe la synthèse de la PGE₂ (dérivées de l'AA) (Fischer et Weber, 1984) en faveur de la synthèse de PGE₃ aux pouvoirs anti-agrégants, vasodilatateurs et hémostatiques bien supérieurs aux PGE₂. L'EPA est aussi un inhibiteur compétitif de l'AA pour la synthèse des leucotriènes au niveau de la leucoxygénase. Au niveau des neutrophiles, l'EPA stimule la synthèse des leucotriènes de la série 5 au dépend de la synthèse des leucotriènes de la série 4 (dérivés de l'AA) davantage pro-inflammatoires (Prescott, 1984).

Au final, les eicosanoïdes dérivés de l'EPA seront plutôt vasodilatateurs, anti-agrégants, anti-thrombotiques et anti-inflammatoires. En effet, une réduction du rapport AA/EPA favorise la synthèse des prostaglandines et thromboxanes de la série 3 et cette conséquence a été reliée à la réduction des risques de fibrillation ventriculaire et de mort subite (Coker *et al.*, 1982). Coker et Parrat ont trouvé que la libération de TXA₂ était une réponse précoce à l'occlusion et que l'utilisation d'inhibiteurs du récepteur au TXA₂ permettaient de réduire les risques d'arythmies liées à l'ischémie et à la reperfusion (Coker et Parat, 1985).

Les effets des eicosanoïdes ont été également examinés sur des myocytes ventriculaires de rat exposés à des conditions d'hypoxie et de réoxygénation (Oudot *et al.*, 1995). L'étude a révélé que des cardiomyocytes affichaient une meilleure récupération électromécanique durant l'hypoxie/réoxygénation si la culture était enrichie en AGPI n-3 plutôt qu'en AGPI n-6. Les auteurs ont suggéré qu'une diète enrichie en AGPI n-3 contribuait à la cardioprotection en modulant la synthèse des eicosanoïdes au niveau vasculaire et cardiomyocitaire.

Sur le modèle du rat anesthésié, Abeywardena et collaborateurs ont examiné les effets de divers acides gras sur la production d'eicosanoïdes et sur la composition en acides gras des phospholipides du myocarde (Abeywardena *et al.*, 1993). Cette étude a révélé que les animaux nourris avec de l'huile de poissons présentaient des membranes myocardiques enrichies en AGPI-TLC n-3 au dépend d'un appauvrissement en LA et AA. Parallèlement à ce remodelage membranaire et à une modulation bénéfique sur la synthèse des eicosanoïdes, ces avaient également moins d'arythmies après une ischémie/reperfusion.

Des études ont également testé si l'administration chronique d'huile de poissons pouvait atténuer la nécrose myocardique post-ischémique. Oskarsson a démontré qu'après 6 semaines de supplémentation (0,06 g EPA/jour), la nécrose myocardique était réduite de plus de 50% après un infarctus chez le chien (Oskarsson *et al.*, 1993). Aucune étude n'a évalué le rôle des

-Synthèse bibliographique-

eicosanoïdes pour expliquer l'effet anti-nécrotique des AGPI n-3. Toutefois, d'autres molécules que les AGPI n-3 peuvent également agir sur la voie des eicosanoïdes, on peut citer par exemple: les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les inhibiteurs de cyclooxygénase ou de TXA2. Des travaux ont donc évalué le rôle anti-nécrotique des eicosanoïdes par le biais de ces substances. Ces résultats ont révélé que l'inhibiteur de cyclooxygénase n'a aucun effet protecteur contre la nécrose myocardique (Jugdutt *et al.*, 1979; Bonow *et al.*, 1981; Bolli *et al.*, 1981) à l'exception de l'ibuprofène (Jugdutt *et al.*, 1980; Romson *et al.*, 1982). Également, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques au TXA2 (Toki *et al.*, 1988) et aux récepteurs TXA2 (Wargovitch *et al.*, 1987; Grover *et al.*, 1988) a entraîné la réduction de la nécrose myocardique chez le chien, suggérant un rôle important du TXA2 dans la pathophysiologie de l'ischémie myocardique. Étant donné les propriétés des eicosanoïdes et l'influence des AGPI n-3 sur leur biosynthèse, il est probable que l'effet anti-nécrotique et l'effet anti-arythmique induits par les AGPI-TLC n-3 s'expliquent, en partie au moins, par une modulation du métabolisme des eicosanoïdes.

D'autres mécanismes ont été récemment proposés pour expliquer l'effet anti-athérogène des AGPI n-3. Indépendamment de l'action des eicosanoïdes, les AGPI-TLC n-3 réduisent l'expression des molécules d'adhésion cellulaire (de Caterina *et al.*, 2000). Par exemple, l'EPA et le DHA semblent altérer le métabolisme des molécules d'adhésion telles que les molécules d'adhésion aux cellules vasculaires-1 (VCAM-1), les molécules d'adhésion intercellulaire-1 (ICAM-1) et la sélectine E. Abe et collaborateurs ont étudié les conséquences d'une supplémentation en AGPI-TLC n-3 (3-4 g/jour) chez des hypertriglycéridémiques (Abe *et al.*, 1998). Après 7 à 12 mois de supplémentation, les formes solubles ICAM-1 et sélectine E étaient réduites respectivement de 9% et 16% tandis que la forme soluble VCAM-1 restait inchangée. Des travaux expérimentaux ont également montré que la mise en présence de cellules endothéliales avec du DHA entraîne une réduction de l'expression des protéines : VCAM-1, sélectine-1, ICAM-1, Interleukine (IL)-6 et IL-8 (de Caterina *et al.*, 1996 et 2000). En revanche, une étude menée sur des fumeurs hyperlipidémiques a montré qu'une supplémentation en AGPI-TLC n-3 (4,8 g/jour) entraîne une augmentation des formes solubles sélectine-E et de VCAM-1 (Seljeflot *et al.*, 1998). Des résultats similaires ont été également obtenus sur des patients coronariens supplémentés avec 5,1 g AGPI-TLC n-3/jour (Johansen *et al.*, 1999).

L'expression des cytokines pro-inflammatoires est également modifiée par une supplémentation en huile de poissons. En réprimant les cytokines pro-inflammatoires, les AGPI-TLC n-3 entraînent une diminution de la migration des leucocytes circulants vers l'endothélium vasculaire et permettent ainsi de lutter contre le développement de

l'athérosclérose et de l'inflammation (Endres *et al.*, 1996). La voie des cytokines semblerait induire la répression du NF- κ B (de Caterina *et al.*, 2000), facteur de transcription connu pour jouer un rôle dans l'athérogénèse et l'instabilité de la plaque (Lee *et al.*, 1997).

7.1.4. Fonction endothéliale

Goode et collaborateurs ont montré que la capacité de relaxation des petites artères de patients hypercholestérolémiques était significativement améliorée après 3 mois de supplémentation en EPA et DHA (3 g/jour) (Goode *et al.*, 1997). La prise d'huile de poissons est également associée à une amélioration de la fonction endothéliale (Chin et Dart, 1995) et de la compliance artérielle (McVeigh *et al.*, 1994). Cette relaxation vasculaire semblerait être secondaire à la production de NO induite par la consommation d'AGPI-TLC n-3 (Harris *et al.*, 1997) et pourrait représenter le mécanisme par lequel l'huile de poissons exercerait un effet hypotenseur.

7.1.5. Pression sanguine

L'huile de poissons réduit modestement la pression sanguine (voir section §7.1.4.). A noter cependant que cet effet hypotenseur semble dépendant du degré d'hypertension (Howe, 1997). Dans une récente méta-analyse, Morris et collaborateurs ont trouvé une réduction significative de la pression artérielle (systolique/diastolique) de 3,4/2,0 mmHg chez des patients hypertendus qui consommaient 5,6 g AGPI n-3/jour (Morris *et al.*, 1993). Un essai mené sur des hypertendus a révélé qu'une supplémentation en AGPI-TLC n-3 (3 g/jour) entraînait une baisse de la pression sanguine de 5,5/3,5 mmHg (Appel *et al.*, 1993) et d'après Mori, le DHA semblerait être un hypotenseur plus efficace que l'EPA (Mori *et al.*, 2000). Cependant, toutes ces études ont utilisé des doses relativement élevées en huile de poissons, loin d'être comparables aux doses utilisées dans les études de prévention secondaire. L'effet hypotenseur de faibles doses d'AGPI-TLC n-3 reste donc à établir. Toutefois, comparés à des médicaments hypertenseurs ou d'autres nutriments, les AGPI n-3 apparaissent avoir un rôle limité dans le traitement de l'hypertension, il semble donc peu probable que ce mécanisme puisse expliquer les bénéfices cardiaques des AGPI n-3.

7.2. Myocarde: cible directe des mécanismes cardioprotecteurs des acides gras oméga 3

De récentes études cliniques ont montré que la consommation d'AGPI n-3 est associée à une meilleure récupération précoce cardiaque post-infarctus et à une diminution des risques de mort subite cardiaque. Expérimentalement, quelques études ont rapporté un effet anti-arythmiques de l'ALA chez le chien (Billmann *et al.*, 1999) et chez le rat (Mc Lennan, 1995) et probablement que la conversion de l'ALA en EPA est le mécanisme par lequel une diète enrichie en ALA peut exercer des effets cardioprotecteurs. Quant aux AGPI-TLC n-3, en particulier EPA et DHA, la majorité des travaux réalisés sur l'animal sont en accord pour démontrer un effet anti-arythmique et anti-nécrotique des AGPI-TLC n-3 après une période prolongée d'ischémie/reperfusion. Ces résultats sont d'ailleurs résumés dans le tableau 13.

Référence	Modèle	Traitement	Durée	Résultats
Culp <i>et al.</i> , 1980	Chien anesthésié	RE avec de l'huile de menhaden (25% a.c.t)	36-45 jours	- ↓ TI - ↓ BV ectopiques
Hock <i>et al.</i> , 1987	Rat anesthésié	RE avec 5% (pds/pds) d'huile de menhaden	4 semaines	- ↓ libération CK - Pas d'effet sur les BV ectopiques
Yanagisawa <i>et al.</i> , 1988	Rat anesthésié,	RE avec 5% (pds/pds) d'huile de lamproie	4 semaines	- ↑ survie - ↓ CK
Hock <i>et al.</i> , 1990	Rat anesthésié	RE avec 5% (pds/pds) d'huile de menhaden	4 semaines	↓ CK, VT et VF
Hallaq <i>et al.</i> , 1990	Cardiomyocytes de rat	Milieu de culture enrichi avec 5 µmol/L d'EPA	3 à 5 jours	↓ fréquence contractions myocytaires
McLennan <i>et al.</i> , 1990	Rat anesthésié	RE avec 12% (pds/pds) d'huile de thon	9 mois	↓ tachycardies des VF
Charnock <i>et al.</i> , 1992	Singe anesthésié	RE avec 6% (pds/pds) d'huile de poissons	2 ans	- ↑ seuil des VF - ↓ arythmies
Hallaq <i>et al.</i> , 1992	Cardiomyocytes de rat	Milieu de culture enrichi avec 5-10 µmol/L EPA et DHA	3 à 5 jours	↓ arythmies induites par la ouabaine
McLennan <i>et al.</i> , 1992	Singe anesthésié	RE avec 18,8% (a.c.t) d'huile de thon	2 ans	- ↑ seuil des VF - ↓ VF
McLennan <i>et al.</i> , 1993	Rat anesthésié	RE avec 12% (pds/pds) d'huile de poissons	12 semaines	↓ VFet BV précoces
Oskarsson <i>et al.</i> , 1993	Chien anesthésié	Supplémentation orale en EPA (0,06 g/kg/jour)	6 semaines	↓ TI
Yang <i>et al.</i> , 1993	Cœur isolé perfusé de rat	RE avec 12% (pds/pds) d'huile de poissons (40% d'AGPI n-3 dont 19% d'EPA et 13% de DHA	4 semaines	- ↓ CK - ↑ fonction cardiaque post-ischémique

-Synthèse bibliographique-

Référence	Modèle	Traitement	Durée	Résultats
Billman <i>et al.</i> , 1994	Chien anesthésié	Perfusion d'huile de poissons dosé à 10% (contenant 70% d'AGPI n-3 dont 33,9% EPA et 25%% de DHA)	Perfusion i.v 1h avant l'ischémie	↓ FV
Demaison <i>et al.</i> , 1994	Coeur isolé perfusé de rat	RE avec 10% (pds/pds) d'un mélange d'huile de poissons et d'huile de tournesol (1:1)	8 semaines	- ↑ débit aortique post-ischémique - ↓ libération LDH
Kinoshita <i>et al.</i> , 1994	Chien anesthésié	Supplémentation orale en EPA (100 mg/kg poids corporel/jour)	8 semaines	↓ FV et TV
Zhu <i>et al.</i> , 1994	Rat anesthésié	RE avec 12% (pds/pds) d'huile de poissons	- 1 semaine - 8 semaines	- pas de bénéfice - ↓ TI
McLennan <i>et al.</i> , 1995	Rat anesthésié	RE avec 12% (pds/pds) d'huile de colza	12 semaines	- ↓ aryhmies ventriculaires - ↓ mortalité
Kang <i>et al.</i> , 1996	Cardiomyocytes de rat	Milieu de culture enrichi avec 3 µmol/L d'EPA		Pas d'effet sur les aryhmies
McLennan <i>et al.</i> , 1996	Rat anesthésié	Supplémentation orale en: - EPA (1,1% a.c.t) - DHA (1,1% a.c.t) ou - EPA (0,4% a.c.t)/DHA (0,3% a.c.t)	5 semaines	- pas d'effet - ↓ VF - ↓ VF
Nasa <i>et al.</i> , 1998	Cardiomyocytes de rat	- RE avec 0,15% (pds/pds) huile de poissons (40% d'EPA et 60% de DHA) - Supplémentation orale en EPA ou DHA à 1g/kg/jour	4 semaines	↑ survie cellulaire
Billman <i>et al.</i> , 1999	Chien anesthésié	Perfusion d'ALA ou d'EPA ou de DHA à 1% (v/v)	Perfusion i.v 90 min avant l'ischémie	↓ VF mortelles
Ogita <i>et al.</i> , 2003	Lapin anesthésié	Supplémentation orale en EPA (600mg/kg/jour)	2 semaines	- ↓ TI

Tableau 13: Effets des AGPI n-3 sur la protection du myocarde à l'ischémie/reperfusion.

a.c.t : apport calorique totale; BV: battements ventriculaires; CK: libération de créatine kinase; FV: fibrillation ventriculaire; LDH: libération de lactate déshydrogénase; RE: régime enrichie; TI : taille de l'infarctus; TV: tachycardie ventriculaire.

Bien que des effets systémiques puissent partiellement expliquer les effets cardioprotecteurs des AGPI n-3, il est probable que d'autres mécanismes interviennent et notamment un effet direct des AGPI n-3 sur le myocarde. D'après Nair (Nair *et al.* 1997), il apparaît fort probable que la cardioprotection induite par les AGPI n-3 soit le fruit de l'interaction de plusieurs mécanismes spécifiquement cardiaques.

7.2.1. Phospholipides membranaires

Un régime enrichi en AGPI n-3 entraîne des modifications lipidiques au niveau des membranes cardiaques qui sont associés à des effets anti-arythmiques (Charnock, 1992b; McLennan, 1990 et 1993) et à des effets anti-nécrotiques (Culp *et al.*, 1980 et 1990; Hock *et al.*, 1987, Yanagisawa *et al.* 1988; Yang *et al.*, 1993; Nasa *et al.*, 1998). Les mécanismes myocardiques sous-jacents à l'effet anti-nécrotique restent encore obscurs. Cependant, de nombreuses explications ont été proposées pour comprendre la protection spécifiquement myocardique mise en place par les AGPI n-3. Ainsi, la consommation d'AGPI n-3 pourrait limiter les arythmies grâce à un remodelage lipidique membranaire qui modulerait la disponibilité du calcium pour le couplage excitation/contraction. L'équipe d'Alexander Leaf a testé les effets de l'EPA sur une culture de cardiomyocytes (Hallaq *et al.*, 1990). Les résultats ont révélé une baisse de la fréquence de contraction et un enrichissement des membranes cardiaques en AGPI n-3 et ce, au dépend d'un appauvrissement en AGPI n-6. Etant donné que les phospholipides membranaires contrôlent le transfert des ions à travers la membrane, les auteurs ont alors proposé que toute modification de la composition en acides gras de la membrane pourrait influencer les propriétés des canaux à sodium et à calcium. En conséquence, tout enrichissement membranaire en AGPI n-3 pourrait limiter la survenue d'arythmies myocardiques en contrôlant l'ouverture de ces canaux ioniques.

7.2.2. Acides gras libres

Un hypothèse a été très vite proposée pour expliquer l'importance des lipides dans la survenue des arythmies. Après un infarctus du myocarde, se produit une forte mobilisation lipidique du tissu adipeux vers le plasma et les cellules myocardiques, Kurien et Oliver ont alors proposé que cet important afflux d'acides gras libres pouvaient-être à l'origine des arythmies (Kurien et Oliver, 1970). En condition normale, le niveau tissulaire en acides gras libres est très bas. La majorité des acides gras sont oxydés dans la mitochondrie pour fournir de l'énergie et une petite partie est estérifiée et stockée dans les triglycérides et les phospholipides (Van der Vusse, 1992). Après un repas, le glucose est le carburant énergétique préféré pour le métabolisme oxydatif du myocarde. En période post-prandiale, les acides gras libres sont le carburant privilégié du myocarde. En cas d'ischémie, une partie du myocarde devient anaérobie, l'oxydation des acides gras devient alors perturbée. Une étude menée sur le rat a montré que dans un cœur ischémique perfusé au palmitate, une grande quantité des acides gras ne sont plus oxydés et s'accumulent sous forme de longues chaînes d'acyl carnitine (Feuvray, 1981). Cet accumulation d'acides gras est alors très toxique pour le cœur.

-Synthèse bibliographique-

Joel de Leiris et collaborateurs ont comparé les effets d'une perfusion de palmitate, de glucose, d'insuline de palmitate lié à l'albumine sur la sensibilité du myocarde à l'infarctus du myocarde chez le rat. Comparé aux autres substrats, le palmitate réduit davantage le débit cardiaque et augmentait fortement la libération de lactate déshydrogénase à la reperfusion. Les auteurs ont alors souligné le rôle des acides gras libres dans le développement de l'infarctus du myocarde (de Leiris *et al.*, 1975; de Leiris et Opie, 1978). L'accumulation d'acides gras libres est également à l'origine d'arythmies myocardiques (Oliver et Opie, 1994). Riemersma et collaborateurs ont noté que les patients victimes d'un infarctus avaient une élévation immédiate des acides gras libres dans le plasma (Riemersma *et al.*, 1988). Les auteurs ont postulé que cela pouvait être un facteur de prédisposition aux arythmies. De nombreux mécanismes ont été proposés pour comprendre les pouvoirs arythmogènes des acides gras libres. Au cours de l'ischémie, la β -oxydation est inhibée et pourrait conduire à une accumulation intracellulaire d'acylcarnitine et d'acyl-CoA. Corr (Corr *et al.*, 1984) puis Huang (Huang *et al.*, 1992) ont d'ailleurs suggéré que l'acylcarnitine pouvait inhiber les pompes calciques du réticulum sarcoplasmique et les canaux calciques entraînant alors une accumulation de calcium dans le cytosol certainement à l'origine des arythmies. Toutefois, cette hypothèse sur les acides gras libres est controversée. Opie et collaborateurs ont étudié les conséquences cardiaques d'une augmentation induite des acides gras libres plasmatiques après l'ischémie. Les auteurs n'ont alors observé aucune augmentation des arythmies et des fibrillations ventriculaires associées à cette surcharge plasmatique en acides gras libres (Opie *et al.*, 1971).

Autre mécanisme suggéré, une diète enrichie en AGPI-TLC n-3 pourrait modifier les teneurs en acides gras libres du myocarde notamment celles en AA, EPA et DHA et ceci pourrait avoir une répercussion directe sur le pool d'acides gras libres disponibles pour la synthèse des eicosanoïdes. En conséquence, la consommation d'AGPI n-3 pourrait mener à une altération de la production de TXA₂ et donc à une vulnérabilité du cœur à développer des arythmies durant l'ischémie (Charnock *et al.*, 1992). Cette étude a démontré qu'après une diète riche en acides gras saturés et en AGPI n-3, les rats présentaient une faible teneur en AGPI n-3 libres dans le myocarde, toutefois, ces acides gras libres avaient un effet direct sur le cœur en réduisant la quantité d'eicosanoïdes, un des déterminants majeurs de la vulnérabilité du cœur à développer des fibrillations ventriculaires.

Autre hypothèse, selon la forme des AGPI n-3, libres ou liés aux phospholipides membranaires, ces acides gras auraient plus ou moins des capacités anti-arythmiques. Billman et collaborateurs ont montré qu'une perfusion intraveineuse et préischémique d'une émulsion d'huile de poissons limite les fibrillations ventriculaires chez le chien (Billman *et al.*, 1994).

-Synthèse bibliographique-

Etant donné que la perfusion était réalisée 60 min avant l'ischémie, les auteurs ont alors attribué l'effet anti-arythmique de l'huile de poissons aux AGPI-TLC n-3 libres. A partir de myocytes isolés, Kang et Leaf ont démontré que les AGPI : AA, EPA et DHA peuvent se lier aux canaux sodiques et éviter les arythmies (Kang et Leaf, 1996). Toutefois, il a été démontré que l'AA peut-être rapidement converti en TXA₂, un agent pro-arythmique. Les auteurs ont alors conclu que les AGPI n-3 n'avaient pas été incorporés dans les phospholipides membranaires et que seuls l'EPA et le DHA sous forme libre, possédaient des propriétés anti-arythmiques. Weylandt et collaborateurs ont démontré qu'un enrichissement membranaire en EPA et DHA n'avait pas d'effet anti-arythmique et que seuls, l'EPA ou le DHA, sous forme libres étaient capables de protéger les myocytes de rat contre les arythmies (Weylandt *et al.*, 1996). Cependant, McLennan remarque que l'effet anti-arythmique de l'huile de poissons semble plus dépendre d'un enrichissement membranaire en DHA qu'en EPA (McLennan 2001). En effet, après une diète enrichie en EPA ou en huile de poissons (reconnu pour contenir davantage d'EPA que de DHA), le DHA est l'AGPI-TLC n-3 majoritairement incorporé dans les membranes myocardiques. D'ailleurs McLennan a remarqué qu'à faible dose, le DHA, mais pas l'EPA, inhibe les arythmies induites par l'ischémie (McLennan *et al.*, 1996).

Enfin, Nair et collaborateurs ont émis l'hypothèse qu'à la suite d'un infarctus, des phospholipides membranaires sont hydrolysés, des acides gras libres sont alors relâchés et la nature de ces acides gras détermine la réponse arythmique du myocarde (Nair *et al.*, 1996). Les auteurs précisent même que l'incorporation des AGPI n-3 dans les membranes myocytaires est essentielle pour l'action anti-arythmique des AGPI n-3. En effet, ces AGPI n-3 sont les seuls AGPI n-3 à pouvoir se retrouver sous forme libre durant l'ischémie myocardique et donc seuls à être potentiellement capables d'éviter les arythmies.

7.2.3. Transporteurs ioniques

Hallaq et collaborateurs ont démontré que le DHA permettait d'éviter les arythmies plus efficacement que l'EPA en modulant l'activité des canaux calciques de type L ce qui évitait ainsi une surcharge calcique toxique pour la cellule (Hallaq *et al.*, 1990 et 1992). Ils ont aussi proposé que les AGPI n-3 agissaient non pas comme bloqueurs mais plutôt comme des modulateurs de canaux calciques qui contrôlaient les efflux et les influx de calcium afin de préserver l'activité contractile des myocytes (Leaf et Weber, 1988). Cette équipe a également testé les effets de la ouabaïne sur une culture de myocytes incubée avec des AGPI (Hallaq *et al.*, 1992). Appliquée sur une culture de myocytes, la ouabaïne inhibe la pompe Na⁺/K⁺

-Synthèse bibliographique-

ATPase, modifie les propriétés électrophysiologiques de la cellule et entraîne une surcharge sodique. L'accumulation de sodium entraîne une accumulation de calcium qui a pour conséquence une augmentation de la contraction et de la fréquence de battements des myocytes. L'addition d'AA dans le milieu de culture ne modifie en rien les effets de la ouabaïne. Cependant, lorsque les cellules sont mises en présence d'EPA, les myocytes sont préservés contre les effets toxiques de la ouabaïne. Les auteurs ont alors suggéré que contrairement à l'AA, l'EPA pourrait s'incorporer dans les phospholipides membranaires et bloquer le site de liaison de la ouabaïne, évitant ainsi une surcharge calcique. Afin de mieux comprendre le rôle de ces canaux calciques dans la cardioprotection des AGPI n-3, Hallaq a étudié les effets de la nitrendipine (inhibiteur des canaux calciques de type L) sur des myocytes isolés de cœur de rat (Hallaq *et al.*, 1992). Alors que la nitrendipine était censé bloquer l'entrée de calcium dans la cellule, l'EPA protégeait toutefois les myocytes contre les effets toxiques de la ouabaïne en évitant une accumulation toxique de calcium libre dans le myocyte. Les auteurs ont alors conclu que l'EPA, sans être incorporer dans la membrane, agissait directement sur les canaux calciques, probablement en agissant sur les voies de signalisation impliquées dans la mobilisation du calcium intramyocytaire.

Une des plus puissante voie pour protéger le myocarde contre les altérations liées à l'ischémie/reperfusion est d'inhiber l'échangeur Na^+/H^+ . Un essai clinique a montré que l'emploi du caporide, un inhibiteur de l'échangeur Na^+/H^+ , a un effet bénéfique contre les risques de mort cardiaque (Theroux *et al.*, 2000). Au cours de l'ischémie, cet échangeur préserve l'intégrité du myocyte en maintenant la valeur du pH. Paradoxalement, il peut aussi précipiter la nécrose cellulaire. En ce qui concerne les AGPI-TLC n-3, ils ont un effet comparable à cette drogue, avec l'avantage d'être naturels. Goel a montré que de forte doses d'EPA et de DHA (25-100 μmol) inhibe l'échangeur Na^+/H^+ situé au niveau du sarcolemme et protège le myocarde contre les arythmies et la mort cellulaire après une ischémie/reperfusion (Goel *et al.*, 2002). Il semble d'ailleurs que cela soit une spécificité des AGPI-TLC n-3 car 50 μmol de LA ou d'ALA n'ont pas d'effet significatif.

Les pompes Na^+/K^+ ATPases et Ca^{2+} ATPases interviennent pour la régulation des concentrations ioniques au cours des cycles de contraction et de relaxation des myocytes (Vajreshwari et Narayanareddy, 1992). Kinoshita et collaborateurs (Kinoshita *et al.*, 1994) ont trouvé qu'une supplémentation en EPA stimule l'activité de la pompe Ca^{2+} ATPase et parallèlement réduit les arythmies en réduisant l'accumulation de calcium durant l'ischémie.

Autres système important pour le cycle contraction/relaxation, la pompe $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPase du réticulum sarcoplasmique qui est également fortement influencée par les teneurs membranaires en AGPI. Par exemple, une diète enrichie en huile de poissons (riche en EPA et

DHA) entraîne un enrichissement membranaire en AGPI n-3 et diminue l'activité de la $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPase (Kinsella *et al.*, 1990).

7.2.4. Enzymes et récepteurs

La consommation d'AGPI n-3 pourrait influencer la fonction des récepteurs membranaires et l'activité des enzymes nécessaires à la production d'énergie car ces protéines sont sensibles aux interactions avec les lipides membranaires (Charnock 1994).

Kinsella et collaborateurs ont montré qu'une diète enrichie avec de l'huile de poissons stimule l'activité de l'adényl kinase et de la 5' nucléotidase (Kinsella *et al.*, 1990). L'ingestion d'huile de poissons module également l'activité de la cyclooxygénase et par la même module la synthèse des eicosanoïdes (Knapp, 1993). L'huile de poissons affecte également l'activité des phospholipases comme par exemple phospholipase A2 qui participe aux voies de signalisation impliquées dans l'élévation du calcium intracellulaire (Grynberg *et al.*, 1992).

Situés au niveau du sarcolemme, les récepteurs β -adrénergiques sont impliqués dans la régulation de la force et la fréquence de contraction. Les travaux de Grynberg (Grynberg *et al.*, 1995) ont montré que de fortes teneurs membranaires en DHA (20% des acides gras totaux) diminuaient l'affinité des récepteurs β -adrénergiques pour leur substrat mais paradoxalement le nombre de site de liaison et la production d'AMPc ne sont pas diminués. Les auteurs ont donc conclu que le DHA exerçait une influence positive sur les mécanismes de transduction β -adrénergiques, essentiellement à travers une augmentation de l'efficacité de production d'AMPc.

7.2.5. Mitochondrie cardiaque

Le calcium est très important pour la mitochondrie et la mitochondrie est très importante pour le calcium. En effet, le calcium régule les réactions métaboliques nécessaires à la fourniture d'énergie pour le cardiomyocyte. Quant à la mitochondrie, elle constitue un lieu de stockage pour le calcium. Cependant, une ischémie peut très vite entraîner une accumulation de calcium à l'intérieur de la mitochondrie et mener à des dommages mitochondriaux voire la mort cellulaire. Lorsque le calcium excède une certaine concentration mitochondriale, le pore de perméabilité transitoire (PTP), situé sur la membrane mitochondriale interne, s'ouvre, libère du calcium dans le cytosol, le signal de déclenchement des processus apoptiques (Gunter et Pfeiffer, 1990).

-Synthèse bibliographique-

La mitochondrie comporte des canaux et des pompes ioniques spécifiques au transport calcique. Le rôle de la pompe $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPase dans la prévention des arythmies a d'ailleurs été étudié par Kinoshita et collaborateurs. Ces investigateurs ont testé les effets d'une supplémentation en EPA (100 mg/kg/jour pendant 8 semaines) sur les arythmies ventriculaires durant un infarctus du myocarde chez le chien. Ils ont constaté que les membranes microsomales des chiens supplémentés en EPA étaient enrichies en EPA et que parallèlement l'activité des pompes $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPases étaient augmentée et la fréquence des arythmies diminuée. Les auteurs ont conclu qu'une diète enrichie en EPA pourrait réduire la sévérité des arythmies en limitant l'accumulation de calcium à l'intérieur du cardiomyocyte (Kinoshita *et al.*, 1994).

Le calcium contrôle le métabolisme mitochondrial cardiaque à travers l'action d'enzymes calcium dépendantes qui catalysent des réactions irréversibles au cours de l'oxydation des carbohydrates et des lipides (Hansford, 1994). Pepe a étudié les effets d'une supplémentation en AGPI sur l'activité de la pyruvate chez le rat. Comparé à un régime enrichi en AGPI n-6, un régime enrichi en AGPI n-3 induisait: un enrichissement en AGPI n-3 des membranes mitochondriales cardiaques, une baisse de l'activité de la pyruvate déshydrogénase, une quantité moindre de calcium intramitochondrial et enfin un gain d'efficacité de la fonction mitochondriale pendant l'ischémie/reperfusion (Pepe *et al.*, 1999).

L'équipe de Demaison a étudié les effets d'un régime enrichi en huile de poissons (AGPI n-3) et d'un régime enrichi en huile de tournesol (AGPI n-6) sur le métabolisme oxydatif chez le rat. Les auteurs ont remarqué que les rats consommateurs d'AGPI n-3 avaient une meilleure récupération du métabolisme énergétique mitochondrial et une diminution de la libération de lactate déshydrogénase (marqueur de la nécrose cellulaire) après une ischémie/reperfusion. En conséquence, les AGPI n-3 sembleraient limiter les altérations liées à l'ischémie/reperfusion (nécrose) en induisant un meilleur rendement énergétique mitochondrial à la reperfusion (Demaison *et al.*, 1994).

Enfin, des études ont démontré qu'une diète enrichie en huile de poissons stimule l'activité de la carnitine acyltransférase, l'enzyme chargé de transférer les acides gras vers la matrice mitochondriale (Vamecq *et al.*, 1993), lieu de la β -oxydation. D'ailleurs, il semblerait que la β -oxydation est davantage stimulée par l'EPA que le DHA (Madsen *et al.*, 1999).

VIII. Mécanismes cardioprotecteurs de l'éthanol

Les mécanismes cardioprotecteurs induits par une consommation modérée d'alcool sont encore mal compris. La composition des boissons alcoolisées étant très variables, divers constituants peuvent avoir la capacité de développer cette cardioprotection. C'est pourquoi beaucoup travaux de recherche ont distingué les effets de l'éthanol (que l'on retrouve dans toutes les boissons alcoolisées) de ceux des constituants non alcooliques (exemple : les polyphénols). Au cours de cette présente section, nous traiterons uniquement de l'éthanol et de ses mécanismes cardioprotecteurs induits sur le sang, les vaisseaux et le myocarde.

8.1. Sang et vaisseaux : cibles potentiels de l'éthanol

8.1.1. Lipides sanguins

HDL

De nombreuses études ont montré que la consommation de boissons alcoolisées pouvait augmenter le taux plasmatique de lipoprotéines de haute densité (HDL) (Langer *et al.*, 1992; Suh *et al.*, 1992). Le rôle de ces lipoprotéines est de transporter le cholestérol des tissus périphériques vers le foie, ce qui leur confère des propriétés anti-athérogènes. L'augmentation du taux plasmatique de HDL contribue donc à un effet protecteur observé vis-à-vis des maladies cardiovasculaires (Barr *et al.*, 1951; Gordon *et al.*, 1977).

Les HDL comportent plusieurs fractions qui diffèrent par leur densité. Parmi ces fractions, deux sont quantitativement plus importantes : les HDL2 et les HDL3. Ces deux fractions n'ont pas la même signification physiopathologique : un taux plasmatique élevé des HDL2 serait associé à une diminution du risque coronarien alors que les HDL3 n'auraient pas de telles propriétés. Mais cela reste controversé. Pour Gaziano *et al.* (Gaziano *et al.*, 1993), un taux plasmatique élevé des HDL3 pourrait également être associé à une diminution du risque coronarien. Pour une dose inférieure à 40 g d'éthanol par jour, la consommation de boissons alcoolisées pourrait augmenter le taux plasmatique des HDL3 plutôt que celui des HDL2 (Taskinen *et al.*, 1987). Pour une consommation de 60 à 80 g d'éthanol par jour, on observe une augmentation du taux plasmatique des fractions HDL2 et HDL3, mais la plus forte augmentation concernerait les HDL2 (Taskinen *et al.*, 1982).

Une consommation modérée de boissons alcoolisées pourrait donc jouer un rôle de protection vis-à-vis des maladies cardiovasculaires en augmentant le taux plasmatique des HDL. Toutefois, la notion de consommation modérée est difficile à définir car chaque personne possède une certaine sensibilité à l'éthanol et les effets de l'éthanol sont donc différents d'un individu à un autre. Ainsi, Bertière *et al.* (Bertière *et al.*, 1986) ont observé que l'absorption

-Synthèse bibliographique-

de 30 g d'éthanol par jour était associée à une augmentation des HDL plasmatiques entre 14 à 72 % selon les sujets. Selon Rimm (Rimm *et al.*, 1999), une consommation régulière de 30 g alcool/jour permet de réduire de 16,8% les risques de maladies coronaires en induisant une augmentation des HDL. La notion de consommation régulière est également importante car l'arrêt de la consommation d'alcool entraîne une baisse du taux plasmatique des HDL (Haskell *et al.*, 1984). Pour expliquer le rôle favorable de la consommation modérée de boissons alcoolisées, certains ont suggéré qu'il était dû à l'augmentation de la paraoxonase, enzyme liée aux HDL, qui protège contre l'oxydation des LDL (Van der Gaag *et al.*, 1999). Cette augmentation de la paraoxonase n'est pas différente selon le type de boisson (vin, bière ou spiritueux). Cette étude et celle de Durrington (Durrington *et al.*, 2001) suggère que l'augmentation de la paraoxonase sérique pourrait être un des mécanismes biologiques qui pourrait expliquer la diminution des coronaropathies chez les buveurs modérés d'alcool.

Apolipoprotéines A

Chaque lipoprotéine se différencie par son contenu en apoprotéines (Apo). La consommation de boissons alcoolisées peut notamment influencer les taux plasmatiques de ces apolipoprotéines (tableau 14). Les Apo A sont des cofacteurs protéiques de l'enzyme lécithine cholestérol acyl transférase (LCAT) responsable de l'estérification du cholestérol libre et de son assimilation au sein des HDL.

Apolipoprotéines	Taux plasmatiques
Apolipoprotéine A-I (Apo A-I)	Augmentation
Apolipoprotéine A-II (Apo A-II)	Stable ou augmentation
Apolipoprotéine A-I et A-II	Variable (augmentation ou diminution)
Apolipoprotéine B (Apo B)	Stable ou diminution

Tableau 14: Consommation modérée d'alcool et taux plasmatique en apolipoprotéines (Ziegler *et al.* 1995).

La lipoprotéine A-I qui contient uniquement l'Apo A-I correspond à la fraction anti-athérogène des HDL. Plusieurs études ont montré qu'un faible taux plasmatique d'Apo A-I était associé aux maladies coronariennes et que ce taux était plus faible que le taux plasmatique de HDL comme marqueur des coronaropathies (Mendoza *et al.*, 1983; Maciejko *et al.*, 1983; Handka *et al.*, 1990). Hagiage *et al.* (Hagiage *et al.*, 1992) ont montré qu'une dose faible ou modérée d'éthanol stimule la synthèse d'Apo A-I par le foie et l'intestin. D'autres études *in vitro* (Puchois *et al.*, 1990; Amarasuriya *et al.*, 1992) ont également

-Synthèse bibliographique-

observé une augmentation de la synthèse hépatique de l'Apo A-I après une stimulation par l'éthanol. Cependant, le mécanisme par lequel l'éthanol pourrait augmenter le taux plasmatique des HDL et des Apo A-I n'est pas clairement défini. Certains suggèrent une induction enzymatique au niveau hépatique (Hagiage *et al.*, 1992), d'autres proposent une augmentation du taux de la lipoprotéine lipase (Ziegler *et al.*, 1995) qui stimulerait ainsi le flux de cholestérol libre et d'apoprotéines des VLDL vers les HDL. Enfin, une baisse de l'activité de la protéine de transfert du cholestérol (CETP) pourrait ralentir le transfert du cholestérol estérifié des HDL vers les LDL et les VLDL (Hagiage *et al.*, 1992).

Apolipoprotéine a ou Lp(a)

De récentes études d'observation ont montré que la Lp(a) joue un rôle significatif dans l'athérosclérose, c'est d'ailleurs un facteur de risque majeur pour les maladies cardiovasculaires (Paassita *et al.*, 1998; Fontana *et al.*, 1999). Epidémiologiquement, Lp(a) est un puissant facteur de risque cardiovasculaire, le mécanisme présumé étant l'inhibition de la fibrynolyse par réduction du niveau de plasminogène due à une élévation de la Lp(a) (Testa et Marcovina, 1999). D'après des études d'intervention, la consommation d'alcool réduirait la concentration en Lp(a). D'après Kervinen (Kervinen *et al.*, 1993), l'arrêt ou la diminution de la prise d'alcool est accompagnée d'une augmentation significative de la Lp(a). Vasisht (Vasisht *et al.*, 1996) ont aussi démontré que les patients coronariens avaient des niveaux plasmatiques élevés en Lp(a) mais que la consommation d'alcool permettait de baisser ces niveaux en Lp(a).

8.1.2 Thrombose

L'éthanol semble protéger des maladies cardiovasculaires ischémiques en réduisant les phénomènes de thrombose. Des études épidémiologiques ont montré que la prévention porte surtout sur les infarctus du myocarde (plutôt que sur les morts subites). Ceci est la conséquence d'un effet direct sur l'agrégation plaquettaire qui est diminuée par des doses faibles ou modérées d'alcool (Seigneur *et al.*, 1990; Renaud *et al.*, 1992; Renaud et de Lorgeril, 1992). Cependant, on peut observé un effet rebond sur la réponse plaquettaire après une ingestion importante d'alcool et pourrait en partie expliquer l'augmentation des morts subites et des accidents vasculaires cérébraux de type hémorragique.

Agrégation plaquettaire

La consommation de boissons alcoolisées entraîne une inhibition de l'agrégation plaquettaire. Par exemple, des rats qui consomment une eau de boisson enrichie avec 4 à 6 % d'éthanol présentent une réduction de l'agrégation plaquettaire induite par la thrombine (Mc Gregor *et al.*, 1981; Renaud *et al.*, 1984; Desai *et al.*, 1986). Ruf et collaborateurs ont également observé une diminution de 70 % de l'agrégation plaquettaire induite par la thrombine sur des rat soumis à un régime riche en graisses saturées et à une consommation d'éthanol à 6 % (Ruf *et al.*, 1995). Cependant, toutes ces études montrent un effet rebond. L'effet de l'éthanol est rapide mais il est suivi d'une augmentation de l'agrégation plaquettaire si la consommation de l'éthanol n'est pas régulière. Chez l'homme, d'autres effets ont été également observés : inhibition de la réactivité des plaquettes induites par l'adénosine diphosphate (Renaud *et al.*, 1978; Davenas *et al.*, 1984; Renaud *et al.*, 1992) et inhibition de test d'agrégation à l'adrénaline et au collagène (Renaud et Gregor, 1981). Un effet dose a été également testé sur un petit échantillon de volontaires qui consommaient 0,25 ou 0,50 ml d'éthanol/kg soit l'équivalent de 1 ou 2 verres d'alcool/jour (Zhang *et al.*, 2000). Une heure après la prise aiguë d'éthanol l'agrégation plaquettaire était inhibée de manière dose dépendante.

Fibrinogène

L'éthanol pourrait exercer un effet bénéfique sur d'autres facteurs de l'hémostase comme par exemple la réduction du taux de fibrinogène et l'augmentation de l'activité fibrinolytique (Renaud et de Lorgeril, 1992). L'augmentation du fibrinogène sanguin est généralement considérée comme un facteur de risque indépendant des maladies cardiovasculaires ischémiques. Une étude allemande menée en 1992 sur 4 400 sujets confirme cette hypothèse : les teneurs en fibrinogène du plasma varient selon une courbe en U relative à la consommation de boissons alcoolisées dans laquelle les consommateurs modérés présentent les plus basses concentrations (Tessedre *et al.*, 1996). Dans une autre étude prospective, la concentration de fibrinogène était également fortement associée à la consommation d'alcool selon une courbe en U. Les plus hautes concentrations étant pour les non buveurs et les buveurs de plus de 60 g d'alcool/j (Puchois *et al.*, 1990). En fait, cette association était valable pour le vin et les spiritueux, mais non pour la bière et le cidre. Le fibrinogène étant considéré comme un facteur de risque, sa diminution pourrait être une des explications de la réduction des cardiopathies ischémiques chez les buveurs modérés.

Thrombolyse

Un effet favorable de l'alcool sur l'activateur du plasminogène a été constaté par Ridker (Ridker *et al.*, 1994). Cependant une étude plus ancienne avait montré un résultat inverse sur le PAI1 (Kluft *et al.*, 1990).

Facteur tissulaire

La consommation régulière de boissons alcoolisées semble associée à une réduction du facteur tissulaire qui probablement joue un rôle important dans l'athérogenèse (Rimm *et al.*, 1995).

8.1.3. Inflammation

Un grand nombre d'études observent un risque moins élevé de maladies cardiovasculaires chez des buveurs modérés d'alcool comparés aux non buveurs. Même avec des petites quantités (1 verre/semaine soit 12-15 g/semaine), l'alcool apparaît être protecteur. Cependant, à de telles doses, il semble peu probable que la cardioprotection induite par l'éthanol passe par une augmentation des HDL et une baisse de l'agrégation plaquettaire (Renaud et de Lorgeril, 1992; Rimm *et al.*, 1999). D'autres mécanismes sont probablement impliqués. Par exemple, de récentes études ont montré que l'alcool pourrait protéger des maladies coronaires à travers un effet anti-inflammatoire (Zairis *et al.*, 2004). En fait, beaucoup de scientifiques considèrent l'athérosclérose coronaire comme le résultat d'une inflammation des parois artérielles (Ross, 1999) et de nombreuses évidences cliniques et expérimentales indiquent que l'éthanol a un effet direct sur l'inflammation (Stewart *et al.*, 2002).

Depuis 1938, l'alcool est reconnu inhiber la fonction leucocytaire (Stewart *et al.*, 2002). En 1963, on a mis en évidence sur des donneurs de sang que la motilité leucocytaire diminuait en présence d'éthanol (Stewart *et al.*, 2002). Dans les années 70, un grand nombre de chercheurs a continué à étudier expérimentalement les effets de l'éthanol sur l'inflammation. Beaucoup d'études ont indiqué un effet inhibiteur de faibles doses d'éthanol sur les médiateurs de l'inflammation, incluant NF- κ B et différentes cytokines. D'autres études ont également montré que l'association éthanol/régime riche en graisses insaturées pouvait mener à une augmentation de l'expression des médiateurs pro-inflammatoires. Il a été aussi observé que les radicaux libres et les antioxydants pouvaient modifier les effets de l'éthanol sur ces médiateurs. Cependant, il est important de rappeler que dans la majorité de ces travaux, les investigateurs ont utilisé de fortes doses d'éthanol dans le but d'étudier les effets toxiques de l'éthanol et non les effets protecteurs de doses modérées d'éthanol.

-Synthèse bibliographique-

De nombreuses études ont évalué les effets *in vivo* de l'éthanol sur la production de cytokines (Stewart *et al.*, 2002). Par exemple, Mendall et collaborateurs ont observé que le niveau du facteur de nécrose tumorale α (TNF α) est plus bas chez les buveurs que chez les abstinents (Mendall *et al.*, 1997). Dans une étude randomisée menée sur des individus sains, l'équipe de Sierksma a montré qu'après 3 semaines de consommation chronique de bière (4 verres pour les hommes, 3 verres pour les femmes) les taux plasmatiques de protéine réactive C (CRP) (marqueur de l'inflammation) et de fibrinogène avaient baissé respectivement de 35 et 12% comparé aux consommateurs d'une bière sans alcool (Sierksma *et al.*, 2002). L'effet sur la CRP était significatif pour les femmes mais pas pour les hommes probablement en raison d'un échantillon trop petit. Les auteurs ont alors conclu que l'alcool pouvait diminuer les risques de maladies cardiovasculaires par une action anti-inflammatoire. Cependant, Mezzano et collaborateurs ont montré que la consommation modérée de vin rouge n'avait aucun effet sur la CRP (Mezzano *et al.*, 2001), confirmant ainsi les résultats négatifs de Skiersma (Sierksma *et al.*, 2002). Toutefois, les études de Mezzano et Skiersma diffèrent sur plusieurs points : la quantité et le type d'alcool consommé durant la période d'intervention, l'âge des sujets (les participantes à l'étude de Skiersma étaient toutes ménopausées), le niveau basal de CRP (le niveau basal de CRP était assez haut dans l'étude de Skiersma). Ces résultats suggèrent que des doses modérées d'éthanol pourrait exercer un effet anti-inflammatoire (anti-CRP) uniquement sur des hautes teneurs en CRP, comme le souligne d'ailleurs l'étude de Zairis (Zairis *et al.*, 2004).

D'un autre côté, rares sont les études de population qui étudient l'influence de l'alcool sur l'inflammation. Imhof et collaborateurs ont étudié l'association entre la consommation d'alcool et la concentration de différents marqueurs (positif ou négatif) de l'inflammation systémique sur une population adulte Allemande (Imhof *et al.*, 2001). Pour la première fois, l'effet-dose a été examiné et cette étude a montré que le taux des marqueurs de l'inflammation n'était pas différents entre les buveurs modérés et excessifs. De plus, la population était très représentative de la population adulte européenne car 6% des hommes et 13% des femmes déclaraient être total abstinents. Parmi les hommes, la consommation d'alcool montrait une relation en U entre la CRP et la concentration de globuline α 1 (même après ajustement). Il y avait aussi une relation en U entre la consommation d'alcool et la phase de réaction négative de l'albumine. Pour les femmes, les observations étaient semblables mais non significatives.

En résumé, les non buveurs et les buveurs excessifs ont des teneurs élevées en CRP et une concentration en albumine plus basse que les buveurs modérés. L'albumine est un marqueur efficace des complications coronariennes. L'effet bénéfique de l'albumine peut s'expliquer, au moins en partie, par son action inhibitrice sur la fonction plaquettaire et le risque de

-Synthèse bibliographique-

thrombose (de Lorgeril et Renaud, 1990). D'après les travaux de Imhof, il existe une forte association entre les marqueurs de l'inflammation (positif ou négatif) et le risque de coronaropathie. Une action anti-inflammatoire de l'alcool pourrait donc contribuer au lien entre consommation modérée d'alcool et baisse des risques de coronaropathie (Imhof *et al.*, 2001). Les auteurs de cette étude ont proposé que l'interleukine-6 (qui intervient pour réguler l'expression génique de l'albumine) pourrait-être le lien entre l'éthanol et l'inflammation car une consommation modérée d'alcool semble inhiber la production d'interleukine-6 tandis qu'une consommation excessive d'alcool stimule la production de cytokines.

Récemment, une étude américaine a examiné l'association entre la consommation d'alcool et la CRP chez les participants de l'étude PRINCE (Pravastatine Inflammation/CRP evaluation) (Albert *et al.*, 2003). Pour cette étude, la consommation moyenne d'alcool était assez basse puisque les consommateurs de plus de 2 verres/jour étaient classés comme «gros buveurs». Ces buveurs avaient d'ailleurs un indice de masse corporel et une triglycéridémie inférieurs aux abstinentes, ce qui était assez paradoxal. En fait, ces «gros buveurs» pouvaient être assimilés à des buveurs européens modérés (Albert *et al.*, 1999; de Lorgeril *et al.*, 2002; Zairis *et al.*, 2004). En contraste (et comme attendu), le cholestérol total et le HDL-cholestérol étaient plus hauts chez les «gros buveurs». L'étude a également révélé une relation inverse entre la concentration de CRP et la consommation d'alcool. La plus basse valeur de CRP était mesurée chez les buveurs de 5 à 7 verres/semaine. Il n'y avait pas de différence avec les «gros buveurs» et aucune relation en U (même après ajustement). Ces résultats sont donc en accord avec ceux de Imhof et Zairis qui supposent que des effets anti-inflammatoires sont à l'origine de la cardioprotection induite par des doses modérées d'éthanol.

Cependant, proposer que la cardioprotection induite par des doses modérées d'éthanol passe par un effet anti-CRP est une théorie qui comporte des limites. En effet, la CRP est un facteur de risque et pas nécessairement un facteur causal. Plus exactement, la CRP est utilisée comme un indice des complications par coronaropathie. Cependant, il n'existe aucun essai randomisé qui ait montré une relation de cause à effet entre baisse de la CRP et réduction des complications par maladies coronaires. De plus, l'inflammation est un phénomène très complexe qui implique un grand nombre de médiateurs locaux et systémiques, aussi bien circulants (plaquettes, leucocytes) que des constituants des artères (cellules musculaires lisses, cellules endothéliales, monocytes, macrophage). A ce jour, il n'existe aucune évidence que la CRP est un facteur causal qui puisse expliquer les effets cardioprotecteurs de doses modérées d'éthanol.

8.1.4. Fonction endothéliale

Vasorelaxation

L'éthanol a des capacités vasorelaxantes et la voie de l'oxyde nitrique (NO) semble contribuer à ces effets. Le NO intervient en réponse à une tension exercée sur la paroi des vaisseaux. Dans une série d'expériences *in vitro*, Hendrickson (Hendrickson *et al.*, 1999) a démontré que des cellules endothéliales incubées avec de l'éthanol, répondaient plus efficacement à un débit pulsatile. En effet, la stimulation de la NO synthase endothéliale (eNOS) induite par le débit pulsatile était renforcée par l'éthanol. D'après cette étude, l'éthanol semblerait intervenir sur la voie du NO via l'activation de la protéine Gi (figure 38).

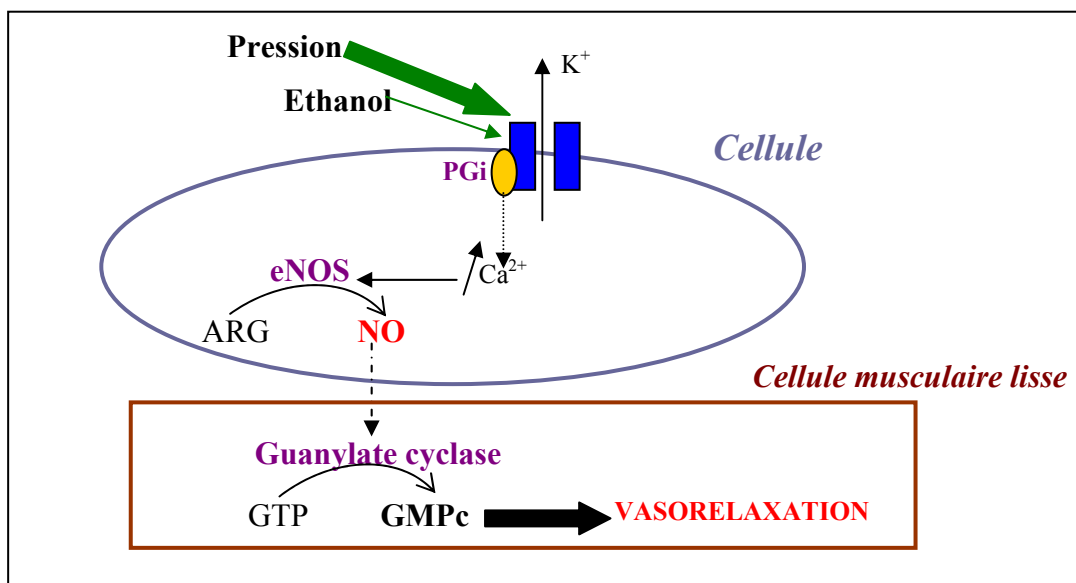


Figure 38 : Mécanismes vasorelaxants de l'éthanol.

eNOS : oxyde nitrique; GMPc : guanosine monophosphate cyclique; GTP : guanosine triphosphate, synthase endothéliale, NO: oxyde nitrique, PGI : protéine Gi.

Prostacycline

La prostacycline PGI₂ est également un puissant vasodilatateur et un puissant inhibiteur de l'agrégation plaquettaire. La prise chronique d'éthanol stimule la production de PGI₂ chez l'homme (Landolfi *et al.*, 1984) et le rat (Guiverneau *et al.*, 1987),

Une tension trop élevée exercée sur la paroi des vaisseaux induit la synthèse de PGI₂ via la voie de la protéine Gi (Redmond *et al.*, 1998). Etant donné que l'éthanol stimule également la protéine Gi, il est fort probable que l'augmentation de synthèse de PGI₂ observée après une exposition à l'éthanol passe également par la voie de la protéine Gi.

Prolifération et migration des cellules musculaires lisses (CML)

La prolifération et la migration des CML jouent un rôle important dans le développement normal des vaisseaux, la réparation d'une paroi artérielle lésée ou dans le développement de l'athérogénèse (Schwartz *et al.*, 1993 et 1995). Merritt et Liu ont démontré que l'administration chronique ou aiguë d'éthanol entraîne une diminution de l'hyperplasie intimale chez le lapin (Merritt *et al.*, 1997) et le porc (Liu *et al.*, 1997). Selon Liu, l'éthanol a permis de préserver le diamètre de la lumière artérielle en diminuant la prolifération néointimal et en limitant l'oxydation des LDL (Liu *et al.*, 1997).

L'accumulation de CML dans l'intima artérielle est un événement clé dans le développement de l'athérocclérose et de la resténose (Raines et Ross, 1993). Les effets de l'éthanol sur la migration des CML a été étudiée *in vitro* par Hendrickson et collaborateurs (Hendrickson *et al.*, 1999). Ces investigateurs ont montré que des CML humaines prétraitées avec de l'éthanol ont une migration inhibée de manière dose dépendante. Il semblerait donc que l'éthanol module l'activité des métalloprotéases, des inhibiteurs des métalloprotéases tissulaires, des protéines kinases à activité mitotique (MAPK) et de la calcium/calmoduline kinase.

Une prolifération excessive de CML joue un rôle important dans l'athérogénèse et l'hypertension (Schwartz *et al.*, 1995). Une des voies enzymatiques clés intervenant dans la régulation du cycle cellulaire est la voie de la MAPK. Les MAPK sont par exemple représentées par ERK-1 et ERK-2 qui sont activées par une MEK, elle même activée via des MEKK activées via des voies de signalisations impliquant des récepteurs à facteur de croissance (Pelech *et al.*, 1992; Gardner *et al.*, 1994).

Les effets de l'éthanol sur la MAPK a été étudié *in vitro* sur des cultures de CML. Hendrickson et collaborateurs ont démontré que l'application de doses modérées pendant 24h entraîne une inhibition de l'activité de la MAPK *via* l'inhibition de la MEK (Hendrickson *et al.*, 1998). D'autre étude ont également montré que l'éthanol inhibe la prolifération des CML en modulant l'expression ou l'activité des récepteurs à facteur de croissance (Resnicoff *et al.*, 1993).

8.1.5. Pression sanguine

D'après les données épidémiologiques, l'augmentation de la consommation d'alcool est reliée à une augmentation de la pression sanguine et/ou à de l'hypertension (Grobbee *et al.*, 1999). Cependant, les effets de l'alcool sur la pression sanguine varient selon la chronicité et la quantité d'alcool consommée. En effet, des doses modérées d'alcool sont reconnues pour exercer un effet hypotenseur. D'ailleurs, la consommation d'alcool et la pression sanguine

sont reliées par une relation décrivant une courbe en J (Gillman *et al.*, 1995; Beilin *et al.*, 1996).

8.2. Le myocarde: cible directe de l'éthanol

De nombreuses études épidémiologiques ont observé que la consommation de faibles doses d'alcool était associée à une diminution des maladies cardiovasculaires (Rimm *et al.*, 1991; Stampfer *et al.*, 1988; Gronbaek *et al.*, 1995; Camargo *et al.*, 1997; Thun *et al.*, 1997; Renaud *et al.*, 1998; Gaziano *et al.*, 2000). Faiblement dosé, l'alcool exerce encore un effet cardioprotecteur. Cependant, il est difficile d'expliquer que de si faibles doses d'éthanol exerce un tel effet en agissant sur des composants sanguins. En fait, l'effet cardioprotecteur de doses modérées d'alcool est très régulièrement et principalement expliqué par un effet sur les lipides sanguins (augmentation des HDL) (Rimm *et al.* 1999) et sur les plaquettes (effet anti-agrégant) (Renaud *et al.*, 1999; de Lorgeril et Salen, 1999). D'autres mécanismes sont probablement impliqués. Par exemple, de récentes études cliniques ont montré qu'une consommation modérée d'alcool pouvait améliorer la récupération après un infarctus du myocarde (Muntwyler *et al.*, 1998; Mukamal *et al.*, 2001; de Lorgeril *et al.*, 2002) et éviter la mort subite cardiaque (Albert *et al.*, 1999), suggérant un effet directe de l'éthanol sur le myocarde ischémique.

En fait, la consommation chronique d'éthanol semble mimer les effets cardioprotecteurs induits par le préconditionnement ischémique. Le préconditionnement ischémique se définit comme une protection spécifiquement myocardique induite par de brefs épisodes d'ischémie/reperfusion (Murry *et al.*, 1986). Après une longue période d'ischémie/reperfusion, un myocarde préconditionné présente une meilleure récupération fonctionnelle et/ou une protection efficace contre la nécrose cellulaire.

Des travaux menés chez le rat, la souris, le chien et le lapin ont en effet démontré que la consommation chronique d'éthanol pouvait exercer les mêmes effets cardioprotecteurs qu'un préconditionnement ischémique (Miyamae *et al.*, 1997, 1998 et 1998b; Zhu *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2002; Pagel *et al.*, 2000 et 2002; Guiraud *et al.*, 2004). Cependant, d'autres investigateurs n'ont pas réussi à reproduire cette cardioprotection (Bellows *et al.*, 1996; Itoya *et al.*, 1998; Dow *et al.*, 2001; Hale *et al.* 2001). Ces données contradictoires sont probablement dues à des différences dans le choix : de l'espèce animal, du modèle expérimental (ischémie globale versus ischémie régionale), du dosage de l'éthanol, de la durée et du mode d'administration de l'éthanol (aigüe versus chronique). L'ensemble de ces résultats est d'ailleurs résumé dans le tableau 15.

-Synthèse bibliographique-

Référence	Modèle expérimental	Traitement éthanol	Protocole	Effets	Mécanismes
Bellows <i>et al.</i> , 1996	Lapin anesthésié	Perfusion préischémique à 1mg/kg pendant 10 min	30 min IR + 240 min R	Pas d'effet	
Miyamae <i>et al.</i> , 1997	Cobaye, cœur isolé perfusé	Eau de boisson enrichie avec -2,5 ou 5 ou 10% v/v pendant 3 et 6 semaines -20% v/v pendant 6 et 12 semaines	45 min IG + 48 min R	↑ RF, ↓ CK	- Activation des récepteurs à adénosine A1 - Relation inverse entre dose/durée d'exposition pour induire des effets bénéfiques
Miyamae <i>et al.</i> , 1997	Cobaye, cœur isolé perfusé	Eau de boisson enrichie avec 20% v/v pendant 13 semaines	45 min IG + 48 min R	↑ RF, ↓ CK	Activation des récepteurs à adénosine A1
Miyamae <i>et al.</i> , 1998	Rat, cœur isolé perfusé	Eau de boisson enrichie avec 36% v/v pendant 16 semaines	45 min IG + 48 min R	↑ RF, ↓ CK	Activation des récepteurs adrénergiques α 1
Miyamae <i>et al.</i> , 1998b	Cobaye, cœur isolé perfusé	Eau de boisson enrichie avec 15% (calories totales) pendant 8 semaines	45 min IG + 48 min R	↑ RF, ↓ CK	Activation/translocation de la PKCε
Itoya <i>et al.</i> , 1998	Chien anesthésié	Perfusion à 0,08 g/kg/min pendant 10 min, 10 min avant l'ischémie	60 min IR + 180 min R	Pas d'effet	
Chen <i>et al.</i> , 1999	Rat, cellules en culture	Incubation préischémique avec 10 à 50 mM pendant 10 min	180 min d'hypoxie	↑ viabilité cellulaire	Activation/translocation de la PKCε
Zhu <i>et al.</i> , 2000	Rat, cœur isolé perfusé	Eau de boisson enrichie avec 18% v/v pendant 10 mois	45 min IG + 48 min R	↑ RF, ↓ CK	Ouverture des canaux KATP de la mitochondrie
Pagel <i>et al.</i> , 2000, 2002	Chien anesthésié	Régime enrichi avec 1,5 g/kg pendant 12 semaines	60 min IR + 180 min R	↓ TI	Ouverture des canaux KATP du sarcolemme et de la mitochondrie
Chen <i>et al.</i> , 2001	Souris, cœur isolé perfusé	Perfusion à 10 mM pendant 15 min, 17 min avant l'ischémie	30 min IG + 21 min R	↓ CK	Activation/translocation de la PKCε (bénéfique) et de la PKCδ (néfaste)
Hale <i>et al.</i> , 2001	Lapin anesthésié	0,5 mg/kg, 5 ou 90 min avant l'ischémie	30 min IR + 180 min R	Pas d'effet	
Krenz <i>et al.</i> , 2001	Lapin anesthésié	Perfusion avec : -0,35 à 1,4 mM pendant 10 min, 20 min avant l'ischémie	30 min IR + 180 min R	Pas d'effet	Ouverture des canaux KATP
		-0,35 mM pendant 10 min, 60 min avant l'ischémie	30 min IR + 180 min R	↓ TI	
Krenz <i>et al.</i> , 2001	Lapin, coeur isolé perfusé	Perfusion avec : -10 et 50 mM pendant 5 min, 15 min avant l'ischémie	30 min IR + 180 min R	Pas d'effet	PKC et PTK, mais aucun rôle des canaux KATP, des radicaux libres et des récepteurs adénosine
		-10, 20 et 50 mM pendant 45 min en commençant 15 min avant l'ischémie	30 min IR + 180 min R	↓ TI	
Chen <i>et al.</i> , 1999	Rat, cœur isolé perfusé	Perfusion préischémique à 10 mM pendant 20 min	45 min IG + 30 min R	↓ CK	Activation/translocation de la PKC

-Synthèse bibliographique-

Référence	Modèle expérimental	Traitement éthanol	Protocole	Effets	Mécanismes
Zhou <i>et al.</i> , 2002	Souris, cœur isolé perfusé	18% v/v pendant 12 semaines	20 min IG + 30 min R	↑ RF, ↓ CK	↑ Expression et activité de la PKC et d'Akt
Kehl <i>et al.</i> , 2003	Chien anesthésié	1,5 g/kg pendant 12 semaines	60 min IR + 180 min R	↓ TI	Activation des récepteurs à adénosine A1
Guiraud <i>et al.</i> , 2004	Rat, cœur isolé perfusé	9% v/v pendant 7 semaines	30 min IR + 120 min R μ	↓ TI	Pas de translocation de la PKC ϵ

Tableau 15: Effets de l'éthanol sur la protection du myocarde à l'ischémie/reperfusion.

Canal KATP : canal potassique ATP dépendant; CK : libération de créatine kinase; IG : ischémie globale; IR : ischémie régionale; PKC : protéine kinase C; PTK : protéine tyrosine kinase; R: reperfusion; RF: récupération fonctionnelle post-ischémique; TI: taille de l'infarctus.

8.2.1. Protection contre la nécrose cellulaire

De nombreuses études expérimentales ont démontré que l'éthanol améliore la récupération fonctionnelle cardiaque et réduit la fuite d'enzymes cardiaques - indice de nécrose cellulaire (Miyamae *et al.*, 1997, 1998 et 1998b; Zhu *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 1999 et 2001). Ces résultats ont été obtenus sur des modèles expérimentaux d'ischémie globale, des modèles incompatibles avec la mesure de la taille de l'infarctus. Or, ce paramètre est le plus objectif pour évaluer la protection contre la nécrose cellulaire.

Concernant les études qui ont évalué la taille de l'infarctus, les résultats sont contradictoires. Certaines démontrent une réduction significative de la taille de l'infarctus après une consommation aiguë et modérée d'éthanol (Krenz *et al.*, 2001) ou après une consommation chroniques et modérées d'éthanol (Guiraud *et al.*, 2004). Pour d'autres, la consommation d'éthanol n'induit aucun effet cardioprotecteur. En effet, Itoya a montré que l'éthanol ne parvient pas à réduire la nécrose si celui-ci est injecté avant l'ischémie (Itoya *et al.*, 1998), résultat également confirmé Hale (Hale *et al.*, 2001). En revanche, Krenz a montré que si la perfusion d'éthanol est séparée de l'ischémie par une durée suffisamment longue ou un lavage alors l'éthanol a le temps d'être suffisamment métabolisé pour parvenir à réduire la taille de l'infarctus (Krenz *et al.*, 2001). En conséquence, si l'éthanol est perfusé trop tardivement (proche de l'ischémie), l'éthanol est alors présent en trop forte concentration durant l'ischémie et donc, l'éthanol ne peut pas induire d'effet protecteur sur des modèles *in vivo* (Bellows *et al.*, 1996; Itoya *et al.*, 1998 Dow *et al.*, 2001; Hale *et al.* 2001).

8.2.2. Amélioration de la fonction ventriculaire

Certaines études expérimentales démontrent que des doses chroniques d'éthanol améliorent la fonction cardiaque post-ischémique (Miyamae *et al.*, 1997, 1998 et 1998b; Zhu *et al.*, 2000; Pagel *et al.*, 2000 et 2002; Zhou *et al.*, 2002) tandis que d'autres démontrent une limitation de la taille de l'infarctus sans amélioration de la fonction cardiaque (Krenz *et al.*, 2001; Guiraud *et al.*, 2004). Ce dernier cas est souvent observable après un préconditionnement ischémique. En effet, il est fréquent d'observer un dysfonctionnement réversible de la fonction cardiaque (phénomène de stunning) accompagné d'une réduction de la nécrose cellulaire (Kloner et Jennings, 2001) après de brèves séquences d'ischémie/reperfusion.

8.2.3. Interférence avec les mécanismes du préconditionnement ischémique

Pour comparer les effets cardioprotecteurs de l'éthanol avec ceux d'un préconditionnement ischémique, l'utilisation du cœur isolé perfusé est le modèle expérimental le mieux adapté. Il permet d'une part d'éliminer la présence de l'éthanol et des facteurs circulants sanguins et d'autre part d'étudier l'action directe de l'éthanol sur le myocarde.

L'emploi de ce modèle a ainsi permis de démontrer que la consommation d'éthanol protégeait directement le myocarde contre les altérations liées à l'ischémie/reperfusion (Miyamae *et al.*, 1997, 1998 et 1998b; Zhu *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 1999 et 2001; Krenz *et al.*, 2001; Guiraud *et al.*, 2004).

De nombreux travaux ont également proposé que l'éthanol (Miyamae *et al.*, 1997, 1998 et 1998b; Chen *et al.*, 1999 et 2001; Zhu *et al.*, 2000; Pagel *et al.*, 2000 et 2002; Krenz *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2002; Kehl *et al.*, 2003) pouvait mimer le préconditionnement ischémique (Crow *et al.*, 1977; Mitchell *et al.*, 1995; Yoshida *et al.*, 1997; Kawamura *et al.*, 1998) en activant la protéine kinase C (PKC) qui pourrait médier à l'ouverture des canaux potassiques ATP dépendant, effecteurs de la cardioprotection. Certains investigateurs ont démontré que l'isoforme ϵ de la PKC était particulièrement impliqué dans les voies de signalisation du préconditionnement ischémique (Mitchell *et al.*, 1995; Yoshida *et al.*, 1997; Kawamura *et al.*, 1998) et de l'éthanol (Miyamae *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 1999 et 2001). Toutefois, la PKC ϵ et tous les isoformes ne sont pas obligatoirement stimulés après un préconditionnement ischémique ou une consommation chronique d'éthanol et ne semblent donc pas nécessaires à la cardioprotection (Guiraud *et al.*, 2004). En effet, la PKC cardiaque se transloque très rapidement du cytosol vers la membrane (1 minute après le début de l'ischémie) mais transitoirement (elle revient dans le compartiment cytosolique après chaque reperfusion). Or, une translocation soutenue de l'isoforme ϵ n'est pas nécessaire pour induire

-Synthèse bibliographique-

de effets cardioprotecteurs sur ce type de modèle (Strasser et al., 1999; Simonis et al., 2003). Dans notre cas, le manque de translocation de la PKC ϵ , aussi bien après le préconditionnement ischémique (2 brefs brefs d'ischémie/reperfusion) qu'après la consommation d'éthanol (9% v/v pendant 7 semaines), s'explique certainement par le fait que ces stimuli sont insuffisants pour induire une translocation soutenue de la PKC ϵ (Guiraud et al., 2004). L'isoforme ϵ est donc davantage assimilable à un déclencheur plutôt qu'à un médiateur du préconditionnement ischémique et de la cardioprotection induite par des doses modérées d'éthanol.

Si l'activité de la PKC n'est pas nécessaire à la cardioprotection induite par l'éthanol, une exposition chronique d'éthanol semble toutefois stimuler des médiateurs semblables à ceux stimulés par le préconditionnement ischémique. Des travaux menés sur le chien et le rat ont confirmé que la cardioprotection induite par l'éthanol passe par une activation des canaux potassiques ATP dépendant (Zhu *et al.*, 2000; Pagel *et al.*, 2000 et 2002) et de la protéine Akt (Zhou *et al.*, 2002), une protéine reconnue pour diminuer l'apoptose (Fujio *et al.*, 2000; Yamashita *et al.*, 2001). En revanche, des travaux menés chez le lapin ont démontré que les canaux potassiques ATP dépendant ne semblent pas impliqués dans la cardioprotection induite par une exposition aiguë à l'éthanol (Krenz *et al.*, 2001). Il est probable que les voies de signalisation induites par l'éthanol diffèrent d'une espèce à l'autre et explique ce résultat contradictoire. Ce point sera d'ailleurs développé dans le paragraphe suivant.

Les récepteurs adrénergiques et adénosinergique sont aussi des médiateurs communs à l'éthanol et au préconditionnement ischémique. En effet, Miyamae (Miyamae *et al.*, 1998) et Kehl (Kehl *et al.*, 2003) ont démontré respectivement sur le cobaye et le lapin que le récepteur à adénose de type 1 (RA1) était une voie de signalisation indispensable à la cardioprotection induite par l'éthanol. En revanche, Krenz a démontré chez le lapin que RA1 était inutile aux effets cardioprotecteurs de l'éthanol (Krenz *et al.*, 2001). Miyamae a également démontré que les effets cardioprotecteurs de l'éthanol passent par l'activation des récepteurs adrénergiques $\alpha 1$ (RA $\alpha 1$) et non par l'activation des RA1 (Miyamae *et al.* 1998). Ces résultats suggèrent donc que les voies de signalisation induites par l'éthanol diffèrent d'une espèce à l'autre. A cette complexité, s'ajoutent également des différences de modèles expérimentaux, de dosage, de durée et de mode de traitement.

8.2.4. Interaction avec les acides gras

Des études cliniques suggèrent que la consommation chronique d'éthanol entraîne une induction des AGPI n-3 dans les cellules et le sang (Nervi *et al.*, 1980; Pellegrini *et al.*, 1996; Pawlosky *et al.*, 2004; de Lorgeril *et al.*, 2006 soumis), un mécanisme connu pour induire des

-Synthèse bibliographique-

effets cardioprotecteurs chez l'animal (Oskarsson *et al.*, 1993; Mc Lennan *et al.*, 1996) et réduire la mortalité cardiaque chez les humains (Leaf *et al.*, 2003).

L'examen des résultats cliniques laissent cependant apparaître quelques biais. En effet, les rares études cliniques qui ont évalué les effets d'une consommation d'éthanol sur le métabolisme des AGPI n-3 ont conduit à des résultats inconsistants (Cuevas *et al.*, 2000; Christensen *et al.*, 2001, Perret *et al.*, 2002). Par exemple, Christensen a trouvé une association positive entre les AGPI n-3 et la consommation de vin d'une part et avec la variabilité de la fréquence cardiaque (indice de la mort subite cardiaque chez les patients coronariens) d'autre part. Ces résultats supposent donc un effet protecteur de l'éthanol et des AGPI n-3 contre la mort subite cardiaque. Cependant, l'association entre la consommation de vin et la variabilité de la fréquence cardiaque n'est pas aussi significative qu'avec les AGPI n-3. Les auteurs ont donc conclu que les buveurs de vin étaient aussi des consommateurs de poissons et que la protection apparente due au vin était probablement due au poisson. Cependant, la consommation d'AGPI-TLC n-3 n'a pas été directement évaluée ce qui contredit les conclusions de l'auteur. D'autres études ont également suggéré qu'une consommation d'éthanol est associée à une augmentation des AGPI n-3 sanguins (Cuevas *et al.*, 2000; Perret *et al.*, 2002) toutefois sans aucune évaluation préalable de la consommation d'AGPI n-3. A ce jour, seule la Lyon Diet Heart Study, a préalablement procédé à une évaluation de la consommation quotidienne en éthanol et en AGPI n-3. Les investigateurs ont observé une réduction des risques de complications coronariennes chez les consommateurs modérées de vins (de Lorgeril *et al.*, 2002). D'après ces travaux, la consommation modérée de vin est associée à une élévation des AGPI-TLC n-3 dans le sang (de Lorgeril *et al.*, soumis). Il semblerait donc que boire modérément du vin équivaut à consommer du poisson.

Par ailleurs, la cardiolipine est connue pour jouer un rôle central dans le dysfonctionnement mitochondrial lié à l'ischémie/reperfusion (Devries *et al.* 1997, Lesnefsky *et al.*, 2004). Quant au palmitate, c'est un acide gras pro-apoptotique (Hickson-Bick *et al.*, 2000; Ostrander *et al.*, 2001) connu pour interférer avec la cardiolipine et le métabolisme mitochondrial (Sparagna *et al.*, 2000). En effet, de faibles doses d'éthanol ont été associées à une diminution des effets apoptotiques du palmitate sur des myocytes néonatales de cœur de rat (Sparagna *et al.*, 2004).

———— **MATÉRIELS ET MÉTHODES** ————



I. Animaux

1.1. Conditions d'élevage

Les expériences ont été réalisées sur des rats mâles Wistar (IFFA-Credo, L'Abresle, France). Les animaux ont été placés dans des conditions constantes de température et d'humidité, avec des cycles réguliers de 12 heures de jour / 12 heures de nuit. Ils ont aussi disposé d'un accès libre à l'eau et à la nourriture (régime A04, UAR, Villemoisson-sur-orge, France). Enfin, les soins apportés aux rats ont été en accord avec les directives de la Communauté Européenne sur l'utilisation des animaux de laboratoire (L358-86/609EEC).

1.2. Traitements

Les animaux sont âgés de 4 semaines au début de chaque traitement décrit ci-dessous.

1.2.1. Consommation chronique et modérée d'éthanol

Les expériences ont été menées sur des rats répartis en trois groupes :

- **ETOH 6%**

- **ETOH 12%**

recevant respectivement 6 et 12% (v/v) d'éthanol dans leur eau de boisson pendant 7 ou 18 semaines

- par comparaison au groupe **contrôle** recevant de l'eau et un régime iso-calorique.

1.2.2. Supplémentations lipidiques

Les expériences ont été menées sur des rats répartis entre deux groupes :

- le groupe **OM3**, supplémenté avec 650 µl de Mix alpha 3® (Laboratoire Synergia, Beaune-sur-Arzon, France), un mélange d'huiles de lin et de poissons gras, riches en AGPI n-3,

- le groupe **SAT**, supplémenté avec 650 µl de graisse de palme (Palmella, Allemagne), riche en acides gras saturés.

Le tableau 16 résume la composition en acides gras du régime A04, du Mix alpha 3® et de la graisse de palme.

Pendant 8 semaines, la supplémentation est effectuée per os, quotidiennement et à même heure.

Les traitements éthanoliques et lipidiques sont suspendus la veille au soir du sacrifice (environ 16h avant l'expérimentation) afin d'apprécier les effets induits par la prise chronique

-Matériels et méthodes-

de ces nutriments. De plus, au moment du sacrifice des rats éthanol, un dosage de l'alcoolémie est effectué pour vérifier l'absence d'éthanol circulant (laboratoire de pharmacologie toxicologie-CHU Grenoble).

Acides gras (%)	Régime A04	Huile de palme	*Mix Alpha 3®
Saturés			
C14:0	0,5	1,1	0,1
C16:0	17,6	49,5	3,9
C18:0	2,0	4,9	1,9
C20	0,3	0,5	0,1
n-9			
C18:1	18,9	35,0	9,5
n-7			
C16:1	0,8	0,2	0,3
C18:1n7	1,2	0,6	0,6
n-6			
C18:2 (LA)	51,2	8,1	11,4
C20:2	0,1	-	0,3
C20:3	-	-	0,1
C20:4 (AA)	0,3	-	0,4
C22:4	0,1	-	0,1
n-3			
C18:3 (ALA)	3,8	0,1	47,4
C20:5 (EPA)	1,1	-	7,4
C22:5 (DPA)	0,2	-	1,5
C22:6 (DHA)	1,8	-	15,0
Somme			
Saturés	20,4	56,0	6,0
Monoinsaturés (n-9 + n-7)	20,9	35,8	10,4
AGPI (n-6 + n-3)	58,6	8,2	83,6
AGPI n-6	51,7	8,1	12,3
AGPI n-3	6,9	0,1	71,3
AGPI-TLC n-3	3,1	0,0	23,9
Rapport			
AGPI/saturés	2,9	0,1	13,9
sn-6/sn-3	7,5	81,0	0,2
LA/ALA	13,5	81,0	0,2

Tableau 16: Composition en acides gras du régime et des suppléments lipidiques.

*Le Mix alpha 3® est protégé de la peroxydation à l'aide de 0,3% de vitamine E, 0,2% de krill (anti-oxydant extrait de la crevette) et est conservé au froid et à l'obscurité.

AGPI (n-3 et n-6): acides gras polyinsaturés (oméga 3 et oméga 6 respectivement); AGPI-TLC n-3: acides gras polyinsaturés à très longues chaînes oméga 3.

1.3. Suivi pondéral et analyses nutritionnelles

Tous les rats sont pesés une fois par semaine.

A mi-traitement, des relevées des consommations alimentaire et de boissons sont effectuées sur chaque cage, tous les 4 jours pendant 3 semaines consécutives. Ces mesures permettent de calculer la consommation journalière de croquettes (g/jour) et la consommation journalière de boisson (ml/jour) par rat. Pour les groupes éthanol, est également calculée la consommation journalière d'éthanol (g/jour avec densité $\rho_{\text{éthanol}} = 0,8$) pour chaque rat. Les apports énergétiques quotidiens (kcal/jour/rat) sont calculés à partir des valeurs énergétiques du régime A04 (4,15 kcal/g), de l'éthanol (7 kcal/g) et de la supplémentation lipidique (9 kcal/g).

Les apports alimentaires en acides gras sont calculés de la manière suivante :

- Apports lipidiques quotidiens (mg/jour) fournis par le régime A04 en sachant que la teneur lipidique du régime A04 est de 3%.

= consommation journalière de croquettes (g/jour) x 3% x 1000

- Apports quotidiens en acides gras (mg/jour) fournis par le régime A04

= apport lipidique quotidien x proportion de l'acide gras considéré (%)

Pour les rats SAT et OM3, s'ajoute également les acides gras provenant de la supplémentation lipidique. On aura donc:

- Apports quotidiens en acides gras (mg/jour) fournis par 600 mg de supplément lipidique

= 600 mg x proportion de l'acide gras considéré (%)

- Apports quotidiens en acides gras (mg/jour) fournis par le régime A04 et le supplément lipidique

= apports en acides gras fourni par le régime A04 + apports en acides gras fournis par le supplément.

II. Modèle *ex vivo* de cœur isolé perfusé par voie aortique

2.1. Anesthésie et prélèvement du cœur

Le rat est anesthésié par injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (40 mg/kg de poids corporel soit 100 μ L/100 g de poids corporel). Après l'anesthésie, l'animal reçoit une

injection d'héparine via une veine saphène (100 UI soit 0,1ml/rat) pour éviter la formation de caillots sanguins dans le réseau coronaire au cours du prélèvement du cœur. Après ouverture du thorax, le cœur est prélevé et immédiatement immergé dans du liquide de perfusion glacé (voir § 2.3. pour la composition du liquide de perfusion) pour stopper son activité contractile et préserver ses ressources énergétiques.

2.2. Technique de perfusion aortique

Cette technique de perfusion a été mise au point par Langendorff (1895) sur les cœurs de lapins, de chats et de chiens, sur la base des travaux de Hédon et Gilis (1892), puis a ensuite été adaptée et largement utilisée sur le cœur de rat.

Cette technique permet de réaliser 2 modes distincts de perfusion :

- **la perfusion à débit constant:** où le débit est imposé par une pompe péristaltique. Les résistances vasculaires vont alors déterminer la pression de perfusion
- **la perfusion à pression constante :** dans lequel le liquide de perfusion s'écoule par gravité depuis une colonne thermostatée dont le niveau est maintenu constant (1m au-dessus du cœur) par un système de vases de Mariotte. Dans ces conditions, les résistances vasculaires déterminent le débit de perfusion.

Pour notre part, le protocole expérimental sur cœurs isolés perfusés a été réalisé à partir d'un dispositif de perfusion à pression constante (figure 39).

Immédiatement après son prélèvement, le cœur est suspendu par l'artère aorte à une canule de perfusion métallique par laquelle arrive le liquide de perfusion oxygéné (O_2 : 95%, CO_2 : 5%) et thermostaté à 37°C. Une petite incision est réalisée au niveau de l'artère pulmonaire pour favoriser l'écoulement des effluents coronaires vers l'extérieur de l'organe.

2.3. Composition du liquide de perfusion du cœur

Le liquide de perfusion utilisé lors de nos expériences est dérivé de celui décrit initialement par Krebs et Henseleit (1932). La composition est la suivante (mM):

- NaCl	118,00
- $NaHCO_3$	25,00
- Glucose	11,10
- KCl	4,75
- $CaCl_2, 2H_2O$	1,36
- $MgSO_4, 7H_2O$	1,19
- KH_2PO_4	1,18

-Matériels et méthodes-

Le liquide de perfusion est préparé le jour de l'expérimentation, et filtré juste avant son utilisation (diamètre des pores= $0,8\mu\text{m}$), puis thermostaté à 37°C et saturé avec un mélange gazeux de type carbogène (O_2 95%, CO_2 5%) afin de maintenir un pH voisin de 7,4.

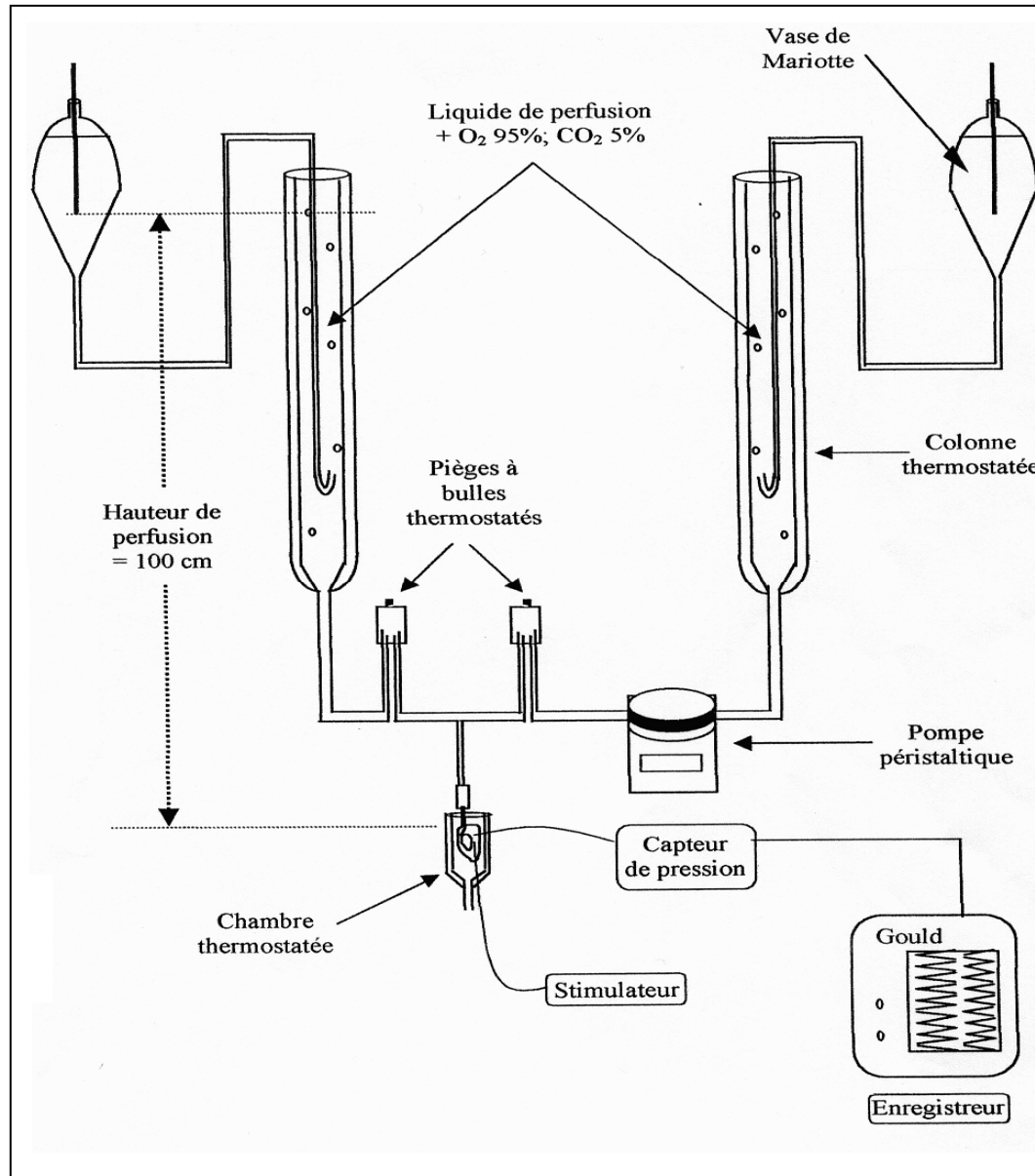


Figure 39: Dispositif de perfusion aortique à pression constante du cœur isolé de rat.

2.4 Stimulation électrique

Les principaux tissus nodaux sont détruits: l'oreillette droite est éliminée et une incision est réalisée au niveau du nœud auriculo-ventriculaire. Le cœur est ensuite stimulé électriquement par l'intermédiaire d'une paire d'électrodes, l'une fixée à la canule métallique, l'autre piquée au niveau du sillon auriculo-ventriculaire. Les stimulations sont délivrées à une fréquence

constante de 6 Hz (360 battements par minute), sous la forme de signaux carrés d'une durée de 0,5 ms et d'une amplitude de 1,5 V (stimulateur 6021 SR1 LDT, Edenbridge, Kent, Grande Bretagne).

2.5 Ballonnet intraventriculaire

Sur ce modèle de perfusion par voie aortique, le cœur n'exerce aucun travail mécanique externe mesurable. Aussi, pour avoir accès à un travail quantifiable, on introduit un ballonnet ultra-fin en plastique non compliant dans le ventricule gauche. Le ballonnet est gonflé avec de l'eau de telle sorte à imposer une pression diastolique de $4,0 \pm 0,5$ mmHg pour maintenir le volume de la cavité ventriculaire à une valeur constante. L'enregistrement des pressions ventriculaires s'effectue à l'aide d'un enregistreur (Power Lab, Macintosh, USA) et d'un capteur de pression (Statham P23ID, Gould Allco, Ballainvilliers, France) relié au ballonnet par un cathéter de polyéthylène rigide. Dans ces conditions, le cœur effectue un travail externe mesurable par un tracé de pression. Cependant, les contractions de la paroi du ventricule gauche contre le ballonnet se font sans modification du volume de la cavité, on parle alors de cœur « pseudo-travaillant », le travail mécanique n'étant pas le même que celui effectué dans les conditions physiologiques normales.

2.6 Evaluation des variables hémodynamiques

Le dispositif expérimental permet d'avoir accès à différentes variables représentatives de la fonction ventriculaire :

- le débit coronaire (DC), mesuré par prélèvement des effluents coronaires, est exprimé en mL/min.
- la fréquence cardiaque, enregistrée par l'intermédiaire du capteur de pression, est exprimée en battements/min.
- les pressions systolique (LVESP) et diastolique (LVEDP) du ventricule gauche sont enregistrées par l'intermédiaire du capteur de pression et sont exprimées en millimètres de mercure (mmHg). De ces 2 variables est déduite la pression développée du ventricule gauche (LVDP) en mmHg.
- les dérivées premières positive (+dP/dt) et négative (-dP/dt) du tracé de pression du ventricule gauche représentent respectivement un indice des cinétiques de contraction et de relaxation ventriculaire. Elles sont exprimées en mmHg/s.

2.7 Protocole d'ischémie/reperfusion

Le dispositif du cœur isolé permet de réaliser différents types d'ischémie:

- ischémie globale et normothermique : induite en stoppant l'arrivée du liquide de perfusion au cœur. Dans ces conditions, la circulation coronaire est totalement abolie et l'ischémie affecte alors l'ensemble de la masse myocardique. Pendant, l'ischémie globale, le cœur est immergé dans un faible volume de liquide de perfusion thermostaté à 37°C. La reperfusion est assurée en restaurant l'arrivée du liquide perfusion à la préparation.
- ischémie régionale : un fil de ligature est passé sous l'artère coronaire gauche, à l'aide d'une suture chirurgicale (aiguille courbe de 8 mm, montée sur un fil de soie tressée (5/0)). Les deux extrémités du fil sont introduites à travers un cathéter puis maintenues en tension avec un clamp placé juste au-dessus du cathéter. La zone alimentée par l'artère coronaire gauche devient ischémique tandis que le reste du myocarde reste normalement perfusé. A la fin de l'ischémie, le clamp est détaché et le cathéter retiré. Le cœur est alors à nouveau perfusé.

Pour notre part, nous avons utilisé un modèle expérimental d'ischémie régionale/reperfusion. Après 15 min de stabilisation en condition de perfusion standard (normoxie, perfusion avec solution Krebs-Henseleit, cathéter en position de relâche), le cœur est soumis à 30 min d'ischémie régionale suivie de 120 min de reperfusion. Pendant la totalité de ce protocole de perfusion, le cœur est placé dans une chambre thermostatée à 37°C. La fonction cardiaque est enregistrée après 15 min de stabilisation et pendant les 30 premières minutes de reperfusion pour suivre la récupération fonctionnelle post-ischémique du ventricule gauche. Au delà de 30 min de reperfusion, la fonction ventriculaire gauche est enregistrée pour veiller toute survenue d'arythmies qui pourraient être fatales pour le cœur (arrêt cardiaque suite à fibrillation ventriculaire par exemple).

A l'issue des 120 min de reperfusion, la ligature coronaire est de nouveau serrée, une solution de Bleu Evans est injectée dans la canule de perfusion pour distinguer le tissu non ischémié, coloré en bleu (zone normo-perfusée) du tissu ischémié, non coloré par le bleu Evans (zone à risque). Après coloration, le cœur est conservé à -20°C en attendant la mesure de la taille de l'infarctus.

III. Histologie et mesure de la taille de l'infarctus

3.1. Principe de la coloration histoenzymologique au TTC

La mesure de la taille de l'infarctus est réalisée à partir d'une coloration histoenzymologique au chlorhydrate de 2,3-triphényl-tétrazolium (TTC). Cette méthode permet de distinguer les 2 territoires constituant la zone à risque : le tissu ischemié non nécrosé et le tissu ischemié nécrosé (zone infarctie). Après une réaction d'oxydo-réduction entre les deshydrogénases du tissu viable et le TTC, le tissu viable apparaît coloré en rouge tandis que le tissu infarcté ne peut réduire ce sel et apparaît donc non coloré (blanc).

Sur chacune des coupes, il est donc possible de distinguer (figure 40): la zone normo-perfusée (colorée au bleu Evans), la zone à risque (rouge + blanc) constituée de la zone ischemique non nécrosée (rouge) et de la zone infarctie (en blanc).

3.2. Protocole de coloration

Les cœurs congelés sont découpés avec un scalpel multi-lames en 6 à 8 coupes transversales de 1 mm d'épaisseur. Les tranches de cœurs sont rincées au NaCl 0,9% puis incubées 20 min à 37°C dans du tampon TTC 1% (pds /v) préparé extemporanément dans un tampon phosphate (Na_2HPO_4 0,2 M; NaH_2PO_4 0,2 M; équilibré à pH 7,4 avec NaOH 6 N). Les coupes sont ensuite rincées au NaCl 0,9%, puis conservées 4 jours dans du formol 10% (pH 7,4).

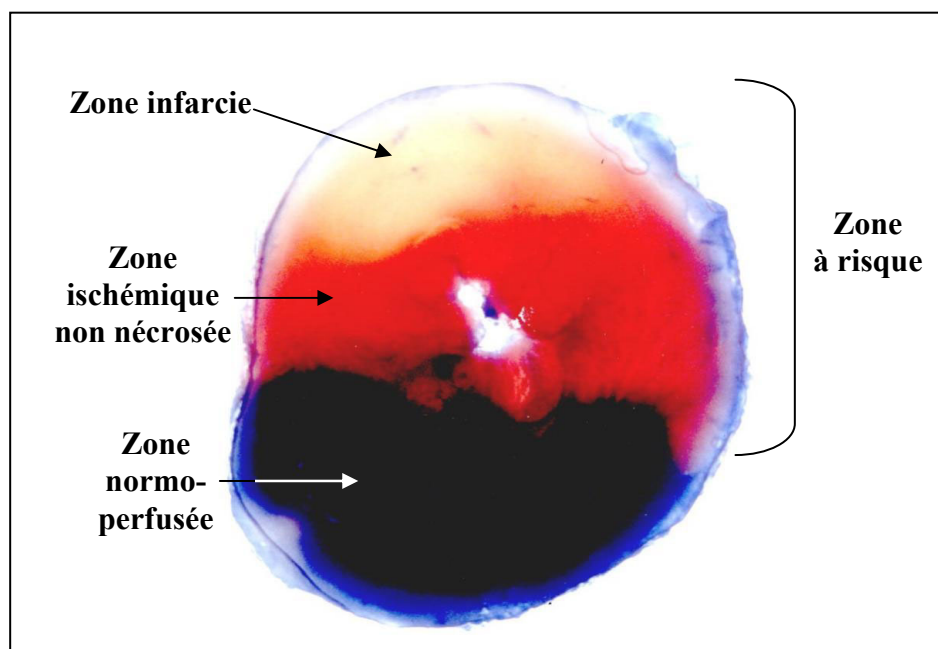


Figure 40: Exemple de coupe de cœur de rat après coloration histoenzymologique au TTC.

3.3. Analyse des coupes et expression des résultats

Les coupes sont pesées, numérisées (scanner Scan Wise, Kodak) et l'aire de chaque zone colorée est mesurée avec le logiciel image J 1.32j (programme d'imagerie en libre accès sur <http://rsb.info.nih.gov/ij>). Les volumes des zones normo-perfusée, à risque (ZR) et infarctie (ZI) sont calculées selon la formule : Σ (aire de la zone considérée x poids de la coupe). La ZR est exprimée en pourcentage de la masse ventriculaire totale (VT) et la ZI est exprimée en pourcentage de la ZR.

IV. Préparations biologiques

4.1. Prélèvement et préparation des échantillons sanguins

Le prélèvement sanguin est effectué le matin sur un rat anesthésié non hépariné (l'héparine augmente la quantité d'acides gras libres par activation des phospholipases).

Après excision du cœur (pour le protocole d'isolement des mitochondries), un prélèvement de sang est immédiatement effectué au niveau de la cage thoracique. Le sang, récolté sur tube EDTA, est mis à centrifuger 10 min à 1500g à 4°C. Le plasma est récupéré et aliquoté. Le culot de globules rouges est lavé 2 fois avec du sérum physiologique, centrifugé après chaque lavage à 1500g pendant 10 min à 4°C. Le culot d'érythrocytes est prélevé et aliquoté. Les échantillons de globules rouges et de plasma sont conservés à -80°C en vue de l'analyse des profils lipidiques et du dosage de l'alcoolémie.

4.2. Isolement des mitochondries cardiaques

Les mitochondries de cœur de rats sont isolées selon un principe similaire à celui décrit par Saks et collaborateurs (Saks *et al.*, 1985), basé sur la digestion enzymatique et les centrifugations différentielles.

Toutes les étapes de ce protocole sont réalisées à 4°C afin de garantir la qualité de la préparation. Egalement, deux cœurs de rats sont utilisés pour récolter un échantillon mitochondrial en quantité suffisante. Après anesthésie des 2 rats, les cœurs sont prélevés et placés dans une solution A (voir tableau 17 pour la composition des solutions). Les cœurs sont débarrassés des tissus conjonctif, graisseux, aortique et auriculaire, puis découpés en deux et rincés plusieurs fois dans le tampon A pour éviter une contamination de l'échantillon ventriculaire par des cellules de l'endothélium (cellules endothéliales, cellules musculaires lisses, fibroblastes), des cellules auriculaires, des globules rouges et autres cellules sanguines. Le tissu ventriculaire (environ 2 g) est déposé sur une coupelle, hâché très finement à l'aide

-Matériels et méthodes-

de ciseaux puis placé dans une solution de trypsine (tampon B). Après 30min de digestion enzymatique, la protéase est inactivée par l'addition d'inhibiteur de trypsine (tampon C). Le lysat ventriculaire est ensuite broyé dans un potter en verre avec un piston en téflon (clearance 0,7-0,8 mm) en effectuant 4-5 passages à 200 tours/min. L'homogénat est dilué avec du tampon D puis débarrassés des noyaux et des débris cellulaires par une centrifugation à 600g pendant 10 min. Le surnageant est centrifugé à 8000g pendant 15 min pour obtenir sédimenter les mitochondries.

Tampons	Composants	Concentrations	pH
A	Sucrose Hepes EDTA	0,3 M 10 mM 0,2 mM	pH 7,2 (KOH)
B	Tampon A trypsine	0,0125 % (pds/v)	pH 7,2 (KOH)
C	Tampon A BSA délipidée Inhibiteur trypsine	0,1 % (pds/v) 0,065 % (pds/v)	pH7,2 (KOH)
D	Tampon A BSA	0,1 % (pds/v)	pH 7,2 (KOH)
E	Sucrose Hepes EDTA BSA délipidée	0,3 M 10 mM 0,2 mM 0,1 % (pds/v)	pH 7,4 (KOH)
F	Sucrose Hepes EDTA BSA délipidée	0,25 M 10 mM 0,2mM 0,1 % (pds/v)	pH 7,4 (KOH)
G	Tris HCl	10mM	pH 7,4 (KOH)
Métrizamide 35%	Métrizamide Tampon F	35% (pds/v)	pH 7,4 (KOH)
Métrizamide 17%	Métrizamide 35% Tampon F	17% (pds/v)	pH 7,4 (KOH)
Percoll 6%	Percoll Tampon F	6% (v/v)	pH 7,4 (KOH)

Tableau 17 : Composition des tampons utilisés pour l'isolement des mitochondries.

-Matériels et méthodes-

Le culot brut de mitochondries est ensuite :

- soit lavé trois fois dans du tampon E, 10 min à 8000g. Un dosage de protéines (voir matériels et méthodes §V) est effectué sur le culot final. La concentration est ajustée à 20 mg/mL puis les mitochondries sont placées dans la glace en attente des tests oxygraphiques.
- soit lavé une fois dans du tampon E, 10 min à 8000g. Le culot est resuspendu dans du tampon F et les mitochondries sont déposées sur un gradient discontinu de Percoll 6%/métrizamide 17%/métrizamide 35% pour être purifiées (Storrie *et al.*, 1990). Après une centrifugation, 30 min à 50000g, la fraction mitochondriale est récupérée entre les couches métrizamide 35% et métrizamide 17% puis est lavée dans du tampon E, 10 min à 8000g. Après resuspension du culot dans 200 µl de tampon G, les mitochondries purifiées sont aliquotées et stockées à -80°C en vue des analyses du profil lipidique des membranes mitochondriales.

V. Dosage des protéines

Principe

Le dosage des protéines mitochondriales est réalisé à l'aide du kit de dosage Coomassie Protein Assay Reagent (Pierce, Rockford, Illinois, Etats Unis), une méthode dérivée de la méthode de Bradford (Bradford, 1976), permettant de quantifier les protéines totales d'un échantillon. Le principe est basé sur une réaction colorée réalisée en milieu acide et produite par la liaison du réactif bleu de Coomassie aux protéines. Cette réaction colorée se traduit par le passage du brun au bleu avec un changement du maximum d'absorption de 465 nm à 595 nm.

Protocole

Une gamme étalon de sérum albumine bovine (BSA) de 0,03 à 1 g/l est préparée puis 10 µl de chacune des concentrations étalons: 0,03; 0,06; 0,12; 0,25; 0,5 et 1 g/l, sont déposés en triplicat sur une micro-plaque. Après l'addition de 200 µl de réactif, la plaque est agitée quelques instants avant de mesurer la DO à 595 nm.

L'échantillon mitochondrial à doser est dilué au 1/50, 1/100 et 1/200 ème puis le protocole appliqué est identique à celui décrit pour la gamme étalon.

La concentration protéique de l'échantillon est ensuite déterminée en reportant la densité optique de l'échantillon sur la courbe étalon $f(\text{Abs}_{595}) = \text{concentration BSA}$.

VI. Analyses lipidiques

6.1. Principe de la chromatographie en phase gazeuse

L'analyse de la composition en acides gras du plasma, des globules rouges et des phospholipides mitochondriaux cardiaques est effectuée par chromatographie en phase gazeuse (CPG).

a) Fonctionnement du chromatographe

Le chromatographe en phase gazeuse utilisé pour le dosage des acides gras est de type HP 5890A. Comme l'indique la figure 41, cet appareil est constitué d'un détecteur électronique à ionisation de flamme relié à un potentiomètre enregistreur et d'une colonne (colonne ALLTECH, phase AT-WAX: longueur = 30 m, diamètre intérieur = 0,25 μm , épaisseur du film = 0,25 μm). La colonne est un tube rempli de grains poreux en résine très polaire (75% cyano- propylphényldiéthylsiloxane) constituant la phase stationnaire chargée de retenir plus ou moins les espèces à doser en fonction de leur taille et de leur charge électrique.

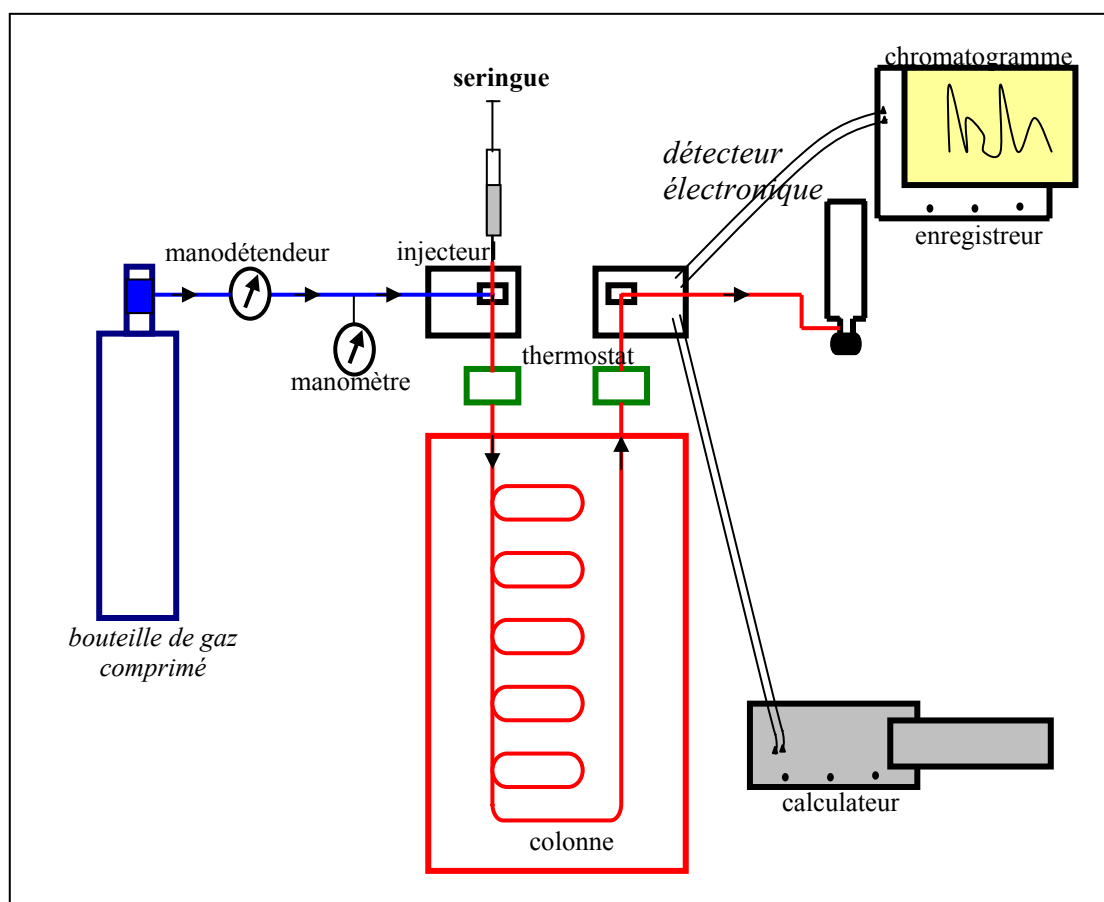


Figure 41: Représentation schématique d'un chromatographe en phase gazeuse.

b) Principe de la CPG

La réalisation de la CPG se décompose en 3 étapes:

- Extraction des lipides totaux

Les lipides totaux sont extraits en présence d'un standard interne : l'acide heptadecaénoïque C17:0 (acide gras n'existant pas à l'état naturel) par un mélange de solvant de faible toxicité: l'hexane/isopropanol (Hara *et al.*, 1978), utilisé en système monophasique pour éviter une perte des phospholipides les plus acides de la phase aqueuse (Koloravoric *et al.*, 1986).

- Saponification des lipides et méthylation des acides gras

Après évaporation à sec sous azote de l'extrait lipidique, les lipides sont saponifiés avec de la soude méthanolique. Les acides gras libres obtenus sont ensuite méthylés avec du trifluorure de bore méthanol (Rockerbie *et al.*, 1979).

- Extraction des acides gras méthylés et CPG

Les acides gras méthylés sont extraits avec de l'heptane, repris par un faible volume d'hexane puis injecté dans le chromatographe en phase gazeuse.

Les pics sont identifiés et quantifiés à l'aide d'un mélange étalon et d'un standard interne soigneusement calibrés et traités dans des conditions similaires à l'échantillon.

6.2. Analyse de la composition en acides gras du plasma et des globules rouges

L'analyse du profil lipidique sanguin fournit d'importantes informations sur la prise diététique. Le profil des acides gras plasmatiques (acides gras libres + acides gras estérifiés sous forme de triglycérides, cholestérol estérifié et phospholipides) est un indicateur très efficace du statut des acides gras essentiels (Siguel *et al.*, 1973) et de leur métabolisme (Lepage *et al.*, 1989). Quant au profil des acides gras des globules rouges, il est un indice de la composition lipidique des membranes cellulaires.

a) Réactifs

- acides gras étalons (tableau 18)
- standard interne : acide heptadécanoïque (100 µg/ml d'heptane)
- sérum physiologique
- solvants d'extraction: mélange hexane/isopropanol en proportion 3:2 (v/v)
- soude méthanolique 0,5 M (1 g soude/50 ml de méthanol)
- trifluorure de bore méthanol à 14%

-Matériels et méthodes-

- NaCl saturé 5,65 M (33 g soude/100 ml d'eau distillée)
- heptane
- hexane

Acides gras étalons	Nomenclature	Concentration finale (µg/ml heptane)
C14:0	ac. Myristique	10
C16:0	ac. Palmitique	50
C16:1n-7 cis	ac Palmitoléique	10
C18:0	ac. Stéarique	10
C18:1n-9 cis	ac. Oléique	50
C18:1n-7	ac cis vaccénique	10
C18:2n-6 cis	ac. Linoléique	40
C18:3n-6 cis	ac. gamma linoléinique	10
C18:3n-3	ac. Linoléinique	20
C20:0	ac. Arachidique	10
C20:2n-6	ac. Eicosadiénoïque	10
C20:3n-9	ac. Eicosatriénoïque n-9	10
C20:3n-6	ac. Gamma homo linoléinique	10
C20:4n-6	ac. Arachidonique	10
C20:5n-3	ac. Eicosapentaénoïque	10
C22:4n-6	ac. Docosatétraénoïque	10
C22:5n-3	ac. Docosapentaénoïque	10
C22:6n-3	ac. Docosahexaénoïque	10

Tableau 18 : Composition en acides gras du mélange étalon.

b) Protocole d'analyse du mélange échantillon

- Extraction des lipides totaux

Après séchage sous azote d'un tube contenant 200 µl de standard interne, on dépose 150 µl de plasma ou 400 µl de globules rouges. Le volume est complété à 500 µl avec du sérum physiologique, 8 ml d'hexane/isopropanol sont ajoutés. Après vortexation et agitation rotative (30 min), le tube est centrifugé (3000g, 10 min à 4°C). La phase supérieure (7 ml) est prélevée et évaporée sous azote. La phase restante est rincée avec 4 ml d'hexane/isopropanol, le tube est vortexé, placé 15 min sous agitation rotative et centrifugé (3000g, 10 min à 4°C). La phase supérieure (4 ml) est prélevée, ajoutée à la fraction précédente puis évaporée sous azote.

- Saponification des lipides totaux, méthylation des acides gras

Après addition de 1 ml de soude méthanolique sur l'extrait sec précédemment obtenu, le tube est vortexé et placé à l'étuve à 100°C pendant 10 min. La méthylation est réalisée par addition

-Matériels et méthodes-

de 700 µl de trifluorure bore méthanol à 14%, le tube est vortexé puis chauffé 10 min à 100°C.

- Extraction des acides gras méthylés et CPG

Les acides gras méthylés sont extraits avec 2 ml de NaCl (rétention des sels au fond du tube) et 5 ml d'heptane (récupération des lipides dans la phase supérieure). Le tube est vortexé, placé sous agitation rotative 15 min et centrifugé à 3000g, 10min à 4°C. La phase supérieure (4 ml) est récupérée et mise à évaporer sous azote. L'extrait sec d'acides gras méthylés est repris par un volume de 250 à 300 µl d'hexane puis 1 µl est injecté dans la colonne.

Pour faciliter une meilleure séparation des solutés, la température initiale du four du chromatogramme est de 50°C puis augmente suivant 3 paliers :

1°) 50°C/min jusqu'à 140°C

2°) 1,4°C/min jusqu'à 165°C

3°) 4°C/min jusqu'à une température maximale de 250°C maintenue pendant 15 minutes.

c) Protocole d'analyse du mélange étalon

- Méthylation des acides gras

Après séchage sous azote d'un tube contenant 200 µl de standard interne et 500 µl du mélange étalon, on ajoute 200 µl de trifluorure de bore méthanol à 14%. Le tube est placé à l'étuve à 100°C pendant 10 min.

- Extraction des acides gras méthylés et CPG

Les acides gras méthylés sont extraits avec 1 ml d'eau distillée et 2 ml d'heptane. Après agitation au vortex puis sur agitateur rotatif pendant 10 min, l'échantillon est centrifugé à 3000g, 10 min à 4°C. La phase supérieure (1,6 ml) est récupérée et évaporée à sec sous azote. Les acides gras méthylés sont repris dans un volume de 200 µl d'hexane et 1 µl de ce mélange est injecté dans la colonne. La programmation de la température du four est la même que pour l'échantillon.

- Identification des pics

Après calibrage de la colonne avec le mélange étalon, les pics échantillons sont identifiés à l'aide des temps de rétention du standard interne et des acide gras étalons. Plus précisément, les temps de rétention des pics échantillons sont corrigés par une valeur égale à la différence entre le temps de rétention du standard interne contenu dans l'échantillon et celui du mélange

-Matériels et méthodes-

étalon. Ainsi, un pic échantillon avec un temps de rétention proche du temps de rétention d'un acide gras étalon λ , sera identifié comme l'acide gras λ .

- Expression des résultats

Le chromatogramme affiche l'aire de chaque pic. A partir de ces données, chaque espèce d'acide gras est exprimé en pourcentage des acides gras totaux selon la formule :

$$\text{acide gras } \lambda \text{ (\%)} = \left[\frac{\text{aire du pic de l'acide gras } \lambda}{\text{somme de l'aire de tous les pics d'acides gras}} \right] \times 100$$

6.3. Analyse de la composition en acides gras des phospholipides mitochondriaux

Pour ce présent travail, le profil en acides gras des membranes mitochondriales cardiaques a été évalué à partir des 3 phospholipides prépondérants de la mitochondrie : la phosphatidylcholine, la phosphatidyléthanolamine et la cardiolipine.

L'analyse de la composition en acides gras des phospholipides membranaires de la mitochondrie se fait en 2 étapes :

- séparation des phospholipides membranaires par chromatographie sur couche mince
- analyse de la composition en acides des phospholipides par CPG

6.3.1. Séparation des différents phospholipides

a) Principe

Après extraction et évaporation sous azote de l'extrait lipidique mitochondrial, l'échantillon est repris par un mélange de solvant chloroforme/méthanol puis est déposé sur une plaque en gel de silice. Les phospholipides sont séparés par un mélange de solvant polaire : chloroforme/méthanol/eau. Les spots de phospholipides sont révélés à l'aide d'une solution de rhodamine B et d'une solution iodée (Comte *et al.*, 1971 ; Randerath, 1971.). Les phospholipides d'intérêt sont ensuite récupérés en vue de la CPG.

b) Réactifs

- sérum physiologique
- solvants d'extraction: mélange hexane/isopropanol en proportion 3:2 (v/v)
- mélange chloroforme/méthanol en proportion 2:1 (v/v)
- solvants de migration: chloroforme/méthanol/eau en proportion 65:25:4 (v/v)

-Matériels et méthodes-

- rhodamine B 0,005% (pds/v) dans l'eau distillée
- solution d'iode 1,25% (pds/v) dans le méthanol
- standard interne: solution d'acide heptadécanoïque à 100 µg/ml d'heptane
- mélanges de phospholipides étalons préparés à 1mg/ml dans du chloroforme/méthanol:

c) Protocole

- Extraction des lipides totaux

Dans un tube en verre, on dépose 100 µl de suspension mitochondriale, 400µl de sérum physiologique et 8 ml d'hexane/isopropanol. Ensuite, le protocole d'extraction des lipides totaux est identique à celui décrit à la section 1°, §6.2. A la fin de l'extraction, l'extrait sec est lavé avec 3 ml de chloroforme/méthanol. Après une centrifugation à 3000g pendant 10 min à 4°C, la phase supérieure (2,5 ml) est prélevée, mise à évaporer sous azote.

- Préparation de la cuve de chromatographie

Un volume de 150 ml de solvant de migration est déposé au fond de la cuve dans laquelle un papier filtre est laissé saturé au moins 1 heure pour obtenir une atmosphère homogène et donc une migration homogène de tous les dépôts.

- Préparation de la plaque de chromatographie ou activation de la plaque

La plaque de chromatographie en gel de silice (Merckeurolab, Fontenay sous bois, France) est activée par chauffage à l'étuve à 100°C pendant 20 min.

- Dépôt

L'extrait sec mitochondrial est rincé avec 500 µl de chloroforme/méthanol. Après évaporation, l'échantillon et les 4 mélanges étalons sont repris par 100 µl de chloroforme/méthanol et déposés sur la plaque (échantillon= 40µl et étalons= 20 µl) .

- Migration

La plaque est déposée dans la cuve de migration. Lorsque le solvant arrive à 0,5 cm du bord supérieur de la plaque, la migration des phospholipides est terminée.

- Révélation et identification des spots d'intérêts

Une solution de rhodamine B à 0,005% est vaporisée sur la plaque et fait apparaître les spots colorés suivants :

-Matériels et méthodes-

- en violet : cardiolipine (CL), phosphatidyléthanolamine (PE), phosphatidylinositol (PI), phosphatidylsérine (PS)
- en orange-rose : L- α lysophosphatidylcholine (LPC), phosphatidylcholine (PC), sphongomyéline (SM)
- en rose : phosphatidylsérine (PS)

La vaporisation d'une solution iodée 1,25% colore en brun les substances insaturées, les esters d'acides gras et les lipides azotés. Les phospholipides quantitativement plus important absorberont d'avantage l'iode et apparaissent de manière plus intense.

- Récupération des spots

Le spot d'intérêt est soigneusement délimité avec un scalpel, gratté avec une spatule puis la poudre de silice est récupérée dans un tube en verre. Après addition de 4 ml de chloroforme/méthanol, le tube est vortexé et centrifugé à 3000g pendant 10 min à 4°C.

Le solvant est transvasé dans un tube contenant 200 μ l de standard interne C17:0 et mis à évaporer en vue de la CPG.

6.3.2. Analyse de la composition en acide gras des phospholipides

Les étapes de saponification des phospholipides, méthylation des acides gras et extraction des acides gras méthylés sont similaires à celles décrites aux sections 1°, 2°, 3°, § 6.2. Avant injection, l'extrait sec d'acides gras méthylés est repris entre 50 et 150 μ l d'hexane. La programmation du chromatographe est identique à celle décrite à la section § 6.2.

6.4. Analyse quantitative des phospholipides mitochondriaux

a) Principe

Le système CCM-DIF Iatroscan (Iatron laboratory, Tokyo, Japon) est une technique associant la Chromatographie sur Couche Mince à un Détecteur à Ionisation de Flamme et permet de réaliser des analyses quantitatives sur des mélanges complexes de lipides (Hiramatsu *et al.*, 1980; Kaimal *et al.*, 1984; Rao *et al.* 1985) La réalisation de la technique Iatroscan se décompose en plusieurs étapes : extraction des lipides, dilution dans un mélange de chloroforme/méthanol, dépôt sur rods (fines baguettes de quartz imprégnées de gel de silice Chromarod S-III, Iatron laboratory, Tokyo, Japon). Après migration dans des solvants appropriés, les substances déposées sur rods sont brûlées dans le DIF (figure 42). Tout composé détecté après brûlage est représenté par un pic d'une surface d'autant plus grande

-Matériels et méthodes-

que le composé est abondant. Le temps de rétention permet d'identifier chaque pic du mélange. Une courbe étalon permet ensuite de quantifier chaque composé.

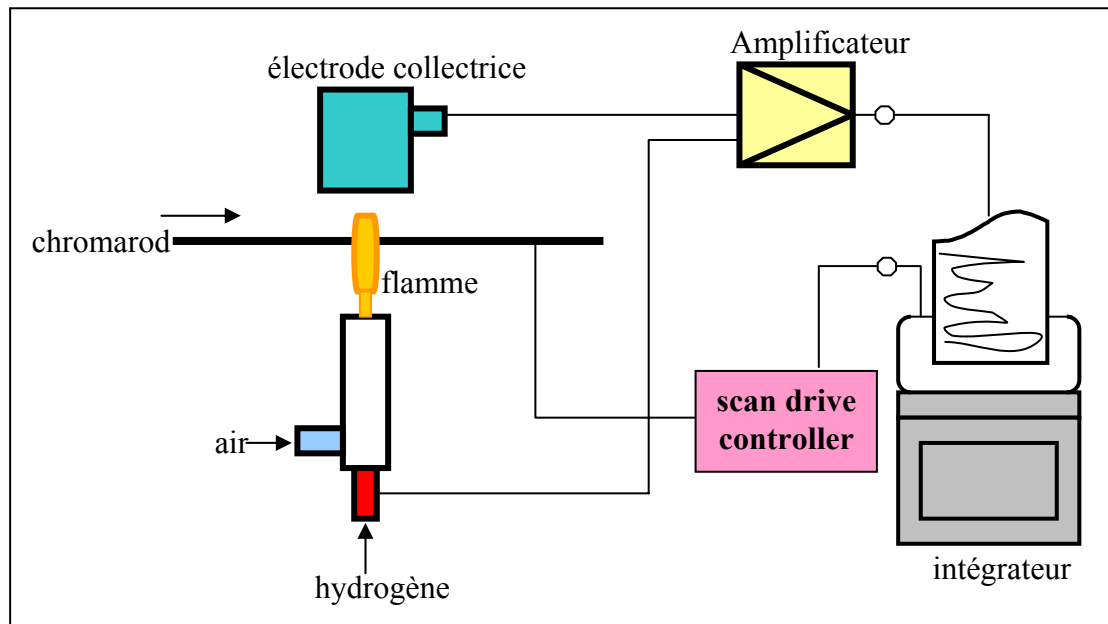


Figure 42: Représentation schématique du détecteur à ionisation de flamme.

b) Réactifs

- sérum physiologique
- solvants d'extraction: mélange hexane/isopropanol en proportion 3:2 (v/v)
- mélange chloroforme/méthanol en proportion 2:1 (v/v)
- standard interne : cholestérol acétate
- NaCl saturé 33% (pds/v) dans l'eau distillée
- solvants de migration pour lipides neutres : mélange hexane/éther éthylique/acide formique en proportion 175:24:0,4 (v/v)
- solvants de migration pour phospholipides : mélange chloroforme/méthanol/eau/acide formique en proportion 160:80:8:1 (v/v)
- chlorure de sodium saturé 5,65M (33g soude/100 ml d'eau distillée)
- standard interne: cholestérol acétate (1mg/ml d'heptane)
- mélange de phospholipides étalons CL, LPC, PC, PE, PI, PS et SM (concentrations croissantes de 0,25 à 2 mg/ml dans le chloroforme/méthanol)

c) Protocole

Extraction des lipides totaux

La méthode est identique à celle décrite à la section 1°, § 6.3.1 sauf que le standard interne est du cholestérol acétate.

Préparation des cuves

- cuve à conditionnement de rods : un volume de 150 ml de NaCl saturé (33%) et un papier de saturation sont déposés dans la cuve pour assurer un taux d'humidité constant sur les rods.
- cuve à lipides neutres et cuve à phospholipides: système de double cuve, une petite cuve placée dans une grande cuve, contenant respectivement 90 et 100 ml de solvant de migration approprié (voir réactif ci-dessus). La grande cuve est garnie par du papier de saturation sur 3 côtés. Un quatrième papier de saturation est placé dans la grande cuve avant d'être suspendu dans la petite cuve 15 min avant la migration. Ce procédé permet ainsi une bonne saturation du solvant dans la petite cuve et une meilleure reproductibilité de la migration.

Dépôt des échantillons

Avant dépôt, les rods sont brûlés au Iatroscan 1 à 2 fois pour s'assurer de leur propreté. L'extrait lipidique est repris par 200 µl de chloroforme/méthanol puis déposé sur rods.

Migration des lipides neutres

Les rods sont placés dans la cuve à conditionnement pendant 10 in avant d'être placés dans la petite cuve à lipides neutres pendant 30 min, à 20°C. Après 5 min de séchage à 100°C, les rods sont placés dans le Iatroscan pour être brûlés. Au terme de cette migration, on obtient le temps de rétention du standard interne.

Migration des phospholipides

Après le brûlage des lipides neutres, les rods sont introduits dans la petite cuve à phospholipides. Après 45 min de migration, les rods sont séchés 5 min à 100°C et brûlés au Iatroscan. Après cette deuxième migration, les différentes espèces de phospholipides sont séparées suivant leur hydrophobicité. Les plus polaires étant ceux qui migrent le plus loin.
POLARITE : LPC > SM > PC > PI > PS > PE > CL

Etalonnage

Chaque concentration du mélange étalon (0,25 à 2,00 mg/ml) est mélangée au standard interne (1 mg/ml) et traitée dans des conditions similaires à celles de l'échantillon. Une

-Matériels et méthodes-

courbe étalon est ensuite établie à partir des chromatogrammes du standard interne et du lipide étalon correspondant. L'axe des ordonnées représente le rapport de surfaces des pics (surface du pic lipide étalon/surface du pic standard interne) et l'axe des abscisses représente le rapport des concentrations (concentration lipide étalon/concentration standard interne).

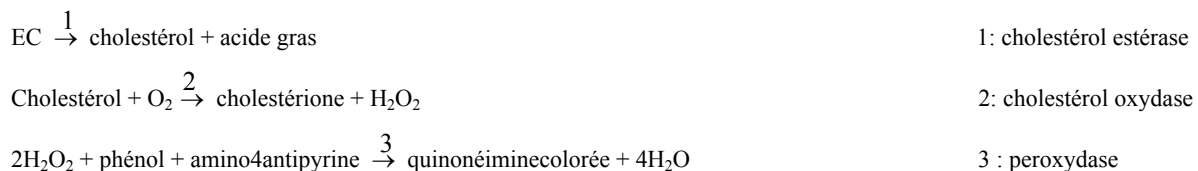
Quantification des phospholipides

Pour chaque pic identifié comme phospholipide mitochondrial, un rapport de surface (surface du pic phospholipide mitochondrial/surface du pic standard interne) est calculé puis cette valeur est reportée sur une courbe étalon afin de déterminer la concentration du phospholipide mitochondrial. Les résultats sont exprimés en µg/mg de protéines (dosage effectué avant extraction lipidique et selon méthode décrite en section V) et en % des phospholipides totaux.

6.5. Dosages des lipides sanguins

6.5.1. Cholestérol total

Le dosage du cholestérol total (cholestérol libre + cholestérol estérifié) est réalisé à l'aide du kit cholestérol PAP 500 (Bio Mérieux, Marcy l'étoile, France) basé sur la méthode enzymatique suivante (Richmond *et al.*, 1973; Allain *et al.*, 1974) :



Le réactif 1 (peroxydase 100 U/I, cholestérol oxydase 200 U/I, cholestérol estérase 125 U/I, amino4antipyrine 0,5 mM) est mélangé avec le réactif 2 (tampon MPOS 50 mM, phénol 15 mM, cholate de sodium 3,74 mM). On ajoute 10 µl d'échantillon avec 1 ml du mélange réactif 1-réactif 2. Après une incubation de 10 min à température ambiante, la DO est mesurée à 500 nm. Le sérum étalon est traité dans des conditions similaires à l'échantillon. A partir de ces résultats, on calcule la concentration en CT selon la formule :

$$[\text{CT échantillon}] = (\text{DO échantillon} / \text{DO étalon}) \times [\text{étalon}]$$

6.5.2. HDL-cholestérol

Le dosage du HDL-cholestérol est réalisé à l'aide du kit de dosage HDL cholestérol direct (Bio Mérieux, Marcy l'étoile, France). Le principe est basé sur l'adsorption de toutes les

-Matériels et méthodes-

lipoprotéines (sauf HDL-cholestérol) par les polyanions synthétiques présents dans le premier réactif, transformant ainsi ces lipoprotéines en une forme stable. Quant aux particules HDL libres, elles sont solubilisées par le détergent du premier réactif, ce qui permet au cholestérol provenant de la fraction HDL d'être dosé par voies enzymatiques en présence de cholestérol oxydase et cholestérol estérase.

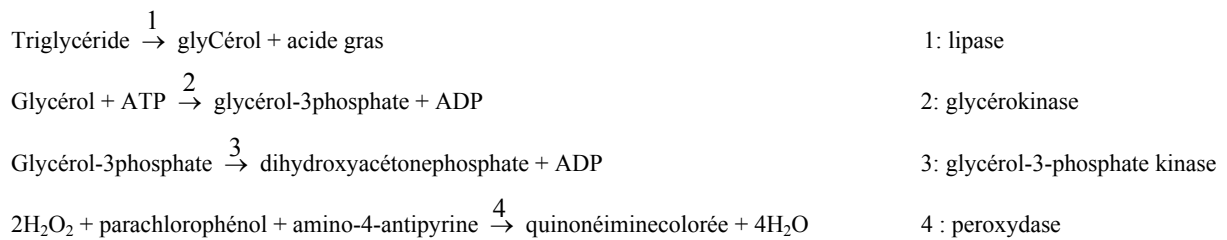
Le protocole est similaire à celui décrit en 6.4.2., à l'exception des réactifs.

- réactif 1: polyanion, 4-amino-antipyrine 0,67 mM, tampon MES, conservateur

- réactif 2: cholestérol oxydase 1,6 UI/ml, cholestérol estérase 1,25 UI/ml, peroxydase, détergent, sulfutyl toluidine 1mM, tampon MES, conservateur.

6.5.3. Triglycérides

Le dosage des triglycérides est réalisé à l'aide du kit tryglycéride enzymatique PAP 1000 (Bio Mérieux, Marcy l'étoile, France) basé sur la méthode enzymatique suivante (Fossati *et al.*, 1982) :



Le protocole est similaire à celui décrit en 6.4.2., à l'exception des réactifs :

- réactif 1: tampon TRIS pH 7,6 100 mM, parachlorophénol 2,7 mM, magnésium 4 mM

- réactif 2: lipase 1000 UI, glycérokinase 200 UI, glycérol-3phosphate oxydase 2000 UI, peroxydase 200 UI, ATP 0,8 mM.

VII. Analyse de la fonction mitochondriale

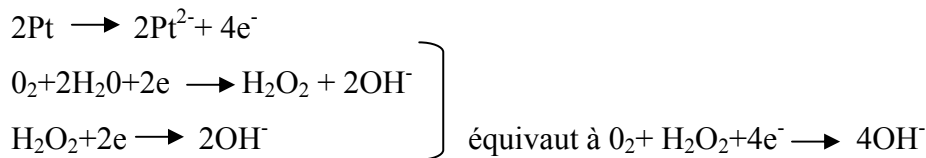
7.1. Principe du polarographe

Le polarographe à oxygène ou oxygraphe permet la mesure à tout moment de la concentration en oxygène d'un milieu liquide. L'oxygraphe (oxygraphe Hansatech instruments LTD, Kings Lynn, England) est constitué d'une cathode de platine polarisée entre 0,6 et 0,8 volts et d'une anode d'argent (recouverte par une couche de chlorure d'argent), immergées dans une solution en KCl et séparées de la cellule de mesure par une membrane de téflon (12,5µm) perméable à

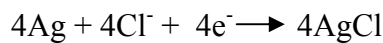
l'oxygène. Toute variation de concentration en oxygène dans la solution produira une variation d'intensité du courant mesurable à l'aide d'un enregistreur (table traçante Servotrace Sefram Paris, France).

Dans la pratique, l'électrode de mesure est polarisée et la tension de polarisation est maintenue constante à 0,6-0,8 V tout au long de l'expérimentation.

Lorsque la différence de potentiel est appliquée, l'oxygène diffuse à travers la membrane et est réduit sur la cathode selon la réaction :



L'argent est oxydé sur l'anode selon la réaction suivante :



Pour une valeur donnée de tension, la relation entre le courant produit (i) et la concentration en oxygène de la solution est linéaire selon la relation $i = k(\text{O}_2)$.

La valeur 0% est réglée en privant la solution d'oxygène avec du dithionite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$). La valeur 100 % (quantité maximale d'oxygène dissous) est obtenue dans le tampon utilisé pour la respiration et équilibré avec l'air à la température de l'expérience.

L'agitation constante du milieu assure une distribution homogène de l'oxygène dans la chambre.

7.2. Cinétiques de la respiration

Un tracé d'oxygraphie se décompose en plusieurs pentes successives, chacune décrivant un phénomène particulier de la respiration appelé stade respiratoire. Chance et Williams (Chance *et al.*, 1956) ont proposé une nomenclature des stades de respiration (figure 43):

- stade 1 : dépôt des mitochondries
- stade 2 : addition des substrats respiratoires. Activation de la respiration initiale
- stade 3 : addition d'ADP. Stimulation de la respiration.
- stade 4 : ADP totalement phosphorylé en ATP. Retour de la respiration au stade initial.
- stade 5 : anoxie. Tout l'oxygène est consommé.

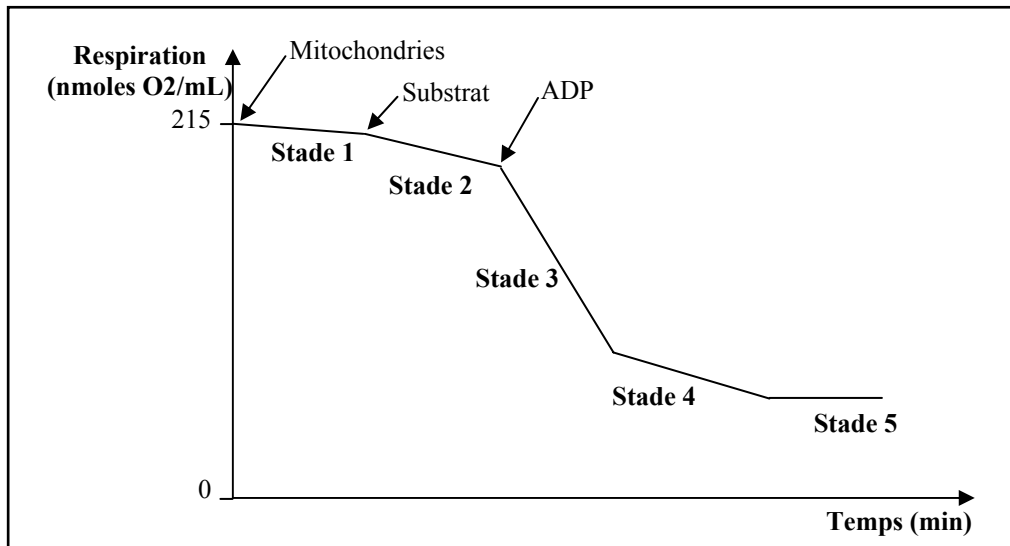


Figure 43: Représentation schématique des stades respiratoires.

Les augmentations de consommations d'oxygène en fonction de concentrations croissantes en ADP répondent à une relation de type Michaëlienne :

$$V = \frac{[ADP] \cdot V_{max}}{K_m + [ADP]}$$

- **V_{max}** ou vitesse maximale de respiration est la valeur vers laquelle tend la vitesse de la respiration activée par l'ADP.
- **K_m** ou constante de Michaelis-Menten est la concentration en ADP pour laquelle la vitesse de consommation d'oxygène est égale à la moitié de la V_{max} (≈ constante de dissociation).

L'addition d'ATP exogène peut également stimuler la respiration. La réaction est également de type michaëlienne:

$$V = \frac{[ATP] \cdot V_{max}}{K_m + [ATP]}$$

- **V_{max}** ou vitesse maximale de respiration est la valeur vers laquelle tend la vitesse de la respiration activée par l'ATP.
- **K_m** ou constante de Michaelis-Menten est la concentration en ATP pour laquelle la vitesse de consommation d'oxygène est égale à la moitié de la V_{max} (≈ constante de dissociation)

Il existe une relation linéaire entre la VO₂ et l'[ATP] qui peut-être démontrée par une représentation en double inverse, appelée la représentation de Lineweaver et Burk :

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[ATP]} + \frac{1}{V_{max}}$$

- La droite 1/V en fonction de 1/[ATP] obtenue par cette relation coupe :
- l'axe des ordonnées à la valeur 1/V_{max}
 - des abscisses à la valeur -1/K_m

7.3. Principes et réalisations des tests oxygraphiques

Tous les tests oxygraphiques sont réalisés à 25°C dans une chambre de respiration contenant 0,9 ml de solution de respiration (tableau 19) et 0,1 ml de BSA délipidée 0,2% (pds/v). Le début du test est toujours marqué par l'addition de la suspension mitochondriale (0,2 mg/ml) puis des substrats malate (2 mM) et glutamate (5 mM).

Solutions de respiration	Composants	Concentrations	PH
Standard	Sucrose	0,25 M	PH 7,4
	Hepes	10 mM	
	MgCl ₂	4 mM	
	KH ₂ PO ₄	3 mM	
	EGTA	0,5 mM	
	<i>DTT</i>	0,5 mM	
KCl	KCl	125 mM	PH7,4
	Hepes	10 mM	
	MgCl ₂	4 mM	
	KH ₂ PO ₄	3 mM	
	EGTA	0,5 mM	
	<i>DTT</i>	0,3 mM	

Tableau 19: Compositions des milieux de respiration.

Test du contrôle respiratoire ou test d'intégrité de la membrane mitochondriale interne

Les mitochondries sont déposées dans une solution de respiration standard. La respiration est stimulée par addition d'ADP 0,3 mM. Le calcul de l'indice du contrôle respiratoire et du rapport ADP/O permettent ensuite d'évaluer la qualité de la préparation mitochondriale fraîchement isolée.

Test cytochrome c ou test d'intégrité de la membrane mitochondriale externe

Le test consiste à sensibiliser osmotiquement les mitochondries par une concentration élevée de KCl (125 mM) dans le milieu de respiration (Stoner et Sirak, 1969). Le choc osmotique induit par le KCl induit le détachement du cytochrome c, un constituant important de la chaîne respiratoire et qui est fixé de façon labile à la face externe de la membrane interne.

-Si la membrane externe est rompue, le cytochrome c quitte l'espace intermembranaire et la chaîne de transport des électrons s'interrompt. L'addition en excès de cytochrome c permet de rétablir la fonction de la chaîne respiratoire et la consommation d'oxygène s'accélère.

-Si la membrane externe est intacte, le cytochrome c reste dans l'espace intermembranaire, le transport des électrons n'est pas perturbé et l'addition en excès de cytochrome c n'a aucun effet sur la vitesse de respiration (Saks *et al.*, 1993).

-Matériels et méthodes-

Expérimentalement, les mitochondries sont déposées dans une solution de KCl. La respiration est stimulée par de l'ADP (concentration saturante 2 mM). L'état de la membrane externe est ensuite évalué par addition de cytochrome c (8 µM).

Test du couplage fonctionnel

Les mitochondries sont déposées dans un milieu de respiration standard. La respiration est stimulée par des concentrations croissantes d'ATP : 0,10; 0,25; 0,50 et 1,00 mM (les concentrations des solutions mères en ATP sont vérifiées spectrophotométriquement à la fin de l'expérimentation), en présence ou en absence de créatine (20 mM).

Ce protocole favorise donc la réaction $ATP + \text{créatine} \longrightarrow ADP + \text{phosphocréatine (PCr)}$ et permet d'étudier:

- ***le couplage fonctionnel entre l'activité de la Ckmit et la phosphorylation oxydative***

Au cours de la phosphorylation oxydative, l'ATP généré par la respiration est transféré à la créatine qui assure ainsi une régénération local, rapide et continu de l'ADP. Par ce fait, la Ckmit contrôle l'efficacité de la respiration et donc de la synthèse d'ATP. (Jacobus et Lehninger, 1973).

- ***le couplage entre Ckmit et ANT***

L'interaction ANT-Ckmit crée un microcompartiment au niveau de la membrane mitochondriale interne. Ainsi, l'ATP nouvellement synthétisé par la MgATP synthase est directement canalisé par ANT pour être dirigé préférentiellement vers le site actif de la Ckmit. En échange de l'ATP, la Ckmit fournit de l'ADP directement à ANT. L'ADP est alors canalisé vers la matrice mitochondriale pour stimuler la respiration et donc la synthèse d'ATP. La Ckmit contrôle ainsi directement la production mitochondriale d'énergie (Wallimann *et al.*, 1992; Saks *et al.* 1994).

La combinaison de ces 2 couplages permet de maintenir une stabilité métabolique pour le cœur selon un mode économique assuré par la régénération continue des phosphonucléotides.

7.4. Calculs et détermination des paramètres cinétiques:

Les calculs sont réalisés à partir des tracés oxygraphiques. Pour cela, il est nécessaire de disposer des informations suivantes (figure 44) :

- solubilité de l'oxygène (quantité maximale d'O₂ dissous): 215 nmoles O₂/ml
- décalage entre les repères 0 et 215 nmoles (0 et 100% d'oxygène): 24 cm
- nombre de nmoles d'O₂/mm = 215/240

-Matériels et méthodes-

- concentration mitochondriale: 0,2 mg/ml
- volume de la chambre de respiration: 1 ml
- vitesse de déroulement du papier: 1 cm/min

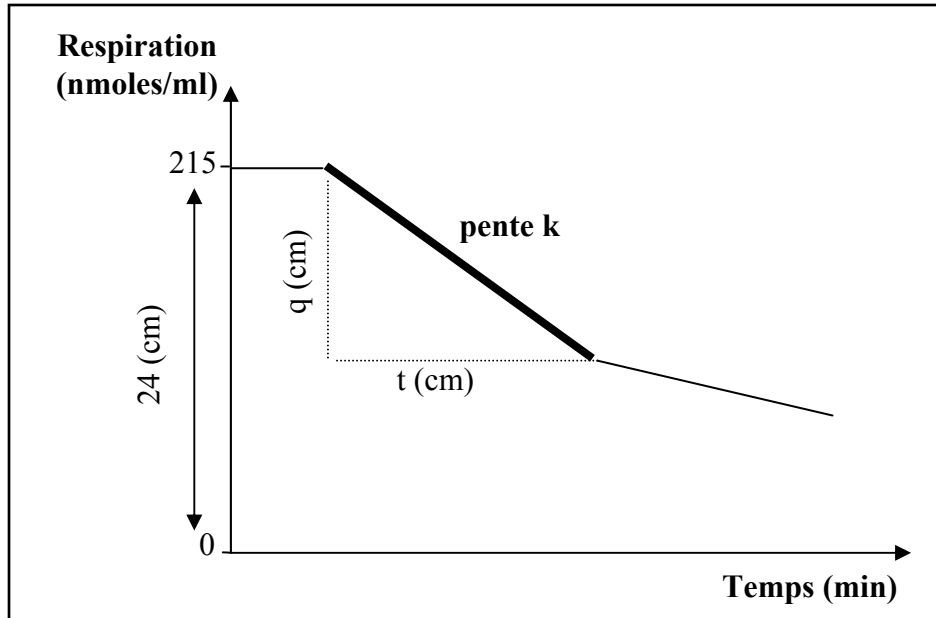


Figure 44: Calcul de la consommation d'oxygène.

Calcul de la vitesse de respiration en nmoles O₂/ml /min

$$= \text{pente } k$$

$$= \left(\frac{q \times 215}{24} \right) / t$$

Calcul de la consommation d'O₂ (VO₂) en nmoles O₂/min/mg

$$= \text{pente } k / 0,2$$

Calcul de l'indice du Contrôle Respiratoire

En 1956, Chance et Williams (Chance *et al.*,1956) furent les premiers à montrer que la concentration en ADP régulaît la vitesse du transport électronique. Pour décrire ce phénomène, on a défini l'indice du contrôle respiratoire (ICR).

$$\text{ICR} = \frac{\text{pente au stade 3}}{\text{pente au stade 2}} = \frac{V_{\text{max}}}{V_o}$$

La valeur de l'ICR est compris entre 6 et 10 pour l'oxydation du glutamate et du malate sur des mitochondries isolées (Jacobus et Saks 1982).

Calcul du rapport ADP/O

Encore appelé rapport P /O ou ATP/O. Ce rapport définit le nombre de molécules d'ADP phosphorylées en ATP quand 2 électrons d'un substrat sont transférés à travers la chaîne respiratoire pour réduire un atome d'oxygène en H₂O. Ce rapport représente le nombre de nmoles d'ADP consommé (ou d'ATP produit) par ng d'atomes d'oxygène consommé.

$$\text{ADP/O} = \frac{\text{nmoles d'ADP ajoutées dans le milieu}}{\text{nmoles d'oxygène consommées au stade 3}}$$

La valeur du ratio ADP/O a une valeur approximative de 3 pour l'oxydation du glutamate et du malate sur des mitochondries isolées (Jacobus et Saks 1982)

Paramètres cinétiques

- Couplage CKmit- phosphorylation oxydative

L'étude de ce couplage repose sur le suivi de la consommation d'O₂ en fonction de concentrations croissantes d'ATP en présence ou en absence de créatine. La cinétique de la respiration est décrite à l'aide de la représentation directe de Michaëlis-Menten : $\text{VO}_2 = f([\text{ATP}])$. Les paramètres cinétiques apparents de la respiration pour l'ATP: K_m et V_{max} , sont déterminés à partir de la représentation en double inverse de Lineweaver et Burk : $1/\text{VO}_2 = f(1/[\text{ATP}])$.

- Couplage CKmit-ANT

L'étude de ce couplage repose sur le suivi de la vitesse de production de PCr (VPCr) en fonction de concentrations croissantes d'ATP. Pour une concentration donnée en ATP, la VPCr est calculée en utilisant les valeurs:

- du rapport ADP/O

- de la VO₂ obtenue après stimulation par cette concentration en ATP, en présence de créatine

Ainsi, l'équation: $\text{VPCr} = \text{ADP/O} \cdot \text{VO}_2$, permet d'obtenir la VPCr pour une concentration donnée en ATP.

La description de la cinétique de la Ckmit est réalisée à l'aide de la représentation directe de Michaëlis-Menten : $\text{VPCr} = f([\text{ATP}])$. Les paramètres cinétiques apparents de la Ckmit pour l'ATP: K_m et V_{max} , sont déterminés à partir de la représentation en double inverse de Lineweaver et Burk : $1/\text{VPCR} = f(1/[\text{ATP}])$.

Graphes et coefficients de régression (hyperbolique et linéaire) sont obtenus à partir du logiciel Sigma Plot (Sigma Plot 2001 for Windows, version 7.101).

VIII. Analyses statistiques

Les résultats sont présentés sous la forme de moyenne \pm erreur standard sur la moyenne (SEM). Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Stat View (Abacus Concepts, Inc., Berkeley CA, 1992). Lorsque deux groupes expérimentaux ont été comparés, les différences statistiques ont été déterminées par un test non paramétriques de Mann et Whitney. Au delà de deux groupes expérimentaux, les différences statistiques ont été déterminées par une analyse de la variance (ANOVA) suivie d'un test PLSD de Fischer (Fischer's protected least significant difference *post hoc* test). Si deux facteurs (temps et type de traitement) ont été inclus dans la comparaison statistique, une ANOVA à deux facteurs a permis de tester l'influence de ces facteurs sur la moyenne des groupes à comparer. La valeur de $p=0,05$ est fixée comme limite de signification.

————— **PARTIE 1** —————

**Effets d'une consommation chronique et modérée
d'éthanol
sur la résistance du myocarde
à une séquence d'ischémie/reperfusion *ex vivo*.**



I. Introduction et objectifs

La consommation modérée de boissons alcoolisées est associée à une diminution significative de la morbi-mortalité cardiovasculaire (Gaziano *et al.*, 2000; Rimm *et al.*, 199). Bien que cette protection puisse partiellement s'expliquer par des effets systémiques : effet anti-plaquettaire, effet anti-coagulant (Renaud *et al.*, 1992; de Lorgeril et Salen 1999), effet anti-inflammatoire (Stewart 2002; Zairis *et al.*, 2004), bénéfiques sur le métabolisme des lipoprotéines (augmentation des HDL) (Rimm *et al.*, 1999), il est probable que d'autres mécanismes interviennent. En effet, des études cliniques ont montré qu'une consommation modérée d'alcool est associée à une réduction du risques de complications post-infarctus (de Lorgeril 2002) et à une réduction des risques de mort subite cardiaque (Kagan *et al.* 1989; Albert *et al.*, 1999) ce qui suggère un effet direct de l'éthanol sur le myocarde. Plus exactement, l'éthanol pourrait installer un système de protection contre l'ischémie/reperfusion qui soit spécifique et intrasèque au myocarde, plus communément appelé préconditionnement myocardique («myocardial preconditioning»). Comme il est évidemment impossible de faire des expériences de préconditionnement myocardique chez des humains, il est impératif de faire appel à la recherche fondamentale. Jusqu'à présent, les études expérimentales affichent des résultats contradictoires sur les effets préconditionnants de l'éthanol (tableau 15).

L'objectif de cette première partie est donc d'évaluer les effets d'une consommation chronique et modérée d'éthanol (CCME) sur la protection du myocarde après une ischémie régionale et reperfusion chez le rat.

Le rat est choisi pour son régime et son métabolisme de l'éthanol proche de l'homme (Crow *et al.*, 1977).

Le cœur isolé perfusé est choisi comme modèle expérimental car il permet d'étudier uniquement les effets de l'éthanol sur le myocarde et d'éliminer ainsi les effets confondants de l'éthanol sur d'autres organes (foie) ou éléments circulants du sang (lipides, leucocytes, plaquettes).

La récupération fonctionnelle du ventricule gauche et la mesure de la taille de l'infarctus sont choisis comme paramètres de cardioprotection.

Les rats sont exposés à des doses d'éthanol de 6% et 12% pendant 7 et 18 semaines pour déterminer un éventuel effet dose et/ou temps.

Cett étude étant une intervention nutritionnelle, il est important de s'intéresser aux possibles effets de l'éthanol sur le poids et les apports nutritionnels du rat.

II. Méthode

2.1. Groupes expérimentaux

Les expériences ont été menées sur des rats répartis en trois groupes : ETOH 6% et ETOH 12% (recevant respectivement 6 et 12% (v/v) d'éthanol dans leur eau de boisson pendant 7 ou 18 semaines par comparaison au groupe contrôle recevant de l'eau et un régime isocalorique. Le choix de ces doses est basé sur des expériences pilotes menées dans notre laboratoire et qui ont montré que des doses entre 6 et 12% d'éthanol pendant 7 à 18 semaines n'induisent pas d'anomalie métabolique.

Les animaux disposent d'un accès libre à la boisson et à la nourriture. L'éthanol est retiré la veille au soir de l'expérimentation (environ 16h avant l'expérimentation). Le matin du sacrifice, un dosage de l'alcoolémie est effectué pour vérifier l'absence d'éthanol circulant.

2.2. Suivi pondéral et analyses nutritionnelles

Les rats sont pesés une fois par semaine. A mi-traitement, des relevées des consommations alimentaires et de boissons sont effectuées sur chaque cage, tous les 4 jours pendant 3 semaines consécutives. Ces mesures permettent de calculer la consommation journalière alimentaire, la consommation journalière de boisson, les apports énergétiques quotidiens et les apports alimentaires quotidiens en acides gras pour chaque groupe expérimental (voir matériels et méthodes §1.2. et §1.3.).

2.3. Perfusion de cœurs isolés

Préparation des perfusions de cœurs isolés

Après l'anesthésie de l'animal, le cœur est excisé, un prélèvement sanguin est immédiatement effectué au niveau de la cage thoracique en vue du dosage de l'alcoolémie. Le cœur est rapidement perfusé par voie aortique avec du liquide de perfusion de type Krebs-Henseleit selon un dispositif de perfusion à pression constante (100 cm H₂O). La fonction ventriculaire gauche est enregistrée par l'intermédiaire d'un ballonnet relié à un capteur de pression et les cœurs sont stimulés à 360 battements par minute durant tout le protocole (voir matériels et méthodes §2.2. à 2.6.).

Protocole de perfusion

Après 15 min de stabilisation, le cœur est soumis à 30 min d'ischémie régionale suivie de 120 min de reperfusion (voir matériels et méthodes §2.7.). La récupération fonctionnelle post-

ischémique du ventricule gauche est suivie pendant les 30 premières minutes de reperfusion. Au terme de la reperfusion, la ligature coronaire est à nouveau serrée, le cœur est coloré par une solution de Bleu Evans et conservé à -20°C en vue de la mesure de la taille de l'infarctus.

2.4. Histologie et mesure de la taille de l'infarctus

La mesure de la taille de l'infarctus est réalisée à partir d'une coloration histoenzymologique au TTC (voir matériels et méthodes §3.). La zone à risque (ZR) est exprimée en pourcentage de la masse ventriculaire totale (VT) et la zone infarctée (ZI) en pourcentage de la ZR.

2.5. Analyses statistiques

Les résultats sont présentés sous la forme de moyenne \pm erreur standard sur la moyenne (SEM). Les différences statistiques intergroupes après 7 ou 18 semaines de traitement ont été déterminées par une analyse de la variance (ANOVA) suivie d'un test PLSD de Fischer. Les différences statistiques entre les groupes 7 et 18 semaines ont été déterminées par une ANOVA à deux facteurs pour déterminer l'influence du facteur temps (= âge des rats et la durée d'exposition à l'éthanol), l'influence du facteur traitement et l'influence de l'interaction de ces deux facteurs sur la moyenne de ces groupes expérimentaux. La valeur de $p=0,05$ est fixée comme limite de signification.

2.6. Exclusion des animaux

L'étude a été réalisée sur un total initial de 72 rats ($n=12/\text{groupe}$). A la fin du protocole sur cœur isolé perfusé, un à quatre animaux/groupe ont été éliminés du fait de l'absence de zone infarctée. Après exclusion, le nombre final d'animaux est donc :

- contrôle: $n=8$; ETOH 6%: $n=8$ et ETOH 12%: $n=9$ pour les groupes 7 semaines
- contrôle: $n=10$; ETOH 6%: $n=11$ et ETOH 12%: $n=10$ pour les groupes 18 semaines.

III. Résultats : influence de l'éthanol sur le poids et la nutrition du rat

3.1. Suivi pondéral

Comme le montre les figures 45A et 45B, l'augmentation du poids corporel n'est pas différente entre les groupes contrôle, éthanol 6 et 12% après 7 semaines (contrôle= 421 ± 11 g; ETOH 6%= 403 ± 17 g; ETOH 12%= 396 ± 14 g) ou 18 semaines (contrôle= 494 ± 12 g; ETOH 6%= 485 ± 12 g; ETOH 12%= 471 ± 12 g). On peut noter également que la courbe de croissance trace une hyperbole avec un plateau atteint après 12 semaines suggérant que le rat atteint son poids maximum à l'âge de 16 semaines (le rat ayant 4 semaines en début de traitement).

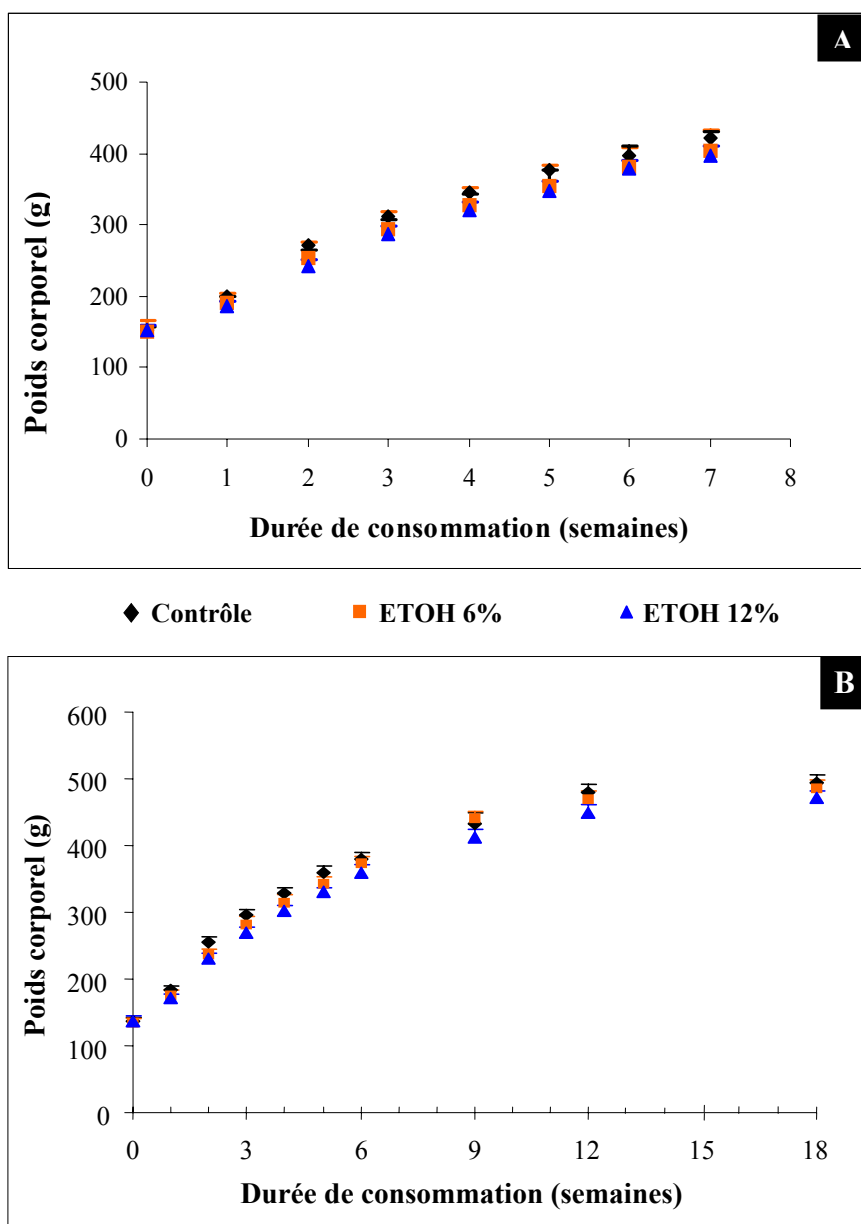


Figure 45 : Effet de l'éthanol sur la croissance pondérale du rat après 7 (A) et 18 (B) semaines de consommation d'éthanol.

Moyenne \pm SEM (n=12/groupe). Résultats statistiquement non significatifs.

3.2. Analyses nutritionnelles

3.2.1. Apports énergétiques

Le tableau 20 présente les résultats du suivi alimentaire et de la consommation de boisson (eau ou éthanol 6 ou 12%) de rats après 7 semaines de consommation modérée d'éthanol. Les apports énergétiques des rats éthanol tendent à diminuer comparé aux rats contrôles (contrôle= 100,4 ± 9,1 kcal; ETOH 6%= 86,2 ± 8,4 kcal; ETOH 12%= 83,6 ± 9,8 kcal) qui tendent à plus consommer de croquettes (contrôle= 24,4 ± 2,2 g; ETOH 6%= 19,2 ± 1,9 g; ETOH 12%= 17,2 ± 2,2g). Parmi les rats éthanol, le groupe ETOH 6% consomme 11% de plus de croquettes que le groupe ETOH 12% tandis que le groupe ETOH 12% consomme significativement plus d'éthanol (ETOH 6%= 0,9 ± 0,1 g vs ETOH 12%= 1,7 ± 0,1 g), donc l'énergie apportée par l'éthanol représente une part nettement plus importante de l'énergie totale pour le groupe ETOH 12% (ETOH 6%= 7,5 ± 0,6% énergie totale vs ETOH 12%= 14,6 ± 0,4% apport énergétique total). Grâce à cette compensation calorique soit d'origine alimentaire, soit d'origine éthanolique, les apports énergétiques de chaque groupe éthanol restent ainsi statistiquement comparables.

	Contrôle (n=12)	ETOH 6% (n=12)	ETOH 12% (n=12)	Anova p
Apport énergétique total				
kcal/jour/rat	100,4 ± 9,1	86,2 ± 8,4	83,6 ± 9,8	ns
Alimentation				
g/jour/rat	24,2 ± 2,2	19,2 ± 1,9	17,2 ± 2,2	ns
kcal/j/rat	100,4 ± 9,1	79,7 ± 7,9	71,4 ± 9,1	ns
Boisson				
ml/jour/rat	28,5 ± 2,4	19,5 ± 1,6*	18,2 ± 1,0**	0,0010
g éthanol/jour/rat	-	0,9 ± 0,1	1,7 ± 0,1	<0,0001
kcal /jour/rat	-	6,5 ± 0,5	12,2 ± 0,7	<0,0001
% énergie total	-	7,5 ± 0,6	14,6 ± 0,4	<0,0001

Tableau 20 : Influence de l'éthanol sur la répartition des apports énergétiques après 7 semaines de consommation d'éthanol.

Moyenne ± SEM. Ns: non significatif. *: p<0.01 et **: p<0.001 versus contrôle.

Après 18 semaines de consommation modérée d'éthanol (tableau 21), les apports énergétiques du groupe ETOH 12% sont 10% plus faibles que ceux des groupes contrôles et ETOH 6% (contrôle= 83,4 ± 1,2 kcal; ETOH 6%= 80,8 ± 1,9 kcal; ETOH 12%= 70,1 ± 1,1 kcal). Cependant, la consommation d'éthanol du groupe ETOH 12% est 17,7% plus grande que celle du groupe ETOH 6% et représente même une part importante de l'énergie totale pour ce

-Partie 1-

groupe (ETOH 6%= 11,6 ± 0,3% apport énergétique total vs ETOH 12%= 17,1 ± 0,5% apport énergétique total). Toutefois, la consommation alimentaire des rats ETOH 12% est significativement plus basse que les rats contrôles (-30, 3%) et ETOH 6% (-17,7%) suggérant qu'après une CCME de 12%, les apports alimentaires sont plus diminués que la consommation d'éthanol est augmentée.

	Contrôle (n=12)	ETOH 6% (n=12)	ETOH 12% (n=12)	Anova p
Apport énergétique total				
kcal/jour/rat	83,4 ± 1,2	80,8 ± 1,9	70,1 ± 1,1 ^{*#}	0,0004
Alimentation				
g/jour/rat	20,1 ± 0,3	17,0 ± 0,4 [*]	14,0 ± 0,2 ^{*#}	<0,0001
kcal/j/rat	83,4 ± 1,2	70,6 ± 1,7 [*]	58,1 ± 0,8 ^{*#}	<0,0001
Boisson				
ml/jour/rat	27,5 ± 0,5	28,1 ± 0,5	18,0 ± 0,4 ^{*#}	<0,0001
g éthanol/jour/rat	-	1,4 ± 0,0	1,7 ± 0,0	<0,0001
kcal /jour/rat	-	9,4 ± 0,2	12,0 ± 0,3	<0,0001
% énergie total	-	11,6 ± 0,3	17,1 ± 0,5	<0,0001

Tableau 21 : Influence de l'éthanol sur la répartition des apports énergétiques après 18 semaines de consommation d'éthanol.

Moyenne ± SEM. * : p<0.0001 versus contrôle et # : p<0.001 versus ETOH 6%.

3.2.2. Analyse des apports lipidiques

L'analyse des apports lipidiques quotidiens des groupes contrôle, ETOH 6 et 12% après 7 semaines de consommation d'éthanol est présentée dans le tableau 22. Les apports lipidiques des rats éthanol tendent à diminuer comparés aux rats contrôles. Par ce fait, la totalité des apports en acides gras (saturés, monoinsaturés et AGPI) des groupes éthanol tendent également à diminuer. On observe également que les apports lipidiques des groupes éthanol représentent une part des apports énergétiques totaux beaucoup plus basse que chez les rats contrôles (p<0,0001), et ce, d'autant plus dans le groupe ETOH 12% que dans le groupe ETOH 6% (p<0,001). Enfin, comme tous les animaux ont le même régime alimentaire, la proportion de chaque acide gras (exprimée en pourcentage des acides gras totaux) est conservée d'un groupe à l'autre. En conséquence, les rapport AGPI/saturés, sn-6/sn-3 et LA/ALA sont identiques pour les trois groupes (AGPI/saturés= 2,9; sn-6/sn-3= 7,5 et LA/ALA= 13,5).

-Partie 1-

Lipides alimentaires	Contrôle (n=12)	ETOH 6% (n=12)	ETOH 12% (n=12)	ANOVA p
mg/jour/rat	723,2 ± 65,2	574,5 ± 58,4	515,4 ± 66,3	ns
kcal/jour/rat	6,5 ± 0,6	5,2 ± 0,5	4,6 ± 0,6	ns
% énergie totale	6,5 ± 0,0	6,0 ± 0,1*	5,5 ± 0,1*#	<0,0001
Acides gras alimentaires (mg/jour/rat)				
Saturés				
C14:0	3,6 ± 0,3	2,9 ± 0,3	2,6 ± 0,3	ns
C16:0	127,3 ± 11,5	101,1 ± 10,3	90,7 ± 11,7	ns
C18:0	14,5 ± 1,3	11,5 ± 1,2	10,3 ± 1,3	ns
C20	2,0 ± 0,2	1,7 ± 0,2	1,5 ± 0,2	ns
n-9				
C18:1 (OA)	136,7 ± 12,3	108,6 ± 11,0	97,4 ± 12,5	ns
n-7				
C16:1	5,8 ± 0,5	4,6 ± 0,5	4,1 ± 0,5	ns
C18:1	8,7 ± 0,8	6,9 ± 0,7	6,2 ± 0,8	ns
n-6				
C18:2 (LA)	370,3 ± 33,4	294,2 ± 29,9	263,9 ± 33,9	ns
C20:2	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1	ns
C20:4 (AA)	2,2 ± 0,2	1,7 ± 0,2	1,5 ± 0,2	ns
C22:4	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1	ns
n-3				
C18:3 (ALA)	27,5 ± 2,5	21,8 ± 2,2	19,6 ± 2,5	ns
C20:5 (EPA)	8,0 ± 0,7	6,3 ± 0,6	5,7 ± 0,7	ns
C22:5 (DPA)	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1	ns
C22:6 (DHA)	13,0 ± 1,2	10,3 ± 1,1	9,3 ± 1,2	ns
Sommes				
Saturés	147,5 ± 13,3	117,2 ± 11,9	105,1 ± 13,5	ns
Monoinsaturés (n-9 + n-7)	151,6 ± 13,6	120,1 ± 12,2	107,7 ± 13,9	ns
AGPI (n-6 + n-3)	423,8 ± 38,2	336,7 ± 34,2	302,0 ± 38,8	ns
AGPI n-6	373,9 ± 33,7	297,0 ± 30,2	266,4 ± 34,3	ns
AGPI n-3	49,9 ± 4,5	39,6 ± 4,0	35,6 ± 4,6	ns
AGPI-TLC n-3	22,4 ± 2,0	17,8 ± 1,8	16,0 ± 2,1	ns
Rapports				
AGPI / saturés	2,9 ± 0,0	2,9 ± 0,0	2,9 ± 0,0	ns
sn-6 / sn-3	7,5 ± 0,0	7,5 ± 0,0	7,5 ± 0,0	ns
LA/ALA	13,5 ± 0,0	13,5 ± 0,0	13,5 ± 0,0	ns

Tableau 22 : Comparaison des apports lipidiques entre les groupes contrôle et éthanol après 7 semaines de consommation d'éthanol.

AGPI (n-6 et n-3): acides gras polyinsaturés (oméga 6 et oméga 3 respectivement); AGPI-TLC n-3: acides gras polyinsaturés à très longues chaînes oméga 3. Moyenne ± SEM. Ns: non significatif, *: p<0.0001 versus contrôle et #: p= 0.001 versus ETOH 6%.

-Partie 1-

Le tableau 23 présente les apports lipidiques quotidiens des groupes contrôle, ETOH 6 et 12% après 18 semaines de consommation modérée d'éthanol. Les apports lipidiques (et donc en acides gras) sont significativement diminués dans le groupe ETOH 6% (-16,7% vs contrôle) et ETOH 12% (-33,4% vs contrôle). Les apports lipidiques des rats éthanol représentent donc une part des apports énergétiques totaux significativement inférieure aux rats contrôles ($p < 0,0001$). Enfin, comme les groupes 18 semaines ont le même régime alimentaire que les groupes 7 semaines, les valeurs des rapports AGPI/saturés, sn-6/sn-3 et LA/ALA restent donc similaires à celles citées ci-dessus.

-Partie 1-

Lipides alimentaires	Contrôle (n=12)	ETOH 6% (n=12)	ETOH 12% (n=12)	Anova p
mg/jour/rat	600	500**	400**	<0,0001
kcal/jour/rat	5,4 ± 0,1	4,5 ± 0,1**	3,6 ± 0,1**	<0,0001
% énergie totale	6,5 ± 0,0	5,6 ± 0,0**	5,1 ± 0,0**	<0,0001
Acides gras alimentaires (mg/jour/rat)				
Saturés				
C14:0	3,0 ± 0,1	2,5 ± 0,0*	2,0 ± 0,0**	<0,0001
C16:0	105,6 ± 2,9	88,0 ± 1,8**	73,4 ± 1,3**	<0,0001
C18:0	12,0 ± 0,2	10,0 ± 0,2**	8,0 ± 0,1**	<0,0001
C20	1,8 ± 0,0	1,5 ± 0,0*	1,2 ± 0,0**	<0,0001
n-9				
C18:1 (OA)	113,4 ± 2,1	94,5 ± 1,9**	75,6 ± 1,4**	<0,0001
n-7				
C16:1	4,8 ± 0,1	4,0 ± 0,1**	3,2 ± 0,1**	<0,0001
C18:1	7,2 ± 0,1	6,0 ± 0,1**	4,8 ± 0,1**	<0,0001
n-6				
C18:2 (LA)	307,2 ± 5,6	256,0 ± 5,1**	204,8 ± 3,7**	<0,0001
C20:2	0,6 ± 0,0	0,5 ± 0,0*	0,4 ± 0,0**	<0,0001
C20:4 (AA)	1,8 ± 0,0	1,5 ± 0,0*	1,2 ± 0,0**	<0,0001
C22:4	0,6 ± 0,0	0,5 ± 0,0*	0,4 ± 0,0**	<0,0001
n-3				
C18:3 (ALA)	22,8 ± 0,4	19,0 ± 0,4**	15,2 ± 0,3**	<0,0001
C20:5 (EPA)	6,6 ± 0,1	5,5 ± 0,0**	4,4 ± 0,1**	<0,0001
C22:5 (DPA)	1,2 ± 0,0	1,0 ± 0,0**	0,8 ± 0,0**	<0,0001
C22:6 (DHA)	10,8 ± 0,2	9,0 ± 0,2**	7,2 ± 0,1**	<0,0001
Sommes				
Saturés	122,4 ± 2,2	102,0 ± 0,2**	81,6 ± 1,5**	<0,0001
Monosaturés (n-9 + n-7)	125,4 ± 2,2	104,5 ± 2,1**	83,6 ± 1,5**	<0,0001
AGPI (n-6 + n-3)	351,6 ± 6,4	293,8 ± 5,9**	234,8 ± 4,2**	<0,0001
AGPI n-6	310,2 ± 5,6	258,3 ± 5,2**	206,8 ± 3,7**	<0,0001
AGPI n-3	41,4 ± 0,8	34,5 ± 0,7**	27,6 ± 0,5**	<0,0001
AGPI-TLC n-3	18,6 ± 0,3	15,5 ± 0,3**	12,4 ± 0,2**	<0,0001
Rapports				
AGPI / saturés	2,9 ± 0,0	2,9 ± 0,0	2,9 ± 0,0	ns
sn-6 / sn-3	7,5 ± 0,0	7,5 ± 0,0	7,5 ± 0,0	ns
LA/ALA	13,5 ± 0,0	13,5 ± 0,0	13,5 ± 0,0	ns

Tableau 23 : Comparaison des apports lipidiques entre les groupes contrôle et éthanol après 18 semaines de consommation d'éthanol.

AGPI (n-6 et n-3): acides gras polyinsaturés (oméga 6 et oméga 3 respectivement); AGPI-TLC n-3: acides gras polyinsaturés à très longues chaînes oméga 3. Moyenne ± SEM. *: p<0.01 et **: p<0.0001 versus contrôle.

IV. Résultats : étude de la résistance du myocarde à l'ischémie/reperfusion après une consommation modérée d'éthanol sur un modèle de coeur isolé perfusé de rat.

Le dosage de l'alcoolémie post-mortem s'est révélé négatif pour la totalité des rats utilisés pour cette présente étude.

L'effets de l'éthanol sur la résistance du myocarde à l'ischémie/reperfusion sont étudiés en exposant les coeurs de rats à 30 min d'ischémie régionale et 120 min de reperfusion. A la fin de cette période, deux paramètres de cardioprotection sont évalués : la récupération fonctionnelle post-ischémique et la mesure de la taille de l'infarctus.

4.1. Paramètres hémodynamiques

Comme le montre le tableau 24, la fonction hémodynamique de base est statistiquement non différente entre les groupes contrôle, ETOH 6% et ETOH 12%, après 7 ou 18 semaines de consommation modérée d'éthanol. On peut toutefois noter que la fonction ventriculaire gauche tend à être légèrement moins performante après une CCME.

Après 30 min d'ischémie régionale, le suivi de la récupération fonctionnelle post-ischémique du ventricule gauche est représenté par les figures 46 et 47. Au cours des 30 premières minutes de reperfusion, on peut remarquer qu'après 7 ou 18 semaines, une consommation d'éthanol à 6 ou 12% n'a pas d'effet bénéfique significatif sur la récupération fonctionnelle post-ischémique. Cependant, des tendances sont à relever entre les trois groupes expérimentaux.

Ainsi, après 7 semaines de CCME, on remarque que les coeurs des rats éthanol tendent à une meilleure relaxation post-ischémique comme en témoigne la valeur de la LVEDP après 30 min de reperfusion (LVEDP : contrôle= $27,27 \pm 2,57$ mmHg; ETOH 6%= $22,29 \pm 3,18$ mmHg et ETOH 12% = $18,11 \pm 3,32$ mmHg) (figure 46A). Parallèlement, la récupération post-ischémique de la $-dP/dt$ des rats éthanol tend brièvement à s'améliorer au début de la reperfusion mais ensuite cette tendance disparaît progressivement car la vitesse de relaxation des trois groupes devient similaires à 30 min de reperfusion ($-dP/dt$: contrôle= $73,1 \pm 5,1\%$; ETOH 6%= $74,9 \pm 1,8\%$; ETOH 12%= $76,2 \pm 3\%$) (figure 46B).

Paramètres hémodynamiques	7 semaines					18 semaines				
	Contrôle (n=8)	ETOH 6% (n=8)	ETOH 12% (n=9)	Anova p	Contrôle (n=10)	ETOH 6% (n=11)	ETOH 12% (n=9)	Anova p		
	DC (ml/min)	16,85 ± 0,36	15,81 ± 0,31	14,72 ± 1,01	ns	15,40 ± 0,74	16,05 ± 0,54	14,28 ± 0,76	ns	
LVEDP (mmHg)	4,44 ± 0,26	4,57 ± 0,19	3,89 ± 0,14	ns	4,85 ± 0,19	4,72 ± 0,27	5,07 ± 0,39	ns		
LVDP (mmHg)	130,2 ± 6,0	125,3 ± 3,1	130,5 ± 2,3	ns	139,0 ± 5,8	136,9 ± 10,7	127,7 ± 6,8	ns		
+dP/dt (mmHg/s)	6375 ± 683	5863 ± 322	5507 ± 414	ns	4391 ± 201	4020 ± 221	3848 ± 143	ns		
-dP/dt (mmHg/s)	4531 ± 310	3760 ± 129	4444 ± 113	ns	2583 ± 142	2521 ± 98	2243 ± 87	ns		

Tableau 24: Comparaison de la fonction ventriculaire gauche de base des groupes contrôle et éthanol, après 7 et 18 semaines de consommation modérée d'éthanol.

Variables fonctionnelles mesurées après 10 min de stabilisation. DC: débit coronaire; LVEDP: pression diastolique; LVDP: pression développée; +dP/dt et -dP/dt: dérivée premières positive et négative du ventriculaire gauche. Moyenne ± SEM. Ns: non significatif.

-Partie 1-

En ce qui concerne la force contractile (figure 46B), la LVDP tend à s'améliorer dans le groupe ETOH 12% mais à s'altérer dans le groupe ETOH 6% comparée au cœurs contrôles. A la fin de la période de récupération, ces tendances s'atténuent, surtout pour le groupe ETOH 6% (LVDP: contrôle= $65,6 \pm 2,3\%$; ETOH 6%= $63,3 \pm 2,8\%$; ETOH 12%= $70,6 \pm 5,0\%$). Cependant, la +dP/dt du groupe ETOH 6% reste inférieure à celles des deux groupes durant toute la période de récupération fonctionnelle (figure 46D).

Après 18 semaines de consommation modérée d'éthanol, la récupération de la LVEDP et de la -dP/dt est pratiquement similaire (figure 47A et 47C) entre les trois groupes. Après 30 min de reperfusion, la pression diastolique est en moyenne égale à 16,5 mmHg et la -dP/dt a atteint 72% de la vitesse de relaxation de base. En revanche, quelques tendances sont à relever pour les LVDP et +dP/dt. En effet, la récupération de la force contractile (figure 47B) tend à être plus rapide (dès 10 min de reperfusion) dans le groupe ETOH 12% tandis que dans le groupe ETOH 6%, elle tend à ralentir après 15 min de reperfusion et ces tendances sont encore conservées au terme de la récupération fonctionnelle (LVDP: contrôle= $72,2 \pm 3,8\%$; ETOH 6%= $70,4 \pm 1,9\%$; ETOH 12%= $74,3 \pm 4,8\%$). Quant à la récupération de la +dP/dt, elle semble plus efficace dans les cœurs ETOH 6 et 12% que dans les cœurs contrôles au début de la reperfusion (figure 47D). A partir de 15 minutes de reperfusion, seul le groupe ETOH 12% tend à conserver la plus haute +dP/dt (+dp/dt à 30 min de reperfusion, : contrôle= $67,0 \pm 5,0\%$; ETOH 6%= $73,0 \pm 3,0\%$; ETOH 12%= $78,0 \pm 5,0\%$).

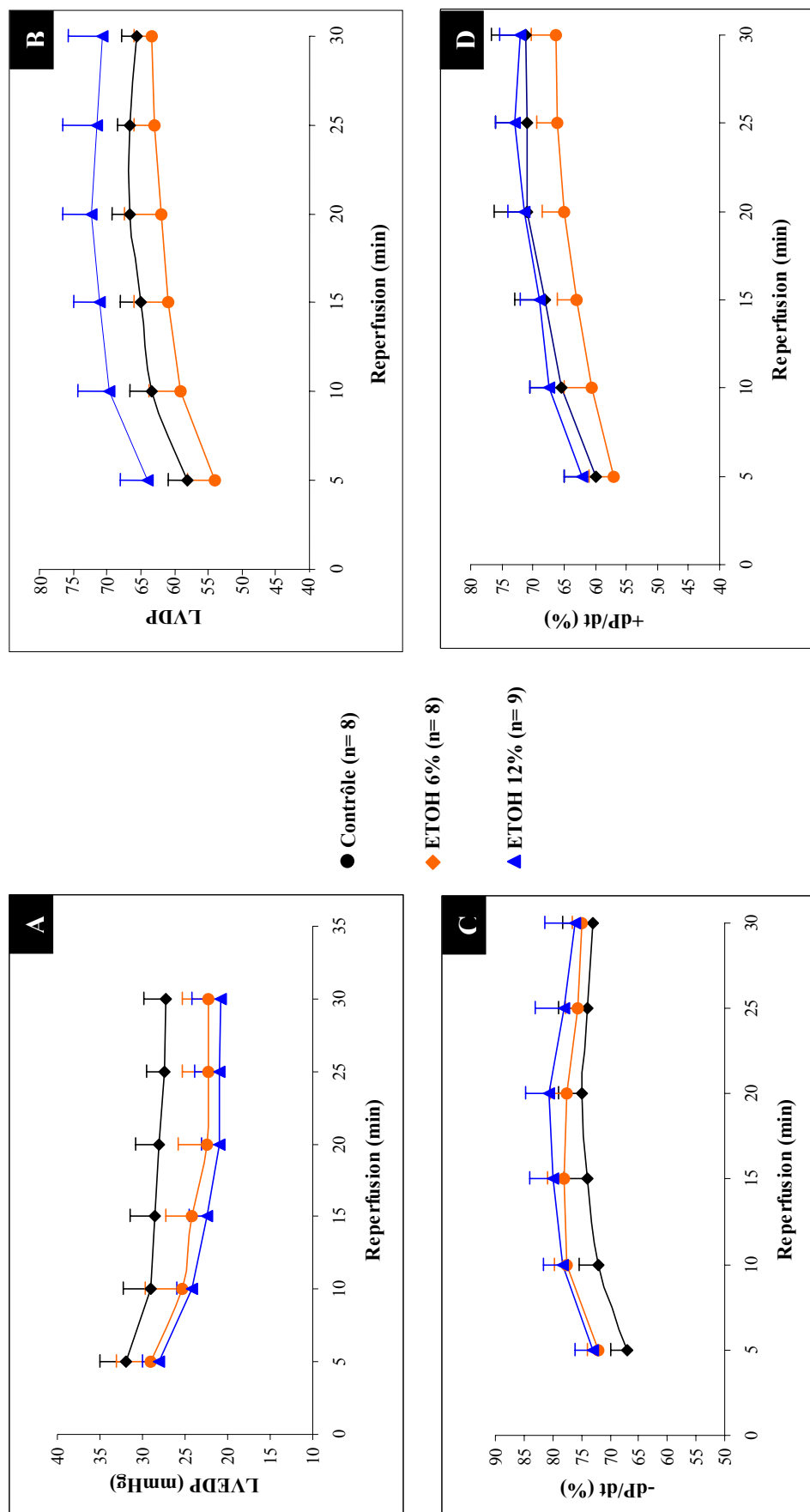


Figure 46: Ethanol et récupération fonctionnelle post-ischémique du ventricule gauche après 7 semaines de consommation modérée d'éthanol.

Récupération post-ischémique de la pression diastolique (LVEDP) (A), de la pression développée (LVEDP) (B), des dérivées premières négative (-dP/dt) (C) et positive (+dP/dt) (D) au cours des 30 premières minutes de reperfusion. Expression des LVEDP, -dP/dt et +dP/dt en pourcentage de la valeur de stabilisation correspondante. Moyenne \pm SEM. Résultats statistiquement non significatifs.

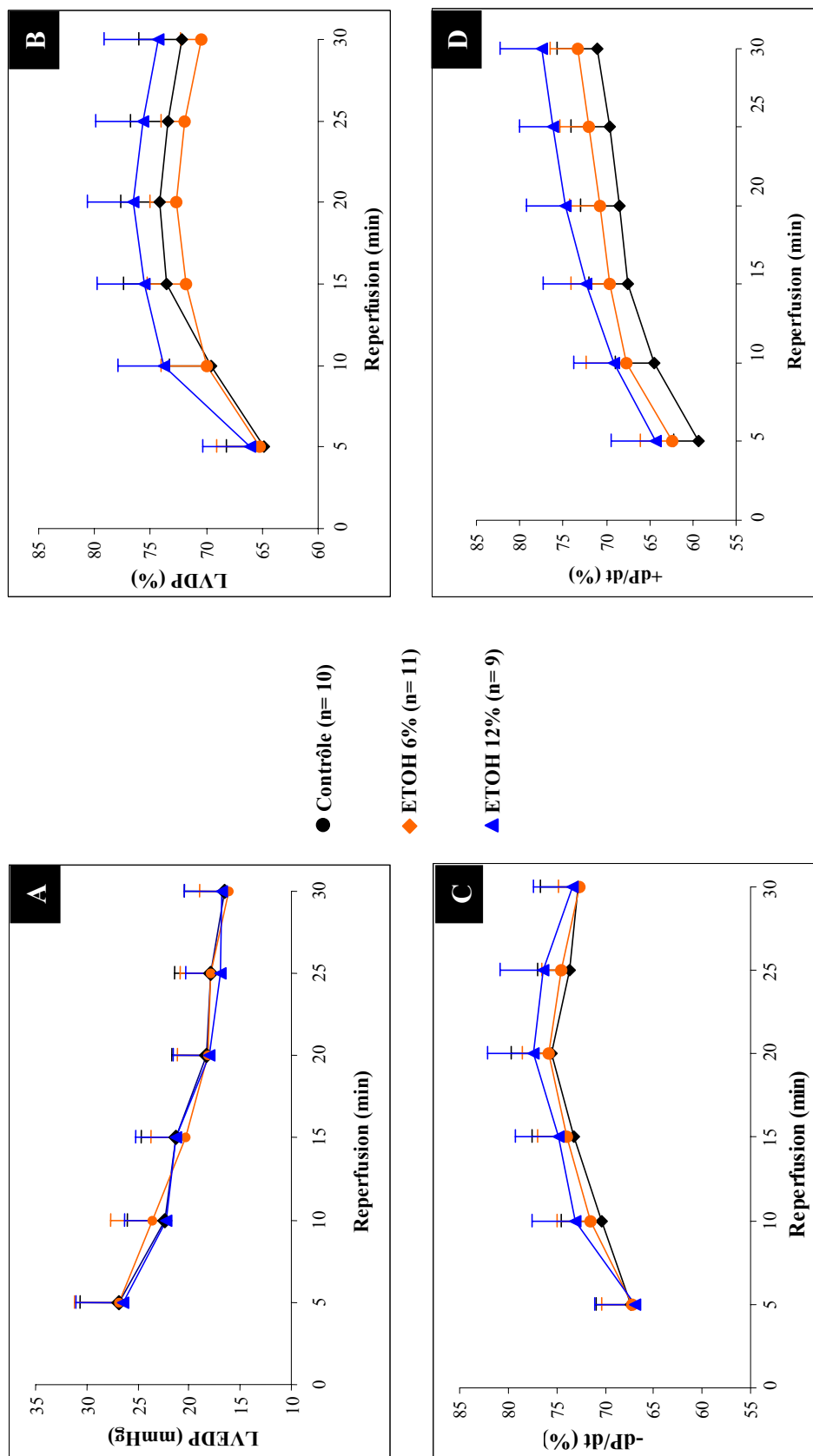


Figure 47: Ethanol et récupération fonctionnelle post-ischémique du ventricule gauche après 18 semaines de consommation modérée d'éthanol.

Récupération post-ischémique de la pression diastolique (LVEDP) (A), de la pression développée (LVDP) (B), des dérivées premières négative (-dP/dt) (C) et positive (+dP/dt) (D) au cours des 30 premières minutes de reperfusion. LVDP, -dP/dt et +dP/dt exprimées en pourcentage de la valeur de stabilisation correspondante. Moyenne \pm SEM. Résultats statistiquement non significatifs.

4.1. Taille de l'infarctus

La zone à risque est statistiquement comparable entre les différents groupes expérimentaux (figures 48A et 49A). Comme l'indique la figure 48B, la taille de l'infarctus tend à être réduite dans les groupes éthanol après un traitement de 7 semaines (ZI: contrôle= $58,6 \pm 9,9\%$; ETOH 6%= $41,9 \pm 7,8\%$ et ETOH 12%= $35,7 \pm 8,1\%$). À préciser que ces grandes barres d'erreur (SEM) font suite à une période d'apprentissage au protocole de cœurs isolés perfusés. Après une consommation d'éthanol de 18 semaines (figure 49B), la zone infarctée est significativement diminuée et d'autant plus efficacement dans le groupe ETOH 12% (diminution de 36,6% vs contrôle) que dans le groupe ETOH 6% (baisse de 26,7% vs contrôle), ce qui tend à supposer à un effet dose de l'éthanol sur la réduction de la taille de l'infarctus.

Après de tels résultats, il semble intéressant de déterminer l'influence du facteur traitement et/ou du facteur temps (facteur temps = âge des animaux et durée d'exposition à l'éthanol) sur la moyenne de la ZI des 6 groupes expérimentaux. Une ANOVA à 2 facteurs a donc été réalisée pour répondre à cette objectif.

D'après cette analyse statistique, ni le facteur temps ($p < 0,1733$), ni l'interaction des facteurs durée et traitement ($p < 0,5049$) influent sur la taille de l'infarctus des différents groupes. Seule, la consommation d'éthanol (facteur traitement) influe sur la réduction de la ZI ($p < 0,0142$).

Cette analyse statistique permet donc de confirmer qu'une CCME réduit efficacement la taille de l'infarctus. Par ailleurs, ces résultats permettent de préciser que les différences de ZI observées après 7 semaines et 18 semaines de consommation modérée d'éthanol ne sont pas les conséquences d'un effet temps mais plutôt à un apprentissage de la technique sur cœur isolé perfusé.

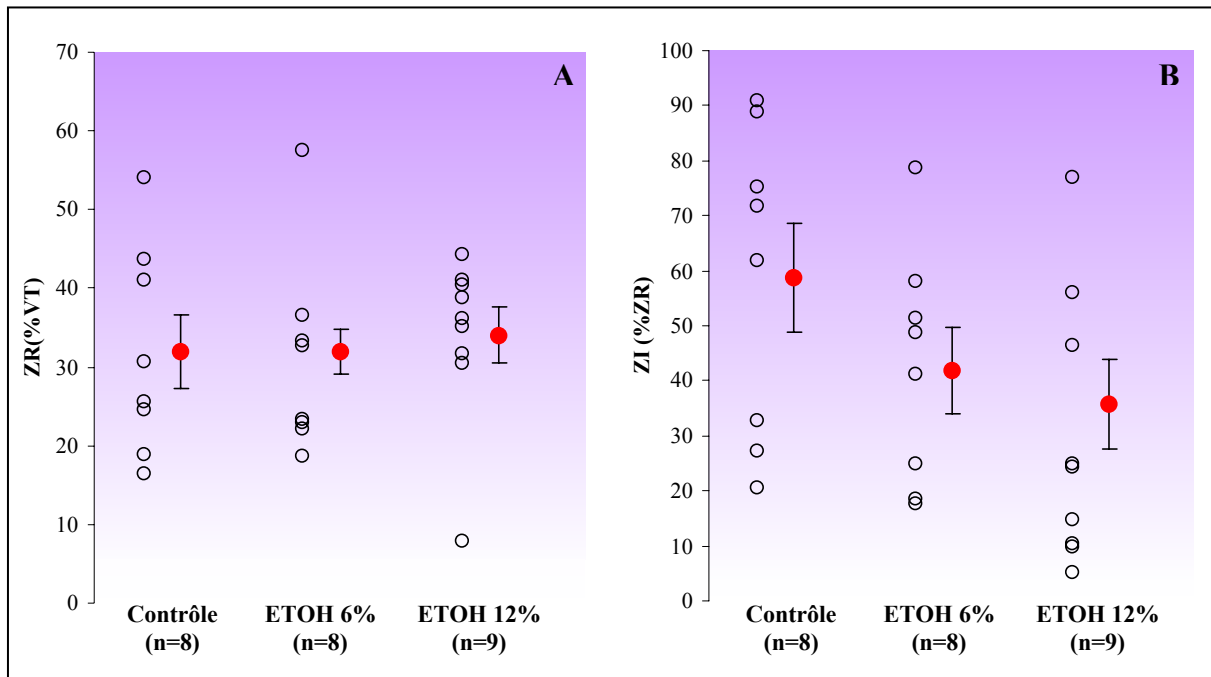


Figure 48: (A) Zone à risque et (B) taille de l'infarctus après 7 semaines de CCME. VT: masse ventriculaire totale; ZI: zone infarctée; ZR: zone à risque. ° Valeur individuelle de chaque groupe. Moyenne • ± SEM. Résultats statistiquement non significatifs.

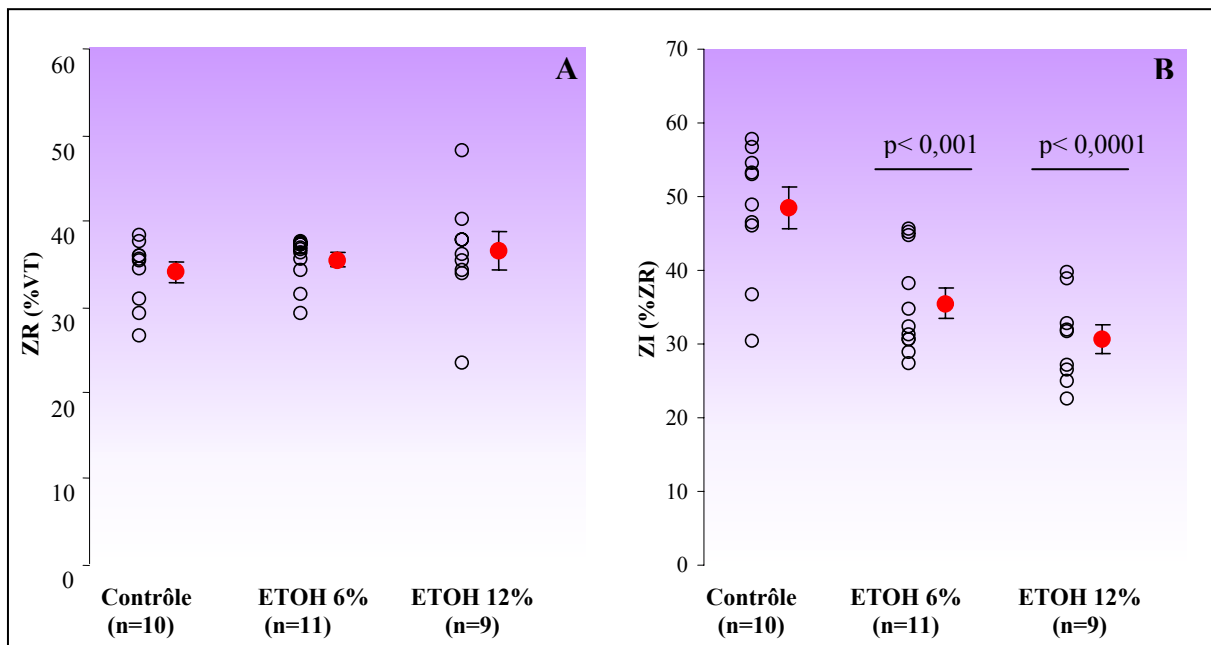


Figure 49: (A) Zone à risque et (B) taille de l'infarctus après 18 semaines de CCME. VT: masse ventriculaire totale; ZI: zone infarctée; ZR: zone à risque. ° : valeur individuelle de chaque groupe. Moyenne • ± SEM. Résultats statistiquement non significatifs.

V. Discussion

Cette présente étude est la première à démontrer que des doses chroniques et modérées d'éthanol protègent efficacement contre la nécrose cellulaire chez le rat. Obtenir une telle cardioprotection sur cœur isolé perfusé démontre également que l'éthanol agit directement sur le myocarde. Par ailleurs, l'éthanol semble d'autant plus efficace à des doses chroniques de 12% que 6% ce qui laisse suggérer à un possible effet dose de l'éthanol sur la réduction de la taille de l'infarctus. Enfin, si une CCME limite la taille de l'infarctus, elle n'apporte cependant aucun bénéfice significatif sur la fonction ventriculaire post-ischémique.

CCME et nutrition

Comme pour toute étude d'intervention nutritionnelle, il est important de réaliser un suivi alimentaire des animaux traités. Cette étude a été réalisée sur des animaux soumis à une consommation d'éthanol à des doses modérées de 6 et 12% pendant 7 ou 18 semaines. Le suivi alimentaire a révélé que les apports énergétiques des rats éthanol sont légèrement diminués. En effet, ils mangent moins, probablement pour compenser les calories apportées par leur eau de boisson enrichie en éthanol. Cependant, la consommation d'éthanol ne compense pas la carence énergétique due à la baisse de leur consommation alimentaire. L'origine de cette diminution des apports caloriques totaux entraînent donc une baisse des apports en acides gras pour les rats éthanol.

L'analyse du suivi alimentaire a permis aussi de révéler que les apports alimentaires totaux des rats diminuent avec la durée du traitement et donc avec l'âge des rats. En effet, les rats impliqués dans l'étude de 18 semaines sont légèrement plus âgés que les rats impliqués dans l'étude de 7 semaines. Au moment du suivi alimentaire, les rats traités pendant 7 et 18 semaines ont respectivement 8 et 13 semaines. A l'âge de 13 semaines, la croissance de ces rats est donc pratiquement terminée. En conséquence, leurs besoins énergétiques sont moins importants d'où une baisse de leur consommation alimentaire comparé aux rats traités pendant 7 semaines. En revanche, quelque soit la durée du traitement, la consommation d'éthanol reste stable. Mais comme les apports énergétiques baissent avec la durée du traitement, la part énergétique représentée par l'éthanol augmente obligatoirement avec la durée du traitement. Ainsi (en pourcentage des calories totales) : CCME 7 semaines: éthanol 6%= 7,5; éthanol 12%= 14,6 vs CCME 18 semaines: éthanol 6%= 11,6; éthanol 12%= 17,1).

CCME et taille de l'infarctus

Pour cette présente étude, nous avons choisi d'évaluer les effets d'une CCME sur la sensibilité/résistance du myocarde à l'ischémie/reperfusion en mesurant la taille de l'infarctus. D'après nos résultats, des doses modérées d'éthanol protège le myocarde contre les altérations liées à l'ischémie/reperfusion en limitant la taille de l'infarctus. D'ailleurs, ces effets sont largement significatifs après 18 semaines de CCME. Il semblerait également exister un effet/dose car des doses chroniques d'éthanol à 12% (v/v) semblent davantage efficaces que des doses chroniques d'éthanol à 6% pour réduire la taille de l'infarctus.

Les résultats des travaux expérimentaux sur éthanol et effet anti-nécrotique sont confus (tableau 15). Beaucoup d'études rapportent un effet protecteur de l'éthanol à partir de modèles d'ischémie globale/reperfusion (Miyamae *et al.*, 1997, 1998 et 1998b; Chen *et al.*, 1999 et 2001; Zhu *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2002). Dans ces cas là, les investigateurs ne mesurent pas la taille de l'infarctus mais mesurent la libération d'enzymes cardiaques comme la créatine kinase. Bien que cette dernière technique soit rapide, elle n'est pas aussi rigoureuse que la mesure de la taille de l'infarctus.

Concernant les études qui ont évalué la taille de l'infarctus, les résultats sont contradictoires. Certaines démontrent une réduction significative de la taille de l'infarctus après une consommation aiguë et modérée d'éthanol (Krenz *et al.*, 2001) ou après une consommation chroniques et modérées d'éthanol (Guiraud *et al.*, 2004). Pour d'autres, la consommation d'éthanol n'induit aucun effet cardioprotecteur. En effet, Itoya a montré que l'éthanol ne parvient pas à réduire la nécrose si celui-ci est injecté avant l'ischémie (Itoya *et al.*, 1998), résultat également confirmé Hale (Hale *et al.*, 2001). En revanche, Krenz a montré que si la perfusion d'éthanol est séparée de l'ischémie par une durée suffisamment longue ou un lavage alors l'éthanol a le temps d'être suffisamment métabolisé pour parvenir à réduire la taille de l'infarctus (Krenz *et al.*, 2001). En conséquence, si l'éthanol est perfusé trop tardivement (proche de l'ischémie), l'éthanol est alors présent en trop forte concentration durant l'ischémie et donc, l'éthanol ne peut pas induire d'effet protecteur sur des modèles *in vivo* (Bellows *et al.*, 1996; Itoya *et al.*, 1998 Dow *et al.*, 2001; Hale *et al.* 2001).

CCME et fonction ventriculaire gauche

Nous avons démontré que la consommation modérée d'éthanol à 6 et 12% pendant 7 ou 18 semaines n'a pas d'effet bénéfique significatif sur la récupération fonctionnelle post-ischémique. Cela peut paraître surprenant. Cependant, l'équipe de Downay (Krenz *et al.*, 2001) a également démontré qu'à la suite d'une exposition aiguë, l'éthanol entraîne une

limitation de la taille de l'infarctus sans amélioration sur la fonction ventriculaire post-ischémique. Ce phénomène a fait l'objet de nombreux commentaires dans la littérature, notamment celui des illustres Kloner and Jennings (Kloner and Jennings, 2001). Ces auteurs expliquent que de brèves épisodes d'ischémie (ischémie préconditionnante) peut entraîner un dysfonctionnement de la fonction cardiaque (sidération myocardique ou stunning) et un effet protecteur contre la nécrose cellulaire. On peut alors supposer qu'une CCME, bien que protégeant le myocarde contre la nécrose cellulaire, puisse également induire un stunning myocardique qui pourrait masquer un éventuel effet protecteur sur la récupération fonctionnelle post-ischémique.

Nos résultats laissent donc apparaître que la cardioprotection induite par une CCME ressemble fortement aux effets induits par un préconditionnement ischémique. De la même manière que le préconditionnement ischémique, une CCME protège directement le myocarde contre la nécrose cellulaire. En conséquence, une CCME peut être considérée comme une forme de préconditionnement myocardique que l'on peut nommer préconditionnement par l'éthanol ou «ethanol preconditioning» (Guiraud *et al.*, 2004).

VI. Conclusion

Notre étude expérimentale est la première à démontrer les effets protecteurs d'une CCME contre la nécrose cellulaire sur cœur isolé de rat. L'emploi de ce modèle nous a permis de préciser que cette cardioprotection passe par une action directe de l'éthanol sur le myocarde. Une CCME est donc une forme de préconditionnement myocardique que nous avons nommé « ethanol preconditioning ». Notre objectif est à présent d'en comprendre les mécanismes.

———— PARTIE 2 ————

**Etude des mécanismes cardioprotecteurs induits par une
consommation modérée d'éthanol chez le rat.**

**Parallèle avec la cardioprotection induite par une
consommation d'acides gras oméga 3.**



I. Introduction et objectifs

Une consommation chronique et modérée d'éthanol (CCME) est associée à une réduction des risques de complications post-infarctus, à une diminution des risques de mort subite cardiaque chez l'homme (Kagan *et al.* 1989; Albert *et al.*, 1999; de Lorgeril 2002) et à effets préconditionnants chez l'animal (Miyamae *et al.*, 1997, 1998 et 1998b; Zhu *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2002; Guiraud *et al.*, 2004) suggérant à un effet direct de l'éthanol sur le myocarde.

En outre, des études cliniques ont récemment montré qu'une consommation modérée d'alcool entraîne une augmentation des acides gras polyinsaturés oméga 3 (AGPI n-3) dans le sang (Cuevas *et al.*, 2000; Christensen *et al.*, 2001 ; de Lorgeril *et al.*, soumis) et les cellules (Pellegrini *et al.*, 1996; Pawlosky et Salem, 2004). De telles modifications sont habituellement observables après une consommation d'AGPI n-3. En effet, il est reconnu que la consommation de poisson (Burr *et al.*, 1989; Albert *et al.*, 1998) ou de capsules d'huile de poissons (Marchioli *et al.*, 2002, Leaf *et al.*, 2003) riches en acides gras à très longues chaînes n-3 (AGPI-TLC n-3) est associée à une réduction des risques de morts subites cardiaques dans les études randomisées. Chez l'animal, une supplémentation en AGPI-TLC n-3 est également reconnue pour avoir des effets anti-arythmiques et anti-nécrotiques (Mc Lennan *et al.*, 1990; Oskarsson *et al.*, 1993; Yang *et al.* 1993 Zhu *et al.*, 1994; Billman *et al.*, 1994; Weylandt *et al.*, 1996). Les données expérimentales et cliniques sur les effets cardiaques des AGPI n-3 et de la CCME laissent donc suggérer que la cardioprotection induite par une CCME ressemblent aux effets protecteurs observés après une consommation d'AGPI n-3. Il est donc probable qu'une partie de la cardioprotection induite par une CCME soit la conséquence d'une induction des AGPI n-3. Etant donné que l'éthanol est connu pour être un puissant modulateur du métabolisme des lipides pour de nombreux tissus (Baraona *et al.*, 1970; Cunnane *et al.*, 1987; Contaldo *et al.*, 1989; Gomez-Tubio *et al.*, 1995), il est possible que l'éthanol, à la manière des AGPI n-3 (d'origine alimentaire), interfère avec les AGPI n-3 des membranes cardiaques et plus spécifiquement au niveau de la mitochondrie, organelle reconnue pour jouer un rôle critique durant l'ischémie, la reperfusion et le préconditionnement myocardique (Takeo et Nasa, 1999; Murphy 2004). En effet, des travaux ont démontré que l'incorporation des AGPI-TLC n-3 (d'origine alimentaire) dans les membranes des cardiomyocytes (Hock *et al.* 1987; Yang *et al.*, 1993; Isensee *et al.*, 1994), modifie leurs propriétés physico-chimiques (Hulbert *et al.*, 1999). Récemment, Pepe a montré que des AGPI n-3 d'origine alimentaire parviennent également à moduler la consommation d'oxygène myocardique et par ce fait, améliorer directement la réponse du cœur à l'ischémie/reperfusion (Pepe *et al.*, 2002).

L'hypothèse de cette seconde partie est donc de tester si l'éthanol pourrait mimer, en partie au moins, les mécanismes cardioprotecteurs des AGPI n-3. Plus exactement, l'éthanol pourrait interférer avec les AGPI n-3, un mécanisme habituellement observable avec les AGPI n-3 d'origine alimentaire. Dans la mitochondrie, de telles modifications lipidiques pourraient influencer sur l'efficacité de la fonction mitochondriale et expliquer la meilleure résistance du myocarde à l'ischémie/reperfusion après une CCME.

Pour tester cette hypothèse, il est nécessaire de :

1) vérifier si une supplémentation en AGPI n-3 induit :

- des effets cardioprotecteurs (comparables à ceux induits par une CCME).

Expérimentalement, la cardioprotection est évaluée sur un modèle de cœur isolé perfusé soumis à une ischémie régionale/reperfusion. Deux paramètres de cardioprotection sont évalués : la récupération fonctionnelle et la mesure de la taille de l'infarctus.

- un enrichissement en AGPI n-3 des membranes mitochondriales cardiaques.

La composition en acides gras des membranes mitochondriales cardiaques est réalisée sur les trois principaux phospholipides mitochondriaux : la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine (PE) et la cardiolipine (CL).

2) déterminer si une CCME pourrait interférer avec les acides gras et notamment les AGPI n-3.

- l'interaction entre l'éthanol et le métabolisme des acides gras est évaluée à partir du profil lipido-lipoprotéinique plasmatique et du profil lipidique des globules rouges (GR). Le premier renseigne sur les possibles modifications induites par l'éthanol sur le métabolisme des acides gras et le second est un très bon indice de la composition en acides gras des cellules cardiaques (Harris *et al.*, 2004)

- l'interaction entre l'éthanol et le profil lipidique mitochondrial est évaluée en analysant la distribution membranaire et le profil en acides gras des trois principaux phospholipides de la mitochondrie cardiaque. La CL pourrait notamment jouer un rôle central dans les altérations liées à l'ischémie/reperfusion (Paradies *et al.*, 2004; Lesnefsky *et al.*, 2004).

3) déterminer si les modifications lipidiques induites par une CCME ont un impact sur la fonction respiratoire de la mitochondrie.

II. Méthodes

2.1. Groupes expérimentaux

Rats supplémentés en acides gras

Pour cette étude, nous avons choisi de comparer les effets d'un régime riche en AGPI n-3 avec ceux d'un régime riche en acides gras saturés et pauvre en AGPI n-3 afin de se rapprocher des comparaisons cliniques habituellement rencontrées (régime enrichi en AGPI n-3 versus régime moderne occidental) (Simopoulos A., 1995). Les expériences ont donc été menées sur des rats répartis entre deux groupes :

- groupe OM3, supplémenté avec 650 µl de Mix alpha 3® (Laboratoire Synergia, Beaune-sur-Arzon, France), un mélange d'huiles de lin et de poissons gras, riches en AGPI n-3.
- par comparaison au groupe SAT, supplémenté avec 650 µl de graisse de palme (Palmella, Allemagne), riche en acides gras saturés.

La supplémentation est effectuée *per os*, quotidiennement et à même heure jusqu'à la veille au soir du sacrifice (environ 16h avant l'expérimentation). Le traitement est appliqué pendant 8 semaines afin de s'assurer du renouvellement complet de tous les phospholipides de toutes les mitochondries cardiaques (Gross *et al.*, 1969). Les animaux disposent également d'un accès libre à l'eau et à la nourriture.

Les rats sont pesés une fois par semaine. A mi-traitement, des relevées des consommations alimentaire sont effectuées sur chaque cage, tous les 4 jours pendant 3 semaines consécutives. Ces mesures permettent de calculer la consommation journalière alimentaire, les apports énergétiques quotidiens et les apports alimentaires quotidiens en acides gras pour chaque pour chaque groupe expérimental (voir matériels et méthodes §1.2. et §1.3.).

Rats exposés à une CCME

Suite aux effets cardioprotecteurs encourageants obtenus avec le groupe ETOH 12%, nous avons choisi de continuer l'étude avec ce groupe éthanol uniquement. Les expériences ont donc été menées sur des rats répartis entre deux groupes : ETOH 12% recevant 12% (v/v) d'éthanol dans l'eau de boisson pendant 7 ou 18 semaines par comparaison au groupe contrôle recevant de l'eau et un régime isocalorique. Les animaux disposent d'un accès libre à la boisson et à la nourriture. L'éthanol est retiré la veille au soir du sacrifice.

2.2 Perfusion de cœurs isolés

Préparation des perfusions de cœurs isolés

Après l'anesthésie de l'animal, le cœur est excisé puis rapidement perfusé par voie aortique avec du liquide de perfusion de type Krebs-Henseleit selon un dispositif de perfusion à pression constante (100 cm H₂O). La fonction ventriculaire gauche est enregistrée par l'intermédiaire d'un ballonnet relié à un capteur de pression et les cœurs sont stimulés à 360 battements par minute durant tout le protocole (voir matériels et méthodes §2.2. à 2.6.).

Protocole de perfusion

Après 15 min de stabilisation, le cœur est soumis à 30 min d'ischémie régionale suivie de 120 min de reperfusion (voir matériels et méthodes §2.7.). La récupération fonctionnelle post-ischémique du ventricule gauche est suivie pendant les 30 premières minutes de reperfusion. Au terme de la reperfusion, la ligature coronaire est à nouveau serrée, le cœur est coloré par une solution de Bleu Evans et conservé à -20°C en vue de la mesure de la taille de l'infarctus.

2.3. Histologie et mesure de la taille de l'infarctus

La mesure de la taille de l'infarctus est réalisée à partir d'une coloration histoenzymologique au TTC (voir matériels et méthodes §3). La zone à risque (ZR) est exprimée en pourcentage de la masse ventriculaire totale (VT) et la zone infarctée (ZI) en pourcentage de la ZR.

2.4. Préparation des échantillons

Mitochondries cardiaques

Après anesthésie de l'animal et excision du cœur, les mitochondries cardiaques sont isolées par digestion enzymatique et centrifugations différentielles (voir matériels et méthodes §4.2.). Après isolement, les mitochondries sont soit placées dans la glace en attente des tests oxygraphiques, soit purifiées sur un gradient discontinu de percoll/métrizamide (voir matériels et méthodes §4.2.) puis conservées à -80°C pour les analyses lipidiques.

Plasma et globules rouges

Après anesthésie de l'animal et excision du cœur, un prélèvement sanguin est immédiatement effectué dans la cage thoracique. Après séparation du plasma et des GR (voir matériels et méthodes §4.1.), les échantillons sont conservés à -80°C en vue de l'analyse du profil lipidique sanguin et du dosage de l'alcoolémie.

2.5. Analyses lipidiques

Dosages des lipides sanguins

Le cholestérol total, le HDL-cholestérol et les triglycérides sont dosés sur échantillons plasmatiques par méthode enzymatique (voir matériels et méthodes §6.5.).

Analyse de la composition en acides gras du plasma et des globules rouges

Les analyses de la composition en acides gras du plasma et des GR sont effectuées par chromatographie en phase gazeuse (CPG) (voir matériels et méthodes 6.2). Chaque espèce d'acide gras est exprimé en pourcentage des acides gras totaux.

Analyse quantitative des principaux phospholipides mitochondriaux

Les phospholipides d'intérêts : PC, PE et CL sont quantifiés à l'aide du système CCM-DIF Iatroscan (voir matériels et méthodes §6.4.). Les résultats sont exprimés en µg/mg de protéines et en % des phospholipides totaux.

Analyse de la composition en acides gras des principaux phospholipides mitochondriaux

Les phospholipides membranaires de la mitochondrie sont séparés par chromatographie sur couche mince (voir matériels et méthodes §6.3.1.). L'analyse de la composition en acides gras de la PC, PE et CL est ensuite effectuée par CPG (voir matériels et méthodes §6.3.2.). Chaque espèce d'acide gras est exprimé en pourcentage des acides gras totaux.

2.6. Tests oxygraphiques

Les tests oxygraphiques sont réalisés à 25°C dans une chambre de respiration contenant 0,9 ml de solution de respiration (solution standard ou solution KCl, voir matériels et méthodes §7.3) et 0,1 ml de BSA délipidée 0,2% (pds/v). Le début du test est marqué par l'addition de la suspension mitochondriale (0,2 mg/ml) puis des substrats malate (2 mM) et glutamate (5 mM).

Test du contrôle respiratoire ou test d'intégrité de la membrane mitochondriale interne

Les mitochondries sont déposées dans une solution de respiration standard. La respiration est stimulée par addition d'ADP 0,3 mM. La qualité de la préparation mitochondriale est ensuite évaluée grâce aux calculs de l'indice du contrôle respiratoire (ICR) et du rapport ADP/O (voir matériels et méthodes §7.3. et 7.4.).

Test cytochrome c ou test d'intégrité de la membrane mitochondriale externe

Après dépôt des mitochondries dans une solution KCl, la respiration est stimulée par 2 mM d'ADP. L'état de la membrane externe est ensuite évalué par addition de cytochrome c (8 μ M) (voir matériels et méthodes §7.3.).

Test du couplage fonctionnel

Les mitochondries sont déposées dans un milieu de respiration standard. La respiration est ensuite stimulée par des concentrations croissantes d'ATP en présence ou en absence de créatine (20 mM) (voir matériels et méthodes §7.3.).

Pour réaliser ce test, on utilise des concentrations croissantes en ATP (0,1; 0,25; 0,5 et 1,0 mM) préparées à partir d'une solution mère de 100mM. Or, préparer une solution d'ATP à la concentration désirée est techniquement impossible. L'ATP est une molécule très sensible à l'oxydation, sa teneur (sous forme d'ATP⁴⁻) aura donc tendance à diminuer avec le temps. Il est également nécessaire de connaître précisément la concentration de cette solution mère car les résultats d'enzymologie nécessite une très grande rigueur et une grande précision. En Par spectrophotométrie, nous avons donc déterminé que la solution stock d'ATP était dosée à 116 mM à la fin de notre protocole. Les concentrations d'ATP précisément testées sont donc égales à: 0,12; 0,29; 0,58 et 1,16 mM.

Les cinétiques des réactions étudiées sont décrites à l'aide de représentations directes de Michaëlis-Menten. Les paramètres cinétiques apparents de ces réactions : constante de Michaëlis-Menten (Km) et vitesse maximale (Vmax), sont déterminés à partir et de la représentation en double inverse de Lineweaver et Burk (voir matériels et méthodes §7.4.).

2.7. Analyses statistiques

Les résultats sont présentés sous la forme de moyenne \pm erreur standard sur la moyenne (SEM). Les différences statistiques entre deux groupes expérimentaux ont été calculées à l'aide d'un test non paramétrique de Mann et Whitney. Les différences statistiques entre les groupes 7 et 18 semaines (relatif à l'étude sur la CCME) ont été déterminées par une ANOVA à deux facteurs pour déterminer l'influence du facteur temps (=âge des rats et durée d'exposition à l'éthanol), l'influence du facteur traitement et l'influence de l'interaction de ces deux facteurs sur la moyenne de ces groupes expérimentaux. La valeur de $p= 0,05$ est fixée comme limite de signification.

2.8. Exclusion des animaux

Rats supplémentés en acides gras

Les études sur cœurs isolés et mitochondries cardiaques ont été effectuées sur un total initial de 60 rats (n=30/groupe), répartis entre le protocole sur cœur isolé perfusé (n=14/groupe) et le l'analyse du profil en acides gras des membranes mitochondriales cardiaques (n=16/groupe). A la fin du protocole sur cœur isolé perfusé, un à trois animaux/groupe ont été éliminés du fait de l'absence de zone infarctique. Après exclusion, le nombre final d'animaux inclus/groupe dans cette étude est donc: SAT: n= 13 et OM3: n=11.

Deux cœurs de rats étant nécessaires pour isoler un échantillon mitochondrial, 8 échantillons mitochondriaux/groupe ont donc été préparés et utilisés pour les analyses lipidiques sur mitochondries cardiaques. Autrement dit, SAT: n= 8 et OM3: n=8.

Rats exposés à une CCME

Les analyses lipidiques ont été effectuées sur des effectifs initiaux de 88 rats (n=20/groupe pour l'étude 7 semaines et n=24/groupe pour l'étude 18 semaines). Deux à quatre échantillons sanguins ont été éliminés du fait d'une hémolyse plasmatique. Après exclusion, le nombre d'animaux inclus/groupe est donc:

- contrôle: n= 18 et ETOH 12%: n= 20 pour les groupes 7 semaines.
- contrôle: n= 20 et ETOH 12%: n= 22 pour les groupes 18 semaines.

Les études sur mitochondries cardiaques ont été réalisées à partir de 48 rats permettant de préparer 24 échantillons mitochondriaux (n=12/groupe) répartis entre les analyses lipidiques et l'oxygraphie. Deux échantillons ont été éliminés du fait d'une membrane mitochondriale externe endommagée. Après exclusion, le nombre d'animaux inclus/groupe est donc:

- contrôle: n= 5 et éthanol 12%: n= 5 pour l'étude de la fonction mitochondriale
- contrôle: n= 6 et éthanol 12%: n= 6 pour les analyses lipidiques.

III. Résultats: influence des acides gras oméga 3 sur le poids et la nutrition du rat

Comme pour toute étude d'intervention nutritionnelle, un suivi de la croissance pondérale et un suivi de la consommation alimentaire ont été réalisés afin de déterminer si une supplémentation en AGPI n-3 modifie ces paramètres. De manière comparables à l'étude sur l'éthanol, nous avons également déterminé les apports alimentaires quotidiens en acides gras

afin de mieux apprécier les modifications mitochondriales induites par une supplémentation lipidique sur le métabolisme des acides gras.

3.1. Suivi pondéral

Comme le montre la figure 50, la croissance pondérale des deux groupes est comparable après 8 semaines de supplémentation (SAT= 372 ± 8 g vs OM3= 379 ± 7 g).

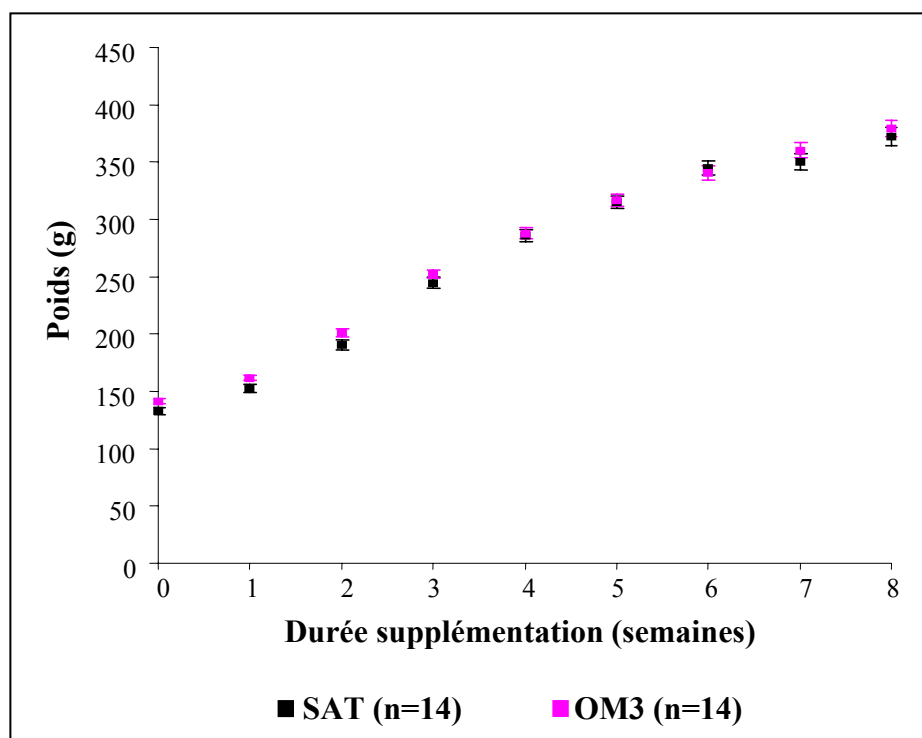


Figure 50: Effet d'une supplémentation en AGPI n-3 sur la croissance pondérale du rat. Moyenne ± SEM. Résultats statistiquement non significatifs.

3.2. Analyses nutritionnelles

3.2.1. Apports énergétiques

Comme l'indique le tableau 25, les apports énergétiques des groupes SAT et OM3 sont comparables (SAT= 92,6 ± 1,7 Kcal vs OM3= 88,8 ± 1,7 Kcal) et se répartissent entre la consommation alimentaire et la supplémentation lipidique. La consommation alimentaire des rats OM3 et SAT est comparable et est respectivement de 20,1 et 21,0 g de croquettes. L'administration quotidienne d'une supplémentation lipidique de 600 mg (= 650 µl avec $d_{\text{huile}}= 0,93$) équivaut à 5,8% et 6,1% des apports énergétiques des groupes SAT et OM3 respectivement.

	SAT (n=14)	OM3 (n=14)	p
Apport énergétique total			
kcal/jour/rat	92,6 ± 1,7	88,8 ± 1,7	ns
<hr/>			
Alimentation			
g/jour/rat	21,0 ± 0,4	20,1 ± 0,4	ns
kcal/j/rat	87,2 ± 1,7	83,4 ± 1,7	ns
<hr/>			
Supplémentation lipidique			
g /jour/rat	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0	ns
kcal /jour/rat	5,4 ± 0,0	5,4 ± 0,0	ns
% énergie totale	5,8 ± 1,1	6,1 ± 1,0	ns

Tableau 25: Influence d'une supplémentation en AGPI n-3 sur les apports énergétiques du rat.

Moyenne ± SEM. Ns: non significatif.

3.2.2. Analyse des apports lipidiques

L'analyse des apports lipidiques quotidiens des groupes SAT et OM3 est présentée dans le tableau 26. Les apports lipidiques totaux sont statistiquement comparables entre les deux groupes et représentent environ 12% de l'apport énergétique total. Ils sont issus de la diète et des 600 mg de supplémentation. Cette dose a d'ailleurs été établie de telle sorte que l'administration de Mix alpha 3® associée à une consommation quotidienne de 20g de régime A04 permettent d'obtenir un rapport n-6/n-3 et un rapport LA/ALA proches de 1.

En revanche, les apports en acides gras sont complètement différent entre les deux groupes. En ce qui concerne le groupe SAT, un régime standard A04 enrichi en graisse de palme apporte des acides gras saturés (464,6 mg dont 407,9 mg de C16) et des AGPI (418,3 mg dont 89,5% d'AGPI n-6 avec du LA quasi-exclusivement) en quantité pratiquement équivalente comme en témoigne la valeur du rapport AGPI/saturés proche de 1. Les acides gras monoinsaturés, (n-6 + n-7) représentent quant à eux, 28% des apports totaux en acides gras (346,5 mg dont 95% d'OA). En revanche, les apports en AGPI de type AGPI n-3 sont très faibles, d'ailleurs les rapports n-6/n-3 et LA/ALA sont respectivement 10 à 12,5 plus hauts que ceux du groupe OM3 (p<0,0001). En effet, les rats supplémentés aux AGPI n-3 ont des apports quotidiens en acides gras représentés au trois-quart par des AGPI dont 54,8% sont des AGPI n-3. L'apport pour chaque AGPI n-3 est environ 10 fois plus important que dans le groupe SAT, l'ALA et le DHA étant les plus abondants. Pour le reste des AGPI, c'est principalement des apports en LA. Quant aux apports en acides gras saturés et monoinsaturés, ils représentent respectivement 13,3 et 15,6% des apports lipidiques totaux.

Lipides alimentaires	SAT (n=14)	OM3 (n=14)	p
Teneur en lipides (mg/jour/rat)			
Diète	630,0 ± 11,7	603,0 ± 10,5	ns
Supplément	600	600	-
Lipides totaux			
mg/jour/rat	1230,0 ± 11,7	1203,0 ± 10,5	ns
kcal/jour/rat	11,1 ± 0,1	10,8 ± 0,1	ns
% énergie total	12,0 ± 0,1	12,2 ± 0,1	ns
Acides gras alimentaires (mg/jour/rat)			
Saturés			
C14:0	9,8 ± 0,1	3,6 ± 0,0	<0,0001
C16:0	407,9 ± 2,1	130,0 ± 1,8	<0,0001
C18:0	42,0 ± 0,2	23,5 ± 0,2	<0,0001
C20	4,9 ± 0,0	2,4 ± 0,0	<0,0001
n-9			
C18:1 (OA)	329,1 ± 2,2	171,4 ± 1,2	<0,0001
n-7			
C16:1	6,2 ± 0,1	6,6 ± 0,0	<0,0001
C18:1	11,2 ± 0,1	10,9 ± 0,1	<0,0001
n-6			
C18:2 (ALA)	371,2 ± 6,0	378,4 ± 5,4	ns
C20:2	0,6 ± 0,0	2,4 ± 0,0	<0,0001
C20:3	0,0 ± 0,0	0,6 ± 0,0	<0,0001
C20:4 (AA)	1,9 ± 0,0	4,2 ± 0,0	<0,0001
C22:4	0,6 ± 0,0	1,2 ± 0,0	<0,0001
n-3			
C18:3 (ALA)	24,5 ± 0,4	307,4 ± 0,4	<0,0001
C20:5 (EPA)	6,9 ± 0,1	51,1 ± 0,1	<0,0001
C22:5 (DPA)	1,3 ± 0,0	10,2 ± 0,0	<0,0001
C22:6 (DHA)	11,3 ± 0,2	100,9 ± 0,2	<0,0001
Sommes			
Saturés	464,6 ± 2,4	159,5 ± 2,1	<0,0001
Monoinsaturés (n-9 + n-7)	346,5 ± 2,5	188,7 ± 2,2	<0,0001
AGPI (n-6 + n-3)	418,3 ± 6,9	856,4 ± 6,1	<0,0001
AGPI n-6	374,3 ± 6,1	386,8 ± 5,4	0,0424
AGPI n-3	44,0 ± 0,8	469,6 ± 0,7	<0,0001
AGPI-TLC n-3	19,5 ± 0,4	162,2 ± 0,3	<0,0001
Rapports			
AGPI/saturés	0,9 ± 0,0	5,4 ± 0,0	<0,0001
sn-6/sn-3	8,5 ± 0,0	0,8 ± 0,0	<0,0001
LA/ALA	15,1 ± 0,0	1,2 ± 0,0	<0,0001

Tableau 26 : Comparaison des apports lipidiques des groupes SAT et OM3. AGPI (n-6 et n-3): acides gras polyinsaturés (oméga 6 et oméga 3 respectivement); AGPI-TLC n-3: acides gras polyinsaturés à très longues chaînes oméga 3. Moyenne ± SEM. Ns: non significatif.

IV. Résultats: étude de la résistance du myocarde à l'ischémie/reperfusion après une supplémentation en acides gras oméga 3 sur un modèle de cœur isolé perfusé de rat.

Les effets des AGPI n-3 sur la résistance du myocarde à l'ischémie/reperfusion sont vérifiés en exposant les cœurs de rats à 30 min d'ischémie régionale et 120 min de reperfusion. A la fin de cette période, deux paramètres de cardioprotection sont évalués : la récupération fonctionnelle post-ischémique et la mesure de la taille de l'infarctus.

4.1. Paramètres hémodynamiques

Comme le montre le tableau 27, la fonction hémodynamique de base est statistiquement non différente entre les groupes SAT et OM3 après 8 semaines de supplémentation lipidique.

	SAT (n=13)	OM3 (n=11)	p
DC (ml/min)	15,23 ± 0,28	14,05 ± 0,39	ns
LVEDP (mmHg)	4,17 ± 0,12	4,33 ± 0,12	ns
LVDP (mmHg)	139,5 ± 9,8	125,2 ± 7,6	ns
+dP/dt (mmHg/s)	3521 ± 120	3308 ± 177	ns
-dP/dt (mmHg/s)	2150 ± 110	2092 ± 124	ns

Tableau 27 :Fonction ventriculaire gauche de base des groupes SAT et OM3.

Variables fonctionnelles mesurées après 10 min de stabilisation. DC: débit coronaire; LVEDP: pression diastolique; LVDP: pression développée; +dP/dt et -dP/dt: dérivée première positive et négative du ventriculaire gauche. Moyenne ± SEM. Ns: non significatif.

Après 30 min d'ischémie régionale, le suivi de la récupération fonctionnelle post-ischémique du ventricule gauche est représenté par les figures 51A à 51D. Au cours des 30 premières minutes de reperfusion, on peut remarquer qu'une supplémentation en Mix alpha 3® n'a pas d'effet bénéfique significatif sur la récupération fonctionnelle post-ischémique. Cependant, des tendances sont à relever entre les deux groupes expérimentaux. Si les cœurs des rats SAT et OM3 présentent une relaxation post-ischémique comparable (51A et C), en revanche une supplémentation en Mix alpha 3® tend à améliorer la force (figure 51B) et la cinétique de contraction (figure 51D) dès la 15^{ème} min de reperfusion et cette tendance est maintenue jusqu'au terme de la phase de récupération.

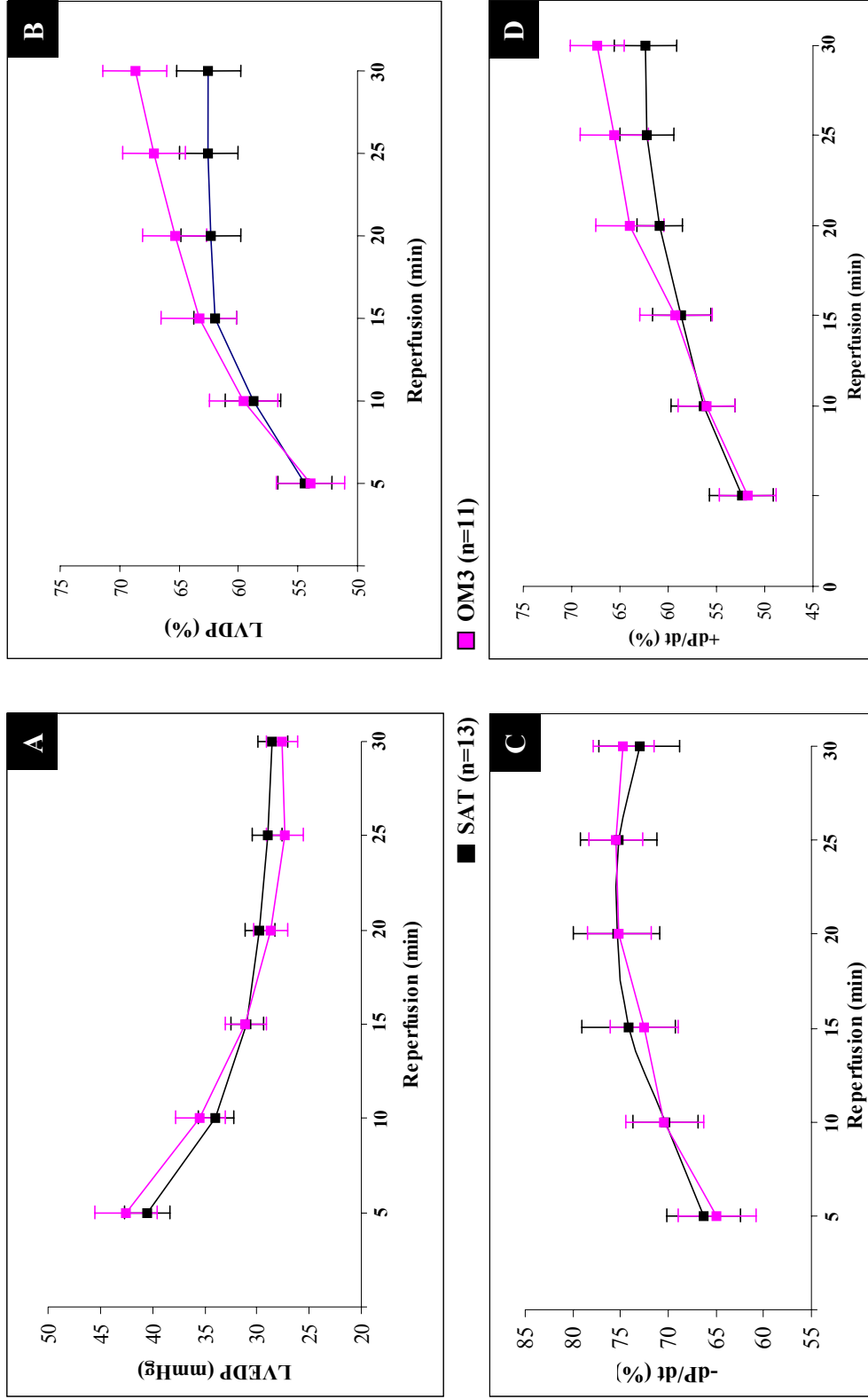


Figure 51 : Supplémentation en AGPI n-3 et récupération fonctionnelle post-ischémique du ventricule gauche.

Récupération post-ischémique de la pression diastolique (LVEDP) (A), de la pression développée (LVDP) (B), des dérivées premières négative (-dP/dt) (C) et positive (+dP/dt) (D) au cours des 30 premières minutes de reperfusion. Expression des LVDP, -dP/dt et +dP/dt en pourcentage de la valeur de stabilisation correspondante. Moyenne \pm SEM. Résultats statistiquement non significatifs.

4.2. Taille de l'infarctus

La zone à risque est statistiquement comparable entre les groupes SAT et OM3 (figure 52). D'après la figure 53, la zone infarctée des groupes SAT et OM3 est respectivement égale à 37,7 et 28,6% ($p < 0,01$) après 8 semaines de supplémentation. Comparé à un régime riche en graisses saturés, un régime enrichi en Mix alpha 3® permet donc de réduire de 24,1% la taille de l'infarctus.

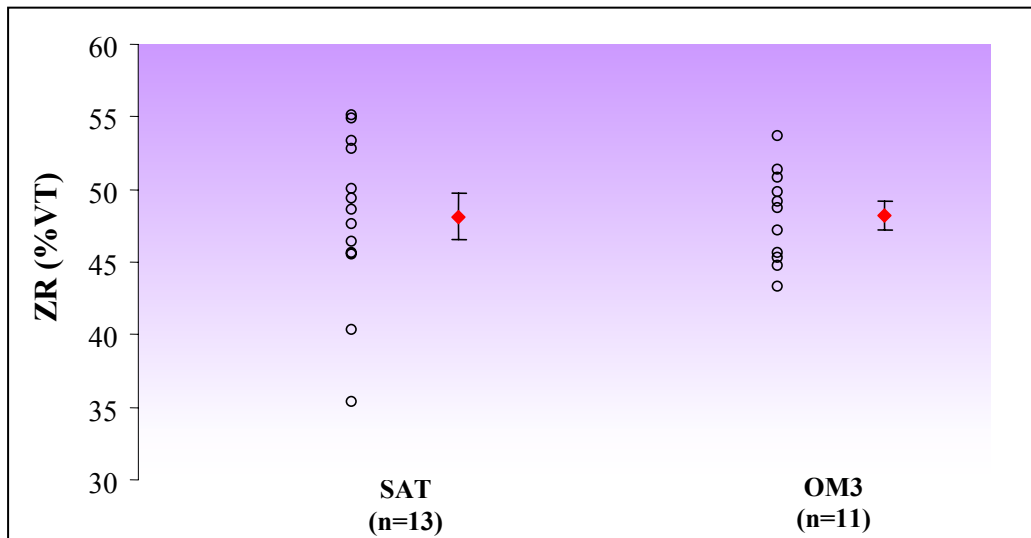


Figure 52: Zone à risque (ZR) exprimée en pourcentage de la masse ventriculaire totale (VT).

○: valeur individuelle de chaque groupe. Moyenne ♦ ± SEM. Résultats statistiquement non significatifs.

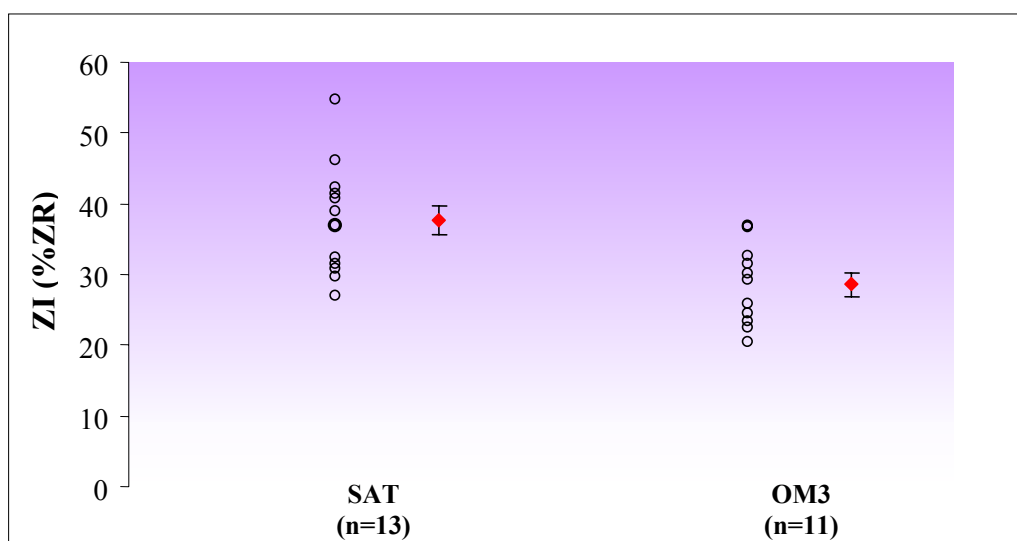


Figure 53: Effet d'une supplémentation en AGPI n-3 sur la réduction de la taille de l'infarctus (ZI) exprimée en pourcentage de la zone à risque (ZR).

○: valeur individuelle de chaque groupe. Moyenne ♦ ± SEM. Mann et Whitney : $p < 0,01$.

V. Résultats: effets d'une supplémentation en acides gras oméga 3 sur les acides gras des phospholipides de la mitochondrie cardiaque.

Le second objectif est de vérifier l'interaction des AGPI n-3 alimentaires avec les acides gras des membranes mitochondriales en analysant la composition en acides gras des 3 principaux phospholipides de la mitochondrie cardiaque : la PC, la PE et la CL.

Profil en acides gras de la PC

Le tableau 28 résume les résultats de la composition en acides gras de la PC mitochondriale cardiaque dans les groupes SAT et OM3.

La PC apparaît principalement constituée de C18, AA, C16 et LA. Toutefois, la composition en acides gras de la PC est très différente entre les groupes SAT et OM3.

Après une supplémentation en graisse de palme, la PC est bien évidemment enrichie en acides gras saturés (+7,6%) et principalement en C18 (+7,6%) mais aussi en acides gras monoinsaturés (+13,7%) et majoritairement des acide gras n-9 (+75% en OA). En revanche, après un régime enrichi en AGPI n-3, la PC s'enrichit essentiellement en AGPI (+10%, $p=0,0013$ vs SAT). D'ailleurs, on peut remarquer que l'enrichissement en AGPI de la PC des rats OM3 est équivalent à l'enrichissement en acides gras saturés de la PC des rats SAT comme l'indique le rapport AGPI/saturés, proche de 1 dans les deux groupes. Du reste, l'enrichissement en AGPI de la PC n'est pas le fait des AGPI n-6 car ils diminuent de 6% mais plutôt à une impressionnante incorporation d'AGPI n-3 (SAT= $3,51 \pm 0,20\%$ vs OM3= $11,15 \pm 0,40\%$, $p<0,0001$) dont 96,3% sont des AGPI-TLC n-3.

En étudiant plus en détails la composition en acides gras de la PC, on se rend compte qu'une supplémentation en Mix alpha 3® entraîne d'impressionnantes modifications au niveau des AGPI. Pour caractériser ce phénomène, le rapport LA/ALA et le rapport EPA/AA permettent de caractériser la voie métabolique privilégiée par les désaturases et l'élongase. Suivant la disponibilité en LA et ALA, la synthèse des AGPI-TLC est privilégiée soit dans le sens des AGPI-TLC n-6 soit dans le sens des AGPI-TLC n-3. Ainsi, on peut observer que les rapports n-6/n-3 et LA/ALA chutent respectivement d'un facteur 3 ($<0,0001$) et 8 ($<0,0001$) dans le groupe OM3 comparés au groupe SAT. Parallèlement, le rapport EPA/AA est 7 fois plus élevé dans le groupe OM3 comparé au ratio quasi-nul des groupes SAT ($p<0,0001$). Ces résultats traduisent certainement un shunt du métabolisme des AGPI n-6 vers celui des AGPI n-3 et plus précisément un shunt de la synthèse des AGPI-TLC n-6 vers celle des AGPI-TLC n-3. En effet, après une prise chronique d'AGPI n-3, on observe un appauvrissement de la PC en AGPI-TLC n-6 (C20:2 n-6, C22:4 n-6 et surtout AA). On remarque également une baisse

-Partie 2-

du rapport C20:3n-6/C18:2 n-6 ($p=0,0046$), une hausse du rapport EPA/AA ($p<0,0001$) dans le groupe OM3. En revanche, la teneur du C20:3 n-6 reste stable. Ces résultats suggèrent qu'une supplémentation en AGPI n-3 perturbe la synthèse des AGPI-TLC n-6 au niveau des désaturase Δ^6 et Δ^5 . En conséquence, le LA étant moins utilisé pour la synthèse des AGPI-TLC n-6, il s'accumule et explique certainement la haute teneur en LA dans les PC des rats OM3 (+17,2%, $p=0,0009$ vs SAT). De plus, la synthèse des AGPI-TLC n-3 est stimulée et explique certainement le spectaculaire enrichissement de la PC en AGPI n-3 dans le groupe OM3 (+20,7% en ALA, 6,6 fois plus d'EPA, 2,8 fois plus de DPA et 2,9 fois plus de DHA comparé au groupe SAT).

Profil en acides gras de la PE

Le tableau 29 résume les résultats d'analyse de la composition en acides gras de la PE mitochondriale cardiaque dans les groupes SAT et OM3.

La PE apparaît principalement constituée de C18, AA, DHA et C16. Toutefois, la composition en acides gras de la PE est très différente entre les groupes SAT et OM3. Après un régime enrichi en graisses saturés, la PE s'enrichit en acides gras saturés (+11,9 % vs OM3) et monoinsaturés (+28,5% vs OM3). A l'inverse, la PE s'enrichit en AGPI (+13,9%) après un régime supplémenté en AGPI n-3. Non pas en AGPI n-6 car ils diminuent de 30,8% mais exclusivement en AGPI n-3 (SAT= $16,61 \pm 0,62\%$ vs OM3= $33,99 \pm 1,70\%$) comme le suggère la baisse d'un facteur 2,9 du rapport n6/n3. Egalement, la baisse des rapports n-7/C18:2 n-6 (-19,1% vs SAT) et C20:3 n-9/C20:4 n-6 (-35,3% vs SAT) montre qu'en plus du métabolisme des AGPI n-6, une supplémentation en AGPI n-3 induit des perturbations du métabolisme des acides gras n-7 et n-9. En effet, c'est l'incorporation d'AGPI n-3 qui est privilégiée après une supplémentation en AGPI n-3. La PE initialement très riche en DHA (déjà 15% après un régime enrichi en graisses saturés), s'enrichit encore en AGPI n-3 ($p<0,0001$): en ALA (augmentation d'un facteur 46 comparée au groupe SAT) et en AGPI-TLC n-3 (augmentation d'un facteur 2 comparé au groupe SAT). Le rapport EPA/AA du groupe OM3 est d'ailleurs 10,6 fois plus élevé que dans le groupe SAT ($p<0,0001$). Ce résultat traduit une synthèse privilégiée d'AGPI-TLC n-3 au profit des AGPI-TLC n-6 d'où un important enrichissement des membranes mitochondries OM3 en AGPI-TLC n-3 (+50% de DHA) et un spectaculaire appauvrissement en AGPI-TLC n-6 (-50% d'AA et jusqu'à -90% de C22:4). On observe également une baisse du rapport C20:3 n-6/C18:2 n-6 après une supplémentation en AGPI n-3 (SAT= $0,084 \pm 0,010$ vs OM3= $0,038 \pm 0,010$). Ces résultats traduisent donc une altération de la synthèse des AGPI-TLC n-6 au niveau de la désaturase Δ^6 et Δ^5 et de l'élongase.

PHOSPHATIDYLCHOLINE			
Acides gras (%)	SAT (n=8)	OM3 (n=8)	p
Saturés			
C14	0,35 ± 0,02	0,33 ± 0,04	ns
C16	17,29 ± 0,90	15,98 ± 0,32	ns
C18	27,12 ± 0,60	25,06 ± 0,60	0,0409
C20	0,23 ± 0,02	0,19 ± 0,02	ns
n-9			
C18:1 (OA)	4,80 ± 0,18	3,60 ± 0,21	0,0001
C20:3	0,16 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,0011
n-7			
C16:1	0,34 ± 0,03	0,40 ± 0,05	ns
C18:1	5,53 ± 0,27	5,21 ± 0,30	ns
n-6			
C18:2 (LA)	17,55 ± 0,61	21,19 ± 0,75	0,0009
C18:3	0,07 ± 0,03	0,14 ± 0,01	0,0194
C20:2	0,23 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,0495
C20:3	0,50 ± 0,02	0,52 ± 0,03	ns
C20:4 (AA)	21,91 ± 0,71	15,74 ± 0,90	<0,0001
C22:4	0,41 ± 0,04	0,20 ± 0,05	0,0055
n-3			
C18:3 (ALA)	0,02 ± 0,01	0,41 ± 0,03	<0,0001
C20:5 (EPA)	0,17 ± 0,02	1,13 ± 0,07	<0,0001
C22:5 (DPA)	0,77 ± 0,07	2,12 ± 0,09	<0,0001
C22:6 (DHA)	2,55 ± 0,14	7,49 ± 0,34	<0,0001
Sommes			
Saturés	44,99 ± 0,91	41,56 ± 0,69	0,0234
Monoinsaturés (n-9 + n-7)	10,67 ± 0,45	9,21 ± 0,50	0,0479
AGPI (n-6 + n-3)	44,18 ± 1,04	49,13 ± 0,59	0,0013
AGPI n-6	40,67 ± 0,98	37,97 ± 0,60	0,0334
AGPI n-3	3,51 ± 0,20	11,15 ± 0,40	<0,0001
AGPI-TLC n-3	3,49 ± 0,20	10,74 ± 0,40	<0,0001
Rapports			
AGPI/saturés	0,988 ± 0,043	1,185 ± 0,031	0,0016
sn-6/sn-3	11,860 ± 0,689	3,446 ± 0,180	<0,0001
LA/ALA	433,862 ± 19,314	54,076 ± 4,924	<0,0001
sn-7/C18:2n-6	0,317 ± 0,017	0,246 ± 0,013	0,0043
C20:3n-9/C20:4n-6	0,007 ± 0,000	0,006 ± 0,001	ns
EPA/AA	0,008 ± 0,001	0,073 ± 0,004	<0,0001
C20:3n-6/C18:2n-6	0,038 ± 0,002	0,029 ± 0,001	0,0046

Tableau 28: Effets d'une supplémentation en AGPI n-3 sur la composition en acides gras de la phosphatidylcholine mitochondriale de cœur de rat.

AGPI (n-6 et n-3): acides gras polyinsaturés (oméga 6 et oméga 3 respectivement); AGPI-TLC n-3: acides gras polyinsaturés à très longues chaînes oméga 3. Moyenne ± SEM. Ns: non significatif.

PHOSPHATIDYLETHANOLAMINE			
Acides gras (%)	SAT (n=8)	OM3 (n=8)	p
Saturés			
C14	0,53 ± 0,04	0,24 ± 0,04	<0,0001
C16	11,15 ± 0,55	9,19 ± 0,40	0,0064
C18	32,11 ± 0,85	29,21 ± 0,78	0,0098
C20	0,28 ± 0,03	0,17 ± 0,01	0,0003
n-9			
C18:1 (OA)	5,19 ± 0,32	3,36 ± 0,16	<0,0001
C20:3	0,35 ± 0,03	0,12 ± 0,01	<0,0001
n-7			
C16:1	0,17 ± 0,03	0,14 ± 0,02	ns
C18:1	2,37 ± 0,13	1,93 ± 0,13	0,0293
n-6			
C18:2 (LA)	8,87 ± 0,51	8,93 ± 0,60	ns
C18:3	0,38 ± 0,03	0,47 ± 0,02	0,0247
C20:2	0,18 ± 0,02	0,11 ± 0,01	0,0052
C20:3	0,37 ± 0,03	0,21 ± 0,01	<0,0001
C20:4 (AA)	20,39 ± 0,05	11,71 ± 0,29	<0,0001
C22:4	1,07 ± 0,05	0,19 ± 0,01	<0,0001
n-3			
C18:3 (ALA)	0,01 ± 0,01	0,46 ± 0,03	<0,0001
C20:5 (EPA)	0,20 ± 0,02	1,24 ± 0,06	<0,0001
C22:5 (DPA)	1,41 ± 0,10	2,70 ± 0,14	<0,0001
C22:6 (DHA)	14,99 ± 0,54	29,59 ± 1,59	<0,0001
Sommes			
Saturés	44,06 ± 1,11	38,81 ± 1,08	0,0045
Monoinsaturés (n-9 + n-7)	7,73 ± 0,32	5,43 ± 0,30	<0,0001
AGPI (n-6 + n-3)	47,87 ± 1,10	55,61 ± 1,19	<0,0001
AGPI n-6	31,25 ± 0,84	21,62 ± 0,74	<0,0001
AGPI n-3	16,61 ± 0,62	33,99 ± 1,70	<0,0001
AGPI-TLC n-3	16,60 ± 0,62	33,53 ± 1,70	<0,0001
Rapports			
AGPI/saturés	1,095 ± 0,054	1,446 ± 0,069	0,0144
sn-6/sn-3	1,899 ± 0,084	0,655 ± 0,056	<0,0001
LA/ALA	132,760 ± 16,595	20,197 ± 1,957	<0,0001
sn-7/C18:2n-6	0,267 ± 0,008	0,216 ± 0,005	<0,0001
C20:3n-9/C20:4n-6	0,017 ± 0,002	0,011 ± 0,001	0,0029
EPA/AA	0,010 ± 0,001	0,106 ± 0,006	<0,0001
C20:3n-6/C18:2n-6	0,084 ± 0,010	0,038 ± 0,010	<0,0001

Tableau 29: Effets d'une supplémentation en AGPI n-3 sur la composition en acides gras de la phosphatidyléthanolamine mitochondriale de coeur de rat.

AGPI (n-6 et n-3): acides gras polyinsaturés (oméga 6 et oméga 3 respectivement); AGPI-TLC n-3: acides gras polyinsaturés à très longues chaînes oméga 3. Moyenne ± SEM, ns: non significatif.

Profil en acides gras de la CL

Le tableau 30 résume les résultats d'analyse de la composition en acides gras de la CL mitochondriale cardiaque dans les groupes SAT et OM3.

La CL apparaît principalement constituer de LA (SAT: $78,64 \pm 0,60\%$ vs OM3: $84,86 \pm 0,31\%$). Toutefois, la composition en acides gras de la CL est très différente entre les groupes SAT et OM3. Après une supplémentation en graisse de palme, la teneur en acides gras saturés de la CL a doublé (SAT= $11,96 \pm 0,42$ vs OM3= $5,56 \pm 0,14\%$), effet principalement dû à un fort enrichissement en C16 et C18 ($p < 0,0001$). Les acides gras monoinsaturés n-9 ont également significativement augmenté (+39,9%, $p < 0,0001$ vs OM3). A l'exception du LA, les teneurs de la CL en AGPI n-6 et AGPI n-3 sont faibles et varient de 0 (C18:3 n-6) à 0,83% (C20:3 n-6) pour le groupe SAT et de 0,03 (C18:3 n-6) à 1,53 (ALA) pour le groupe OM3. Toutefois des différences significatives sont à relever entre les deux groupes. En examinant plus en détails chaque AGPI, on se rend compte que la teneur en AGPI n-3 de la CL du groupe OM3 triple ($p < 0,0001$) au dépend d'un appauvrissement en AGPI-TLC n-6 (-28,5%). Comparés au groupe SAT, les valeurs des rapports n-6/n-3 et LA/ALA sont diminués respectivement d'un facteur 2,7 et 6,7 dans le groupe OM3 ($p < 0,0001$). Ces résultats signifie qu'après une supplémentation en Mix alpha 3®, l'ALA est l'AGPI n-3 préférentiellement incorporé dans la CL, il représente en effet 53,5% des AGPI n-3. Quant aux AGPI-TLC n-3, leurs teneurs sont également supérieures au groupe SAT ($p < 0,0001$): 4,3 fois plus d'EPA, 1,3 fois plus de DPA et DHA. En revanche, pour les AGPI n-6, c'est plus contrasté. La CL des rats OM3 s'enrichit légèrement en LA (+7,3%) et C18:3 n-6 (SAT= $0 \pm 0,00\%$ vs OM3= $0,03 \pm 0,02\%$) mais s'appauvrit fortement en AGPI-TLC n-6 à 20 carbones. D'ailleurs, ce contraste entre AGPI-TLC n-6 et n-3 est illustré par le rapport EPA/AA incroyablement élevé dans le groupe OM3 (SAT= $0,113 \pm 0,010$ vs OM3= $0,629 \pm 0,028$). Comparé à la PE des rats SAT, le rapport C20:3 n-6/C18:2 n-6 et la teneur en C20:3 n-6 baissent significativement de 50 et 28,9% dans la PE des rats OM3. Le métabolisme des AGPI-TLC est donc préférentiellement orienté vers la synthèse des AGPI-TLC n-3. Par ailleurs, la baisse du rapport C20:3 n-9/C20:4 n-6 (-35,3% vs SAT) montre qu'en plus du métabolisme des AGPI n-6, une supplémentation en AGPI n-3 induit des perturbations du métabolisme des acides gras n-9.

En résumé, l'ensemble de ces résultats nous a permis de vérifier d'une part qu'une supplémentation en AGPI n-3 induit des effets cardioprotecteurs comparables à ceux induits par une CCME (réduction de la nécrose post-infarctus) et d'autre part que des AGPI n-3 d'origine alimentaire entraînent un remodelage lipidique des membranes mitochondriales.

CARDIOLIPINE			
Acides gras (%)	SAT (n=8)	OM3 (n=8)	p
Saturés			
C14	0,41 ± 0,02	0,38 ± 0,02	ns
C16	4,89 ± 0,26	2,55 ± 0,15	<0,0001
C18	6,54 ± 0,29	2,50 ± 0,04	<0,0001
C20	0,12 ± 0,01	0,15 ± 0,01	ns
n-9			
C18:1 (OA)	2,58 ± 0,11	1,75 ± 0,13	<0,0001
C20:3	0,38 ± 0,03	0,06 ± 0,01	<0,0001
n-7			
C16:1	0,62 ± 0,04	0,70 ± 0,05	ns
C18:1	2,37 ± 0,12	2,42 ± 0,07	ns
n-6			
C18:2 (LA)	78,64 ± 0,60	84,86 ± 0,31	<0,0001
C18:3	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,02	0,0466
C20:2	0,64 ± 0,04	0,34 ± 0,03	0,0156
C20:3	0,83 ± 0,01	0,59 ± 0,03	<0,0001
C20:4 (AA)	0,72 ± 0,02	0,55 ± 0,02	<0,0001
C22:4	0,30 ± 0,02	0,27 ± 0,02	ns
n-3			
C18:3 (ALA)	0,21 ± 0,01	1,53 ± 0,12	<0,0001
C20:5 (EPA)	0,08 ± 0,01	0,34 ± 0,01	<0,0001
C22:5 (DPA)	0,25 ± 0,01	0,45 ± 0,03	<0,0001
C22:6 (DHA)	0,43 ± 0,02	0,54 ± 0,04	0,0092
Sommes			
Saturés	11,96 ± 0,42	5,56 ± 0,14	<0,0001
Monoinsaturés (n-9 + n-7)	5,57 ± 0,23	4,86 ± 0,24	0,0364
AGPI (n-6 + n-3)	82,10 ± 0,6	89,50 ± 0,36	<0,0001
AGPI n-6	81,13 ± 0,62	86,64 ± 0,28	<0,0002
AGPI n-3	0,97 ± 0,03	2,86 ± 0,17	<0,0001
AGPI-TLC n-3	0,76 ± 0,03	1,33 ± 0,07	<0,0001
Rapports			
AGPI/saturés	6,940 ± 0,298	14,260 ± 1,961	0,0004
sn-6/sn-3	84,720 ± 3,428	31,112 ± 1,921	<0,0001
LA/ALA	385,429 ± 25,931	57,940 ± 4,316	<0,0001
sn-7/C18:2n-6	0,030 ± 0,002	0,028 ± 0,001	ns
C20:3n-9/C20:4n-6	0,530 ± 0,049	0,109 ± 0,013	<0,0001
EPA/AA	0,113 ± 0,010	0,629 ± 0,028	<0,0001
C20:3n-6/C18:2n-6	0,015 ± 0,000	0,008 ± 0,000	<0,0001

Tableau 30: Effets d'une supplémentation en AGPI n-3 sur la composition en acides gras de la cardiolipine mitochondriale de cœur de rat.

AGPI (n-6 et n-3): acides gras polyinsaturés (oméga 6 et oméga 3 respectivement); AGPI-TLC n-3: acides gras polyinsaturés à très longues chaînes oméga 3. Moyenne ± SEM. Ns: non significatif.

VI. Résultats: effets de l'éthanol sur les lipides du sang et des mitochondries cardiaques

L'objectif de ce travail est de déterminer si la cardioprotection induite par une consommation modérée d'alcool équivaut à celle induite par la consommation d'AGPI n-3.

Nous avons vérifié que l'éthanol et les AGPI n-3 protègent le cœur contre la nécrose post-infarctus. Nous avons également validé qu'une supplémentation en AGPI n-3 entraîne un enrichissement en AGPI n-3 des membranes mitochondriales cardiaques. Si l'éthanol mime les effets cardioprotecteurs des AGPI n-3 (d'origine alimentaire), on peut supposer que l'éthanol mime également le remodelage lipidique mitochondrial induit par ces mêmes AGPI n-3. Cette présente section se propose donc de tester cette dernière hypothèse en procédant dans un premier temps à des analyses lipidiques sanguines puis dans un second temps à des analyses quantitatives et qualitatives des phospholipides de la mitochondrie cardiaque.

6.1. Analyse du profil lipido-lipoprotéinique plasmatique

Afin de mieux comprendre les mécanismes cardioprotecteurs induits par l'éthanol, des analyses lipido-lipoprotéiniques plasmatiques ont été menées après 7 et 18 semaines de consommation modérée d'éthanol afin de déterminer si l'éthanol interfère avec le métabolisme des acides. Les avantages de cette analyse sont d'une part que le plasma est un échantillon facile et rapide à isoler et d'autre part que le profil en acides gras plasmatiques est un indice du statut en acides gras essentiels et de leur métabolisme.

Après 7 semaines de consommation modérée d'éthanol

D'après le tableau 31, les triglycérides, le cholestérol et les HDL-cholestérol ont diminué respectivement de 26,5, 26,5 et 18,8% dans le groupe ETOH 12% comparés au groupe contrôle. Le profil en acides gras plasmatiques des rats ETOH 12% indique une quantité moindre d'acides gras saturés (-5,5%, $p < 0,0115$ vs contrôle) et cette baisse est dû principalement au C14 (-25%). Les acides gras monoinsaturés ne sont pas statistiquement modifiés. En revanche, les acides gras oméga 3 sont fortement remaniés (+20,8%, $p < 0,0001$ vs contrôle) et principalement en AGPI-TLC n-3 ($p < 0,0014$): l'EPA, le DPA et le DHA augmentent respectivement de 38,3%, 26% et 16,2% comparé au groupe contrôle.

Ce phénomène peut d'ailleurs être caractérisé par la hausse du rapport EPA/AA de 40,4% dans le groupe ETOH 12% comparé au groupe contrôle ($p < 0,0001$). Ces résultats traduisent probablement un shunt du métabolisme des AGPI-TLC n-6 vers celui des AGPI-TLC n-3. Cette inhibition semble d'avantage s'exprimer en aval de la synthèse du C20:3 n-6 car les

AGPI n-6 tendent à s'accumuler jusqu'au C20:3 comme l'atteste la valeur du rapport C20:3 n-6/C18:2 n-6 du groupe ETOH 12% (+23,3%). Cette synthèse privilégiée d'AGPI-TLC n-3 au dépend de celle des AGPI-TLC n-6 pourrait alors expliquer la baisse du rapport n-6/n-3 dans ce groupe ETOH 12% ($p < 0,0001$ vs contrôle)

Après 18 semaines de consommation modérée d'éthanol

D'après le tableau 32 et comparé au groupe contrôle, les triglycérides ont respectivement diminués de 39,5% après 18 semaines de CCME ($p=0,0075$) tandis que le cholestérol et les HDL-cholestérol ne sont pas modifiés. En ce qui concerne le profil en acides gras plasmatique, les acides gras monoinsaturés (n-7 et n-9) baissent de 15,4% après une CCME ($p=0,0024$ vs contrôle). Comparé au plasma des rats contrôles, les rapports AGPI/saturés et n6/n3 augmentent de 14,3% dans le plasma des rats ETOH 12%. En d'autres termes, le plasma contient moins d'acides gras saturés (-5,4%) et notamment moins de C16 (-6,1%, $p=0,0015$ vs contrôle) mais plus d'AGPI (+9,1%) et plus précisément des AGPI n-6 (+10,8%). L'augmentation des AGPI n-6 est très ciblée, elle s'étend du LA au C20:3 (+13,6% en moyenne) car au delà du C20:3, les AGPI n-6 diminuent et principalement le C22:4 (-26,3%, $p < 0,0001$ vs contrôle). Cette accumulation d'AGPI n-6 semble d'ailleurs perturber le métabolisme des acides gras monoinsaturés n-7 comme l'indique la baisse du rapport n-7/C18:2 n-6 (-34,4%, $p < 0,0001$ vs contrôle). Quant au total des AGPI n-3 plasmatiques, il est quantitativement comparable entre les deux groupes, mais qualitativement, des différences importantes sont à relever. L'EPA augmente de 19,5% ($p=0,0017$ vs contrôle) tandis que le DPA et le DHA chutent respectivement de 21 et 7% comparés au groupe contrôle. Il est donc fort probable que le métabolisme des AGPI-TLC à 22 carbones soit perturbé à la suite d'une CCME.

Lipides plasmatiques (g/l)	Contrôle (n=18)	ETOH 12% (n=20)	p
Triglycérides	1,40 ± 0,06	1,03 ± 0,09	0,0032
Cholestérol total	0,64 ± 0,02	0,47 ± 0,02	<0,0001
HDL-cholestérol	0,32 ± 0,01	0,26 ± 0,02	0,0034
Acides gras plasmatiques (%)			
Saturés			
C14	0,96 ± 0,08	0,75 ± 0,07	0,0447
C16	20,67 ± 0,44	19,83 ± 0,39	ns
C18	6,94 ± 0,17	6,70 ± 0,42	ns
C20	0,08 ± 0,01	0,10 ± 0,01	ns
n-9			
C18:1 (OA)	14,63 ± 0,35	14,26 ± 0,68	ns
C20:3	0,24 ± 0,01	0,22 ± 0,02	ns
n-7			
C16:1	4,87 ± 0,32	5,08 ± 0,49	ns
C18:1	5,52 ± 0,18	4,78 ± 0,30	0,0441
n-6			
C18:2 (LA)	22,92 ± 0,51	24,14 ± 0,57	ns
C18:3	0,31 ± 0,01	0,36 ± 0,03	ns
C20:2	0,32 ± 0,02	0,34 ± 0,02	ns
C20:3	0,74 ± 0,02	0,97 ± 0,05	<0,0001
C20:4 (AA)	16,54 ± 0,55	16,02 ± 1,17	ns
C22:4	0,54 ± 0,05	0,54 ± 0,03	ns
n-3			
C18:3 (ALA)	1,00 ± 0,06	1,22 ± 0,10	ns
C20:5 (EPA)	0,50 ± 0,02	0,81 ± 0,07	<0,0001
C22:5 (DPA)	0,57 ± 0,04	0,77 ± 0,04	0,0005
C22:6 (DHA)	2,69 ± 0,11	3,21 ± 0,18	0,0201
Sommes			
Saturés	29,44 ± 0,44	27,82 ± 0,43	0,0115
Monoinsaturés (n-9 + n-7)	25,01 ± 0,67	24,03 ± 1,37	ns
AGPI (n-6 + n-3)	46,12 ± 0,92	48,38 ± 1,52	ns
AGPI n-6	41,35 ± 0,80	42,37 ± 1,37	ns
AGPI n-3	4,76 ± 0,18	6,01 ± 0,19	<0,0001
AGPI-TLC n-3	3,76 ± 0,16	4,78 ± 0,25	0,0014
Rapports			
AGPI/saturés	1,580 ± 0,051	1,754 ± 0,069	0,0493
sn-6/sn-3	8,831 ± 0,236	7,095 ± 0,170	<0,0001
LA/ALA	23,870 ± 0,970	21,830 ± 1,560	0,2765
sn-7/C18:2n-6	0,464 ± 0,029	0,413 ± 0,037	ns
C20:3n-9/C20:4n-6	0,015 ± 0,001	0,015 ± 0,001	ns
EPA/AA	0,031 ± 0,002	0,052 ± 0,003	<0,0001
C20:3n-6/C18:2n-6	0,033 ± 0,001	0,043 ± 0,002	0,0014

Tableau 31: Effets de l'éthanol sur le profil lipido-lipoprotéinique du plasma après 7 semaines de consommation d'éthanol.

AGPI (n-6 et n-3): acides gras polyinsaturés (oméga 6 et oméga 3 respectivement); AGPI-TLC n-3: acides gras polyinsaturés à très longues chaînes oméga 3. Moyenne ± SEM. Ns: non significatif.

Lipides plasmatiques (g/l)	Contrôle (n=20)	ETOH 12% (n=22)	p
Triglycérides	1,70 ± 0,11	1,03 ± 0,09	0,0075
Cholestérol total	0,57 ± 0,04	0,51 ± 0,03	ns
HDL-cholestérol	0,37 ± 0,02	0,38 ± 0,02	ns
Acides gras plasmatiques (%)			
Saturés			
C14	0,99 ± 0,06	0,95 ± 0,04	ns
C16	22,24 ± 0,28	20,89 ± 0,28	0,0015
C18	5,29 ± 0,23	5,09 ± 0,17	ns
C20	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,01	ns
n-9			
C18:1 (OA)	13,30 ± 0,48	11,84 ± 0,27	0,0101
C20:3	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,00	ns
n-7			
C16:1	4,37 ± 0,39	3,39 ± 0,18	0,0217
C18:1	4,18 ± 0,19	3,25 ± 0,10	<0,0001
n-6			
C18:2 (LA)	26,74 ± 0,52	31,33 ± 0,33	<0,0001
C18:3	0,25 ± 0,02	0,31 ± 0,01	0,0026
C20:2	0,37 ± 0,02	0,36 ± 0,01	ns
C20:3	0,55 ± 0,03	0,66 ± 0,02	0,0033
C20:4 (AA)	13,09 ± 0,89	13,49 ± 0,48	ns
C22:4	0,38 ± 0,02	0,28 ± 0,01	<0,0001
n-3			
C18:3 (ALA)	1,42 ± 0,05	1,52 ± 0,04	ns
C20:5 (EPA)	1,41 ± 0,08	1,73 ± 0,06	0,0017
C22:5 (DPA)	1,14 ± 0,04	0,90 ± 0,04	<0,0001
C22:6 (DHA)	4,12 ± 0,09	3,83 ± 0,10	0,0432
Sommes			
Saturés	28,58 ± 0,26	27,02 ± 0,36	0,0012
Monoinsaturés (n-9 + n-7)	21,85 ± 0,96	18,49 ± 0,48	0,0024
AGPI (n-6 + n-3)	49,47 ± 1,03	54,40 ± 0,64	0,0002
AGPI n-6	41,38 ± 1,08	46,41 ± 0,62	0,0002
AGPI n-3	8,09 ± 0,15	7,98 ± 0,17	ns
AGPI-TLC n-3	6,67 ± 0,14	6,46 ± 0,15	ns
Rapports			
AGPI/saturés	1,736 ± 0,045	2,025 ± 0,046	<0,0001
sn-6/sn-3	5,026 ± 0,256	5,865 ± 0,137	0,0051
LA/ALA	19,390 ± 0,820	20,880 ± 0,540	ns
sn-7/C18:2n-6	0,326 ± 0,025	0,214 ± 0,010	<0,0001
C20:3n-9/C20:4n-6	0,008 ± 0,001	0,008 ± 0,000	ns
EPA/AA	0,122 ± 0,015	0,131 ± 0,006	ns
C20:3n-6/C18:2n-6	0,025 ± 0,001	0,024 ± 0,001	ns

Tableau 32: Effets de l'éthanol sur le profil lipido-lipoprotéinique du plasma après 18 semaines de consommation d'éthanol.

AGPI (n-6 et n-3): acides gras polyinsaturés (oméga 6 et oméga 3 respectivement); AGPI-TLC n-3: acides gras polyinsaturés à très longues chaînes oméga 3. Moyenne ± SEM. Ns: non significatif.

Influence du temps et du traitement sur le profil lipido-lipoprotéinique plasmatique

Il est intéressant de déterminer l'influence du facteur temps (= âge des animaux et durée du traitement) et du facteur traitement sur le profil lipido-lipoprotéinique plasmatique après 7 et 18 semaines de consommation modérée d'éthanol. Une ANOVA à 2 facteurs a donc été réalisée pour répondre à cette objectif. Les résultats sont résumés dans le tableau 33.

Lipoprotéines

L'interaction des facteurs temps et traitement influe uniquement sur le taux de cholestérol ($p=0,0388$). Toutefois, une CCME (facteur traitement) semble d'avantage plus puissante pour baisser le cholestérol ($p=0,0003$) et les triglycérides ($p=0,0191$). Enfin, on peut relever que les HDL augmentent avec le temps ($p<0,0001$).

Acides gras saturés

Les acides gras saturés plasmatiques diminuent avec une CCME ($p=0,0007$) et avec le temps ($p=0,0227$). C16 semble d'ailleurs le seul acide gras saturé sensible à ces 2 facteurs. Quant au C18, il semble le plus sensible aux influences du facteur temps ($p<0,0001$).

Acides gras monoinsaturés

Tous les acides gras monoinsaturés ($p<0,0001$), à savoir C16:1 n-7 ($p=0,0067$) et surtout le C18:1 n-7 ($p<0,0001$) et n-9 ($p=0,0004$) diminuent avec le temps. Une CCME semble également significativement influencer sur la baisse des acides gras monoinsaturés à 18 carbones.

AGPI

Une CCME influe sur la teneur en AGPI ($p=0,0020$). Plus précisément, les AGPI n-6 (C18:2, C18:3, C20:3 principalement) et les AGPI n-3 (C18:3 et AGPI-TLC n-3 comme le C20:5) augmentent significativement avec une CCME. L'augmentation des AGPI, à savoir AGPI n-3 (C18:3 et AGPI-TLC n-3) et du C18:2 n-6 est également significativement influencée par le temps. En revanche, le C20:3 n-9 et les AGPI-TLC n-6 diminuent avec le temps. Enfin, l'interaction des facteurs temps et traitement influent uniquement sur les teneurs en C18:2 n-6 ($0,0027$) et en AGPI-TLC n-3 ($p=0,0024$): C22:6 ($p=0,0035$) et surtout C22:5 ($p<0,0001$).

Tableau 33: Comparaison du profil lipido-lipoprotéinique plasmatique après 7 et 18 semaines de consommation modérée d'éthanol par une ANOVA à 2 facteurs

		C14	C16	C18	C20	Saturés
7 semaines	Contrôle	0,96 ± 0,08	20,67 ± 0,44	6,94 ± 0,17	0,08 ± 0,01	29,44 ± 0,44
	ETOH 12%	0,75 ± 0,07	19,83 ± 0,39	6,70 ± 0,42	0,10 ± 0,01	27,82 ± 0,43
18 semaines	Contrôle	0,99 ± 0,06	22,24 ± 0,28	5,29 ± 0,23	0,09 ± 0,01	28,58 ± 0,26
	ETOH 12%	0,95 ± 0,04	20,89 ± 0,28	5,09 ± 0,17	0,10 ± 0,01	27,02 ± 0,36
ANOVA	facteurs temps + traitement	ns	ns	ns	ns	ns
	facteur temps	ns	0,0002	<0,0001	ns	0,0227
	facteur traitement	ns	0,0099	ns	ns	0,0007

		C16:1 n-7	C18:1 n-7	C18:1 n-9	Monoinsaturés	C20:3 n-9
7 semaines	Contrôle	4,87 ± 0,32	5,51 ± 0,18	14,63 ± 0,35	25,01 ± 0,67	0,24 ± 0,01
	ETOH 12%	5,08 ± 0,49	4,78 ± 0,30	14,26 ± 0,68	24,03 ± 1,37	0,22 ± 0,02
18 semaines	Contrôle	4,37 ± 0,39	4,18 ± 0,19	13,30 ± 0,48	21,85 ± 0,96	0,10 ± 0,06
	ETOH 12%	3,39 ± 0,18	3,25 ± 0,10	11,84 ± 0,27	18,49 ± 0,48	0,10 ± 0,00
ANOVA	facteurs temps + traitement	ns	ns	ns	ns	ns
	facteur temps	0,0067	<0,0001	0,0004	<0,0001	<0,0001
	facteur traitement	ns	0,0001	0,0379	0,0172	ns

		C18:2 n-6	C18:3 n-6	C20:2 n-6	C20:3 n-6	C20:4 n-6	C22:4 n-6	AGPI n-6
7 semaines	Contrôle	22,92 ± 0,51	0,31 ± 0,01	0,32 ± 0,02	0,74 ± 0,02	16,54 ± 0,55	0,54 ± 0,05	41,35 ± 0,80
	ETOH 12%	24,14 ± 0,57	0,36 ± 0,03	0,34 ± 0,02	0,97 ± 0,05	16,02 ± 1,17	0,54 ± 0,03	42,37 ± 1,37
18 semaines	Contrôle	26,74 ± 0,52	0,25 ± 0,02	0,37 ± 0,02	0,55 ± 0,03	13,09 ± 0,89	0,38 ± 0,02	41,38 ± 1,08
	ETOH 12%	31,33 ± 0,33	0,31 ± 0,01	0,36 ± 0,01	0,66 ± 0,02	13,49 ± 0,48	0,28 ± 0,01	46,41 ± 0,62
ANOVA	facteurs temps + traitement	0,0027	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	facteur temps	<0,0001	0,0004	0,0249	<0,0001	0,0005	<0,0001	ns
	facteur traitement	<0,0001	0,0072	ns	<0,0001	ns	ns	0,0051

		C18:3 n-3	C20:5 n-3	C22:5 n-3	C22:6 n-3	AGPI n-3	AGPI-TLC n-3	PUFA
7 semaines	Contrôle	1,01 ± 0,06	0,50 ± 0,02	0,57 ± 0,04	2,69 ± 0,11	4,76 ± 0,18	3,76 ± 0,16	46,11 ± 0,92
	ETOH 12%	1,22 ± 0,10	0,81 ± 0,07	0,77 ± 0,04	3,21 ± 0,18	6,01 ± 0,19	4,78 ± 0,25	48,38 ± 1,51
18 semaines	Contrôle	1,42 ± 0,05	1,41 ± 0,08	1,14 ± 0,04	4,12 ± 0,09	8,09 ± 0,15	6,67 ± 0,14	49,47 ± 1,03
	ETOH 12%	1,52 ± 0,04	1,73 ± 0,06	0,90 ± 0,04	3,83 ± 0,10	7,98 ± 0,17	6,46 ± 0,15	54,40 ± 0,65
ANOVA	facteurs temps + traitement	ns	ns	<0,0001	0,0035	0,0006	0,0024	ns
	facteur temps	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0001
	facteur traitement	0,0016	<0,0001	ns	ns	0,0018	0,0404	0,0020

		Triglycérides	Cholestérol total	HDL-cholestérol
7 semaines	Contrôle	1,40 ± 0,06	0,64 ± 0,02	0,32 ± 0,01
	ETOH 12%	1,03 ± 0,09	0,47 ± 0,02	0,26 ± 0,02
18 semaines	Contrôle	1,70 ± 0,12	0,57 ± 0,04	0,37 ± 0,02
	ETOH 12%	1,03 ± 0,09	0,51 ± 0,03	0,38 ± 0,02
ANOVA	facteurs temps + traitement	ns	0,0388	ns
	Facteur temps	0,0010	ns	<0,0001
	Facteur traitement	0,0161	0,0003	ns

Acides gras exprimés en pourcentage des acides gras totaux.

AGPI (n-6 et n-3): acides gras polyinsaturés (oméga 6 et oméga 3 respectivement); AGPI-TLC n-3: acides gras polyinsaturés à très longues chaînes oméga 3. Moyenne ± SEM. Ns: non significatif.

6.2. Analyse du profil lipidique des globules rouges

Nous avons observé une induction des acides gras oméga 3 plasmatiques suggérant que l'éthanol interagit effectivement avec le métabolisme des acides gras. Ces résultats sont donc encourageants. Afin de déterminer si la cardioprotection induite par l'éthanol passe par une modification de la composition en acides gras des membranes cardiaques (et plus exactement des membranes mitochondriales), nous avons procédé à une analyse préliminaire du profil lipidique des GR. En plus d'être faciles et rapides à isoler, ces cellules ont une demi-vie courte et sont donc susceptibles d'être de bons marqueurs des modifications induites par une CCME. Enfin, le profil lipidique des GR est un très bon indice de la composition en acides gras des membranes cardiaques.

Après 7 semaines de consommation modérée d'éthanol

D'après les données du tableau 34, les membranes des GR des rats contrôles et ETOH 12% sont principalement constituées d'AA, C16, LA et C18. Cependant des différences sont à relever entre les deux groupes. Les membranes érythrocytaires des rats ETOH 12% sont enrichies en C20 (+37,5), en C20:3 n-6 (+17,3%), en ALA (+31,3%) et en EPA (+19%) par rapport au groupe contrôle. On note également une augmentation du rapport EPA/AA (+23,1%, p=0,0007 vs contrôle) et une baisse du rapport LA/ALA (-20,1%, p=0,0467 vs contrôle). Ces deux rapports permettent de caractériser la voie métabolique privilégiée par les désaturases. Suivant la disponibilité en LA et ALA, cet enzyme utilise préférentiellement l'un de ces 2 acides gras précurseurs pour privilégier soit la synthèse des AGPI-TLC n-6 soit privilégier la synthèse des AGPI-TLC n-3. Dans cas cas-ci, il est donc fort probable que la synthèse des AGPI-TLC n-3 à partir du ALA soit privilégiée et ce, au dépend de celle des AGPI-TLC n-6 à partir du LA (donc stimulation des désaturases Δ^6 et Δ^5).

Comparé au profil plasmatique, les différences inter-groupes sont qualitativement moins importantes dans les GR probablement en raison d'une durée d'exposition à l'éthanol trop brève pour voir apparaître une différence dans les phospholipides des GR.

GLOBULES ROUGES			
Acides gras (%)	Contrôle (n=18)	ETOH 12% (n=20)	p
Saturés			
C14	0,28 ± 0,02	0,43 ± 0,06	ns
C16	25,20 ± 0,33	26,05 ± 0,60	ns
C18	13,72 ± 0,48	13,14 ± 0,30	ns
C20	0,10 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,0149
n-9			
C18:1 (OA)	6,78 ± 0,16	7,29 ± 0,24	ns
C20:3	0,14 ± 0,03	0,13 ± 0,01	ns
n-7			
C16:1	0,78 ± 0,08	1,03 ± 0,11	ns
C18:1	4,73 ± 0,19	4,41 ± 0,12	ns
n-6			
C18:2 (LA)	10,23 ± 0,20	10,36 ± 0,20	ns
C18:3	0,07 ± 0,00	0,07 ± 0,01	ns
C20:2	0,34 ± 0,01	0,35 ± 0,01	ns
C20:3	0,72 ± 0,03	0,87 ± 0,03	0,0038
C20:4 (AA)	29,65 ± 0,57	28,19 ± 0,71	ns
C22:4	2,12 ± 0,06	2,11 ± 0,10	ns
n-3			
C18:3 (ALA)	0,11 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,0193
C20:5 (EPA)	0,30 ± 0,02	0,37 ± 0,02	0,0068
C22:5 (DPA)	1,58 ± 0,06	1,79 ± 0,11	ns
C22:6 (DHA)	3,15 ± 0,09	3,13 ± 0,12	ns
Sommes			
Saturés	39,30 ± 0,66	39,75 ± 0,80	ns
Monoinsaturés (n-9 + n-7)	12,28 ± 0,34	12,72 ± 0,41	ns
AGPI (n-6 + n-3)	48,27 ± 0,73	47,39 ± 1,09	ns
AGPI n-6	43,14 ± 0,66	41,95 ± 0,90	ns
AGPI n-3	5,14 ± 0,13	5,44 ± 0,21	ns
AGPI-TLC n-3	5,03 ± 0,13	5,29 ± 0,21	ns
Rapports			
AGPI/saturés	1,235 ± 0,036	1,210 ± 0,045	ns
sn-6/sn-3	8,437 ± 0,186	7,856 ± 0,200	ns
LA/ALA	99,190 ± 5,250	78,440 ± 6,920	0,0467
sn-7/C18:2n-6	0,541 ± 0,026	0,533 ± 0,026	ns
C20:3n-9/C20:4n-6	0,005 ± 0,001	0,005 ± 0,001	ns
EPA/AA	0,010 ± 0,001	0,013 ± 0,001	0,0007
C20:3n-6/C18:2n-6	0,071 ± 0,003	0,088 ± 0,004	0,0030

Tableau 35: Effets de l'éthanol sur le profil lipidique des globules rouges après 7 semaines de consommation d'éthanol. AGPI (n-6 et n-3): acides gras polyinsaturés (oméga 6 et oméga 3 respectivement); AGPI-TLC n-3: acides gras polyinsaturés à très longues chaînes oméga 3. Moyenne ± SEM. Ns: non significatif.

Après 18 semaines de consommation modérée d'éthanol

D'après le tableau 35, les membranes érythrocytaires des rats contrôles et ETOH 12% sont principalement constituées d'AA, C16, LA et C18. Après 7 et 18 semaines de consommation modérée d'éthanol, les profils lipidiques des GR paraissent donc qualitativement comparables. Cependant, quantitativement, c'est différent. Comme l'indique la hausse du rapport saturés/AGPI (+9% vs contrôle), les GR des rats ETOH 12% contiennent 5,5% de moins d'acides gras saturés avec notamment baisse significative du C16 ($p=0,0026$) et du C20 ($p=0,0250$) mais sont enrichis en AGPI. En effet, après une CCME, on observe une augmentation des AGPI n-3 ($p=0,0078$ vs contrôle) et plus précisément des AGPI-TLC n-3 (+8%, $p=0,0059$) avec une préférence significative pour le DHA (+7,6%). Quant aux AGPI n-6, on relève des remaniements importants dans les GR des rats éthanol: baisse du C20:2 (-16,7%), hausse du LA (+6,7%), du C20:3 (+24,1%) et du C22:4 (+13,9%) comparés aux GR contrôles.

Les rapports LA/ALA et C20:3 n-6/C18:2 n-6 augmentent respectivement de 21,3 et 19,2% dans le groupe ETOH 12% et les teneurs en AGPI-TLC n-6 et n-3 sont également largement supérieures au groupe contrôle. Par ailleurs, la teneur en LA reste élevée dans le groupe ETOH 12% même avec une teneur en AGPI-TLC n-6 supérieure à celle du groupe contrôle. Le métabolisme des AGPI-TLC apparaît donc fortement remanié après 18 semaines de consommation modérée d'éthanol.

GLOBULES ROUGES			
Acides gras (%)	Contrôle (n=20)	ETOH 12% (n=22)	p
Saturés			
C14	0,41 ± 0,04	0,36 ± 0,03	ns
C16	27,12 ± 0,44	25,77 ± 0,16	0,0026
C18	11,01 ± 0,30	10,34 ± 0,25	ns
C20	0,16 ± 0,02	0,11 ± 0,01	0,0250
n-9			
C18:1 (OA)	6,25 ± 0,25	6,57 ± 0,13	ns
C20:3	0,07 ± 0,02	0,08 ± 0,00	ns
n-7			
C16:1	1,06 ± 0,11	1,08 ± 0,08	ns
C18:1	4,37 ± 0,17	4,01 ± 0,10	ns
n-6			
C18:2 (LA)	11,76 ± 0,26	12,60 ± 0,25	0,0285
C18:3	0,07 ± 0,00	0,07 ± 0,00	ns
C20:2	0,30 ± 0,02	0,25 ± 0,01	0,0220
C20:3	0,63 ± 0,06	0,83 ± 0,03	0,0017
C20:4 (AA)	28,07 ± 0,52	28,25 ± 0,25	ns
C22:4	1,36 ± 0,05	1,58 ± 0,04	0,0023
n-3			
C18:3 (ALA)	0,20 ± 0,02	0,17 ± 0,01	ns
C20:5 (EPA)	0,76 ± 0,04	0,86 ± 0,04	ns
C22:5 (DPA)	2,02 ± 0,06	2,18 ± 0,06	ns
C22:6 (DHA)	4,52 ± 0,09	4,89 ± 0,12	0,0235
Sommes			
Saturés	38,69 ± 0,48	36,58 ± 0,33	0,0007
Monoinsaturés (n-9 + n-7)	11,60 ± 0,46	11,66 ± 0,24	ns
AGPI (n-6 + n-3)	49,68 ± 0,66	51,68 ± 0,44	0,0134
AGPI n-6	42,18 ± 0,60	43,58 ± 0,35	ns
AGPI n-3	7,50 ± 0,11	8,10 ± 0,16	0,0078
AGPI-TLC n-3	7,30 ± 0,12	7,93 ± 0,16	0,0059
Rapports			
AGPI/saturés	1,289 ± 0,030	1,417 ± 0,023	0,0017
sn-6/sn-3	5,659 ± 0,087	5,417 ± 0,107	ns
LA/ALA	58,420 ± 4,960	74,230 ± 4,470	0,0357
sn-7/C18:2n-6	0,466 ± 0,024	0,409 ± 0,017	ns
C20:3n-9/C20:4n-6	0,002 ± 0,001	0,003 ± 0,000	ns
EPA/AA	0,027 ± 0,002	0,030 ± 0,001	ns
C20:3n-6/C18:2n-6	0,059 ± 0,005	0,073 ± 0,003	0,0105

Tableau 36: Effets de l'éthanol sur le profil lipidique des globules rouges après 18 semaines de consommation d'éthanol.

AGPI (n-6 et n-3): acides gras polyinsaturés (oméga 6 et oméga 3 respectivement); AGPI-TLC n-3: acides gras polyinsaturés à très longues chaînes oméga 3. Moyenne ± SEM. Ns: non significatif.

Influence du temps et du traitement sur le profil lipidique des globules rouges

L'influence du facteur temps et/ou du facteur traitement sur le profil lipidique des érythrocytaires des groupes contrôles et ETOH 12%, après 7 et 18 semaines de consommation modérée d'éthanol, a été déterminée par une ANOVA à 2 facteurs. Les résultats sont résumés dans le tableau 36.

Acides gras saturés

Les membranes érythrocytaires contiennent moins d'acides gras saturés ($p=0,0072$) avec le temps. Le C18 est le seul acide gras saturé dont la teneur est influencée par une CCME ($p=0,0486$) et surtout par le temps ($p<0,0001$).

Acides gras monoinsaturés

Les membranes érythrocytaires contiennent moins d'acides gras monoinsaturés ($p=0,0216$) avec le temps. Les baisses en C18:1 n-7 et n-9 sont d'ailleurs significativement influencées par le temps. Toutefois, le C18:1 n-9 est le seul acide gras monoinsaturé qui augmente après une CCME ($p=0,0391$).

AGPI

Les membranes des GR s'enrichissent en AGPI avec le temps ($p=0,0024$) d'ailleurs le C18:2 n-6 et tous les AGPI-n-3 (donc C18:3 n-3 et tous les AGPI-TLC n-3) sont significativement les plus sensibles. En revanche, l'effet contraire est observé avec les AGPI-TLC: C20:3 n-9 ($p=0,0010$), C20:2 n-6 ($<0,0001$) et C22:4 n-6 ($p<0,0001$). Quant à la consommation d'éthanol, elle semble relier à l'enrichissement des GR en C18:2 n-6 ($p=0,0271$), C20:3 n-6 ($p<0,0001$), AGPI n-3 ($p=0,0072$) et plus précisément en AGPI-TLC n-3 comme le C20:5 ($p=0,0108$) et C22:5 ($p=0,0100$). Enfin, la teneur des GR en C20:2 n-6 est la seule influencée par l'interaction des facteurs temps et traitement ($p=0,0059$).

**Tableau 36: Comparaison du profil lipidique des globules rouges
par une ANOVA à 2 facteurs**

		C14	C16	C18	C20	Saturés
7 semaines	Contrôle	0,280 ± 0,024	25,20 ± 0,33	13,72 ± 0,48	0,10 ± 0,01	39,30 ± 0,66
	ETOH 12%	0,433 ± 0,061	26,05 ± 0,60	13,14 ± 0,30	0,12 ± 0,01	39,75 ± 0,80
18 semaines	Contrôle	0,407 ± 0,041	27,12 ± 0,44	11,01 ± 0,30	0,16 ± 0,02	38,69 ± 0,47
	ETOH 12%	0,364 ± 0,026	25,77 ± 0,16	10,34 ± 0,25	0,11 ± 0,01	36,58 ± 0,33
ANOVA	facteurs temps + traitement	ns	ns	ns	ns	ns
	facteur temps	ns	ns	<0,0001	ns	0,0072
	facteur traitement	ns	ns	0,0486	ns	ns

		C16:1 n-7	C18:1 n-7	C18:1 n-9	Monoinsaturés	C20:3 n-9
7 semaines	Contrôle	0,78 ± 0,08	4,73 ± 0,19	6,78 ± 0,16	12,28 ± 0,34	0,14 ± 0,03
	ETOH 12%	1,03 ± 0,11	4,41 ± 0,12	7,29 ± 0,24	12,73 ± 0,41	0,13 ± 0,01
18 semaines	Contrôle	1,06 ± 0,11	4,37 ± 0,17	6,25 ± 0,25	11,60 ± 0,46	0,07 ± 0,02
	ETOH 12%	1,08 ± 0,08	4,01 ± 0,10	6,57 ± 0,13	11,66 ± 0,24	0,08 ± 0,00
ANOVA	facteurs temps + traitement	ns	ns	ns	ns	ns
	facteur temps	ns	0,0024	0,0079	0,0216	0,0010
	facteur traitement	ns	ns	0,0391	ns	ns

	C18:2 n-6	C18:3 n-6	C20:2 n-6	C20:3 n-6	C20:4 n-6	C22:4 n-6	AGPI n-6
7 semaines							
Contrôle	10,23 ± 0,20	0,07 ± 0,00	0,34 ± 0,01	0,72 ± 0,03	29,51 ± 0,57	2,12 ± 0,06	43,14 ± 0,66
ETOH 12%	10,36 ± 0,20	0,07 ± 0,01	0,35 ± 0,01	0,87 ± 0,03	28,19 ± 0,71	2,11 ± 0,10	41,95 ± 0,90
18 semaines							
Contrôle	11,76 ± 0,26	0,07 ± 0,00	0,30 ± 0,02	0,63 ± 0,06	28,07 ± 0,52	1,36 ± 0,05	42,18 ± 0,60
ETOH 12%	12,60 ± 0,25	0,07 ± 0,00	0,25 ± 0,01	0,83 ± 0,03	28,25 ± 0,25	1,58 ± 0,04	43,58 ± 0,35
ANOVA							
facteurs temps+traitement	ns	ns	0,0059	ns	ns	ns	ns
facteur temps	<0,0001	ns	<0,0001	ns	ns	<0,0001	ns
facteur traitement	0,0271	ns	ns	<0,0001	ns	ns	ns

	C18:3 n-3	C20:5 n-3	C22:5 n-3	C22:6 n-3	AGPI n-3	AGPI-TLC n-3	PUFA
7 semaines							
Contrôle	0,11 ± 0,01	0,30 ± 0,02	1,58 ± 0,06	3,15 ± 0,09	5,14 ± 0,13	5,03 ± 0,13	48,27 ± 0,73
ETOH 12%	0,16 ± 0,02	0,37 ± 0,02	1,79 ± 0,11	3,13 ± 0,11	5,44 ± 0,21	5,29 ± 0,21	47,39 ± 1,09
18 semaines							
Contrôle	0,20 ± 0,02	0,76 ± 0,04	2,02 ± 0,06	4,52 ± 0,09	7,50 ± 0,11	7,30 ± 0,12	49,68 ± 0,66
ETOH 12%	0,17 ± 0,01	0,86 ± 0,04	2,18 ± 0,06	4,89 ± 0,12	8,10 ± 0,16	7,93 ± 0,16	51,68 ± 0,44
ANOVA							
facteurs temps+traitement	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
facteur temps	0,0040	<0,0001	0,0003	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0024
facteur traitement	ns	0,0108	0,0100	ns	0,0072	0,0090	ns

Acides gras exprimés en pourcentage des acides gras totaux.

AGPI (n-6 et n-3): acides gras polyinsaturés (oméga 6 et oméga 3 respectivement); AGPI-TLC n-3: acides gras polyinsaturés à très longues chaînes oméga 3. Moyenne ± SEM. Ns: non significatif.

6.3. Analyse quantitative des phospholipides mitochondriaux

Ces résultats préliminaires sur plasma et GR sont encourageants et renforcent notre hypothèse sur l'existence d'une interaction entre l'éthanol et les acides gras des membranes cardiaques et plus spécifiquement au niveau des membranes mitochondriales. Pour mener à bien cette étude sur éthanol et lipides de la mitochondrie, il est important de tenir compte d'un facteur essentiel, le temps. En effet, toutes les analyses sur mitochondries présentées ci-après, sont réalisées après 18 semaines de consommation modérée d'éthanol. Une telle durée de traitement semble indispensable pour:

- s'assurer que l'éthanol induise des modifications significatives sur les phospholipides mitochondriaux
- s'assurer du turn-over complet de tous les phospholipides mitochondriaux
- s'assurer que ces modifications se retrouvent dans tous les phospholipides de toutes les mitochondries cardiaques.

La première analyse lipidique consiste à quantifier les 3 principaux phospholipides des mitochondries cardiaques: PC, PE et CL (tableau 37).

Après 18 semaines de consommation modérée d'éthanol, les proportions en PC, PE et CL des membranes mitochondriales cardiaques ne sont pas modifiées. La PC, la PE et la CL représentent respectivement environ 49%, 36% et 15% des phospholipides de la mitochondries.

	Contrôle (n=6)	ETOH 12% (n=6)	p
Phosphatidylcholine			
µg/mg protéines	117,0 ± 4,2	111,8 ± 5,8	ns
%	48,4 ± 0,9	48,9 ± 1,0	ns
Phosphatidyléthanolamine			
µg/mg protéines	88,4 ± 3,6	82,5 ± 6,7	ns
%	36,5 ± 0,8	35,2 ± 1,2	ns
Cardiolipine			
µg/mg protéines	36,6 ± 3,2	35,7 ± 2,6	ns
%	15,1 ± 0,7	15,6 ± 0,5	ns

Tableau 38: Distribution des principaux phospholipides dans la mitochondrie de cœur de rats après 18 semaines de consommation d'éthanol.

Moyenne ± SEM. Ns: non significatif.

6.4. Analyse du profil en acides gras des phospholipides de la mitochondrie cardiaque

Une deuxième analyse lipidique consiste à étudier la composition en acides gras des 3 principaux phospholipides des mitochondries cardiaques: PC, PE et CL, après 18 semaines de consommation modérée d'éthanol

Profil en acides gras de la PC

Le tableau 38 résume les résultats de la composition en acides gras de la PC mitochondriale cardiaque dans les groupes contrôle et ETOH 12%.

La PC apparaît principalement constituée de C18, C16, LA et AA toutefois des différences quantitatives sont à relever entre les deux groupes. Comparé au groupe contrôle, on observe une augmentation significative des AGPI n-3 dans le groupe ETOH 12% (contrôle= $2,82 \pm 0,17\%$ vs ETOH 12%= $3,54 \pm 0,18\%$), et plus précisément en ALA (+42,9%, $p=0,0177$ vs contrôle) et en AGPI-TLC n-3 (contrôle= $2,73 \pm 0,17\%$ vs ETOH 12%= $3,40 \pm 0,16\%$) dont du DHA (+23,2%, $p=0,0120$ vs contrôle). En revanche, les AGPI n-6 tendent à légèrement diminuer après une CCME (principalement du LA et de l'AA). Ces remaniements sur AGPI expliquent donc la baisse du rapport n-6/n-3 (-25,1%) observée dans la PC des rats ETOH 12%.

Profil en acides gras de la PE

Le tableau 39 résume les résultats de la composition en acides gras de la PE mitochondriale cardiaque dans les groupes contrôle et ETOH 12%.

La PE apparaît principalement constituée de C18, AA, DHA, C16 et LA toutefois des différences quantitatives sont à relever entre les deux groupes. Comme l'indique les valeurs du rapport n-7/C18:2 n-6 (contrôle= $0,404 \pm 0,013$ vs ETOH 12%= $0,345 \pm 0,010$), les acides gras monoinsaturés n-7 semblent être remaniés après une CCME: hausse du C16:1 (+23,4%, $p=0,0172$ vs contrôle), baisse du C18:1 (-21,3%, $p=0,0424$ vs contrôle). En ce qui concerne les AGPI, on relève uniquement une augmentation significative du C20:3 n-9 et du C20:2 n-6 dans le groupe ETOH 12% (respectivement +27,8% et +27,3% vs contrôle). Néanmoins, bien que la différence ne soit pas significative, la PE des cœurs ETOH 12% tend à s'enrichir en AGPI n-3 et principalement en AGPI-TLC n-3 (DHA majoritairement) et ce, au dépend d'un léger appauvrissement en AGPI n-6 (principalement LA et AA). Le métabolisme des AGPI-TLC n-6 semble également perturbé par la stimulation du métabolisme des AGPI n-9 comme l'indique la hausse du rapport C20:3 n-9/C20:4 n-6 après 18 semaines de consommation modérée d'éthanol (contrôle= $0,014 \pm 0,001$ vs ETOH 12%= $0,021 \pm 0,001$).

PHOSPHATIDYLCHOLINE			
Acides gras (%)	Contrôle (n=6)	ETOH 12% (n=6)	p
Saturés			
C14	0,59 ± 0,07	0,64 ± 0,06	ns
C16	20,58 ± 0,32	20,53 ± 0,30	ns
C18	25,21 ± 0,76	25,50 ± 0,25	ns
C20	0,28 ± 0,01	0,30 ± 0,02	ns
n-9			
C18:1 (OA)	5,00 ± 0,34	5,67 ± 0,47	ns
C20:3	0,34 ± 0,03	0,36 ± 0,03	ns
n-7			
C16:1	0,75 ± 0,04	0,68 ± 0,03	ns
C18:1	6,82 ± 0,21	6,65 ± 0,23	ns
n-6			
C18:2 (LA)	19,20 ± 1,00	17,97 ± 0,87	ns
C18:3	0,23 ± 0,03	0,22 ± 0,01	ns
C20:2	0,21 ± 0,01	0,22 ± 0,01	ns
C20:3	0,60 ± 0,05	0,65 ± 0,03	ns
C20:4 (AA)	17,02 ± 0,64	16,70 ± 0,80	ns
C22:4	0,39 ± 0,03	0,37 ± 0,02	ns
n-3			
C18:3 (ALA)	0,08 ± 0,01	0,14 ± 0,02	0,0177
C20:5 (EPA)	0,29 ± 0,04	0,32 ± 0,04	ns
C22:5 (DPA)	0,63 ± 0,06	0,71 ± 0,06	ns
C22:6 (DHA)	1,82 ± 0,09	2,37 ± 0,11	0,0120
Sommes			
Saturés	46,66 ± 0,74	46,97 ± 0,436	ns
Monoinsaturés (n-9 + n-7)	12,56 ± 0,50	13,00 ± 0,38	ns
AGPI (n-6 + n-3)	40,44 ± 0,75	39,67 ± 0,49	ns
AGPI n-6	C20:3n-9/C20:4n-6	36,13 ± 0,47	ns
AGPI n-3	2,82 ± 0,17	3,54 ± 0,18	0,0408
AGPI-TLC n-3	2,73 ± 0,17	3,40 ± 0,16	0,0465
Rapports			
AGPI/saturés	0,869 ± 0,028	0,845 ± 0,017	ns
sn-6/sn-3	13,713 ± 1,140	10,271 ± 0,634	0,0480
LA/ALA	252,618 ± 41,712	138,302 ± 21,122	ns
sn-7/C18:2n-6	0,361 ± 0,022	0,371 ± 0,012	ns
C20:3n-9/C20:4n-6	0,020 ± 0,002	0,022 ± 0,001	ns
EPA/AA	0,017 ± 0,003	0,019 ± 0,002	ns
C20:3n-6/C18:2n-6	0,050 ± 0,005	0,056 ± 0,004	ns

Tableau 38: Effets de l'éthanol sur la composition en acides gras de la phosphatidylcholine mitochondriale de cœur de rat.

AGPI (n-6 et n-3): acides gras polyinsaturés (oméga 6 et oméga 3 respectivement); AGPI-TLC n-3: acides gras polyinsaturés à très longues chaînes oméga 3. Moyenne ± SEM. Ns: non significatif.

PHOSPHATIDYLETHANOLAMINE			
Acides gras (%)	Contrôle (n=6)	ETOH 12% (n=6)	p
Saturés			
C14	0,82 ± 0,03	0,78 ± 0,02	ns
C16	12,15 ± 0,66	12,49 ± 0,14	ns
C18	27,78 ± 0,88	28,68 ± 0,41	ns
C20	0,29 ± 0,02	0,33 ± 0,02	ns
n-9			
C18:1 (OA)	4,45 ± 0,22	5,04 ± 0,18	ns
C20:3	0,26 ± 0,02	0,36 ± 0,03	0,0111
n-7			
C16:1	0,36 ± 0,03	0,47 ± 0,02	0,0172
C18:1	4,33 ± 0,37	3,41 ± 0,13	0,0424
n-6			
C18:2 (LA)	10,69 ± 0,78	9,91 ± 0,34	ns
C18:3	0,28 ± 0,02	0,24 ± 0,01	ns
C20:2	0,16 ± 0,01	0,22 ± 0,02	0,0297
C20:3	0,29 ± 0,03	0,36 ± 0,05	ns
C20:4 (AA)	18,90 ± 1,1	17,46 ± 0,25	ns
C22:4	0,57 ± 0,02	0,59 ± 0,04	ns
n-3			
C18:3 (ALA)	0,13 ± 0,01	0,17 ± 0,02	ns
C20:5 (EPA)	0,30 ± 0,02	0,32 ± 0,02	ns
C22:5 (DPA)	1,98 ± 0,04	1,90 ± 0,05	ns
C22:6 (DHA)	16,28 ± 0,43	17,30 ± 0,90	ns
Somme			
Saturés	41,02 ± 1,30	42,27 ± 0,53	ns
Monoinsaturés (n-9 + n-7)	9,14 ± 9,58	8,92 ± 0,19	ns
AGPI (n-6 + n-3)	49,58 ± 0,94	48,45 ± 0,56	ns
AGPI n-6	30,90 ± 0,32	28,78 ± 0,55	ns
AGPI n-3	18,68 ± 0,47	19,66 ± 0,91	ns
AGPI-TLC n-3	18,55 ± 0,47	19,49 ± 0,93	ns
Rapport			
AGPI/saturés	1,218 ± 0,059	1,148 ± 0,027	ns
sn-6/sn-3	1,666 ± 0,106	1,483 ± 0,084	ns
LA/ALA	86,349 ± 9,255	65,928 ± 8,510	ns
sn-7/C18:2n-6	0,404 ± 0,013	0,345 ± 0,010	0,0045
C20:3n-9/C20:4n-6	0,014 ± 0,001	0,021 ± 0,001	0,0125
EPA/AA	0,016 ± 0,001	0,017 ± 0,001	ns
C20:3 n-6/C18:2n-6	0,054 ± 0,006	0,072 ± 0,005	ns

Tableau 39: Effets de l'éthanol sur la composition en acides gras de la phosphatidyléthanolamine mitochondriale de cœur de rat.

AGPI (n-6 et n-3): acides gras polyinsaturés (oméga 6 et oméga 3 respectivement); AGPI-TLC n-3: acides gras polyinsaturés à très longues chaînes oméga 3. Moyenne ± SEM. Ns: non significatif.

Profil en acides gras de la CL

Le tableau 40 résume les résultats de la composition en acides gras de la CL mitochondriale cardiaque dans les groupes contrôle et ETOH 12%.

La CL apparaît principalement constituée de LA toutefois quelques différences sont à relever entre les deux groupes. Quantitativement, le total en AGPI n-6 est comparable entre les deux groupes. Toutefois, la teneur de certains acides gras a été significativement remaniée après une CCME. Ainsi, la CL des rats éthanol s'est appauvrie en AA (-13,9% vs contrôle) au bénéfice d'une augmentation en C18:3 n-6 (+16,7% vs contrôle). La teneur en AGPI n-3 de la CL est également fortement remaniée après une CCME. En effet, la CL des cœurs de rats éthanol est significativement enrichie en AGPI n-3 ($p=0,0005$) vs contrôle), dont en AGPI-TLC n-3 ($p=0,0031$ vs contrôle). Les modifications les plus impressionnantes après une CCME sont les augmentations de 60% et 43,3% (vs contrôle) de l'ALA et du DHA. Conséquence, après 18 semaines de consommation modérée d'éthanol, les rapports n-6/n-3 et LA/ALA chutent de 40,2 et 36,7% comparé au groupe contrôle.

L'ensemble de ces résultats suggère que l'éthanol, à doses chronique et modérée, interfère avec le métabolisme des acides gras notamment en induisant un remodelage lipidique membranaire caractérisé par un enrichissement en AGPI n-3 des membranes mitochondriales cardiaques.

Il reste alors à déterminer si ces changements structuraux ont un impact sur l'efficacité de la fonction mitochondriale pour tenter d'expliquer, au moins en partie, le phénomène d'«ethanol preconditioning».

CARDIOLIPINE			
Acides gras (%)	Contrôle (n=6)	ETOH 12% (n=6)	P
Saturés			
C14	0,62 ± 0,06	0,77 ± 0,05	ns
C16	6,73 ± 0,51	6,94 ± 0,23	ns
C18	6,00 ± 0,26	5,11 ± 0,33	ns
C20	0,38 ± 0,04	0,37 ± 0,03	ns
n-9			
C18:1 (OA)	4,41 ± 0,12	4,26 ± 0,39	ns
C20:3	0,28 ± 0,03	0,41 ± 0,07	ns
n-7			
C16:1	1,18 ± 0,06	1,01 ± 0,05	ns
C18:1	3,21 ± 0,16	2,96 ± 0,25	ns
n-6			
C18:2 (LA)	75,19 ± 0,72	74,99 ± 0,57	ns
C18:3	0,20 ± 0,01	0,24 ± 0,00	0,007
C20:2	0,24 ± 0,03	0,24 ± 0,05	ns
C20:3	0,61 ± 0,04	0,65 ± 0,04	ns
C20:4 (AA)	0,79 ± 0,04	0,68 ± 0,02	0,0400
C22:4	0,22 ± 0,01	0,23 ± 0,01	ns
n-3			
C18:3 (ALA)	0,15 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,0004
C20:5 (EPA)	0,19 ± 0,01	0,17 ± 0,02	ns
C22:5 (DPA)	0,21 ± 0,01	0,28 ± 0,03	ns
C22:6 (DHA)	0,30 ± 0,02	0,43 ± 0,01	0,0001
Somme			
Saturés	12,82 ± 0,64	13,19 ± 0,55	ns
Monoinsaturés (n-9 + n-7)	8,80 ± 0,20	8,23 ± 0,35	ns
AGPI (n-6 + n-3)	78,09 ± 0,72	78,17 ± 0,58	ns
AGPI n-6	77,24 ± 0,70	77,06 ± 0,55	ns
AGPI n-3	0,85 ± 0,03	1,12 ± 0,05	0,0005
AGPI-TLC n-3	1,03 ± 0,06	1,28 ± 0,12	0,0031
Rapport			
AGPI/saturés	78,093 ± 0,722	78,170 ± 0,180	ns
sn-6/sn-3	31,299 ± 2,13	52,368 ± 4,551	<0,0001
LA/ALA	506,382 ± 35,189	320,584 ± 15,667	0,0007
sn-7/C18:2n-6	0,043 ± 0,002	0,039 ± 0,003	ns
C20:3n-9/C20:4n-6	0,363 ± 0,037	0,602 ± 0,103	ns
EPA/AA	0,248 ± 0,026	0,259 ± 0,034	ns
C20:3n-6/C18:2n-6	0,012 ± 0,001	0,014 ± 0,001	ns

Tableau 40: Effets de l'éthanol sur la composition en acides gras de la cardiolipine mitochondriale de cœur de rat.

AGPI (n-6 et n-3): acides gras polyinsaturés (oméga 6 et oméga 3 respectivement); AGPI-TLC n-3: acides gras polyinsaturés à très longues chaînes oméga 3. Moyenne ± SEM. Ns: non significatif.

VII. Résultats: effets de l'éthanol sur la fonction mitochondriale

De la même manière que les AGPI n-3 alimentaires, des doses modérées d'éthanol induisent une cardioprotection efficace contre la nécrose post-infarctus et entraînent une induction des AGPI n-3 dans les membranes mitochondriales. L'hypothèse à tester est de déterminer si les changements structuraux engendrés par l'éthanol ont un impact sur l'efficacité de la fonction mitochondriale au niveau d'un mécanisme basique de régulation du métabolisme énergétique cardiaque, le couplage fonctionnel entre la créatine kinase mitochondriale (Ckmit), la phosphorylation oxydative et l'adénine nucléotide translocase (ANT).

7.1. Evaluation de la qualité de la préparation mitochondriale

Après isolement des mitochondries, un test du contrôle respiratoire et un test d'intégrité de la membrane mitochondriale externe (test du cytochrome c) sont réalisés pour apprécier la qualité de la préparation mitochondriale fraîchement isolée.

Test du contrôle respiratoire

La suspension mitochondriale est déposée dans une chambre de respiration contenant la solution de respiration standard. Les substrats sont ajoutés (stade 2) et l'on obtient une vitesse de respiration basale (vitesse V_o). L'addition de 0,3 mM d'ADP stimule la respiration mitochondriale (stade 3) jusqu'à une vitesse maximale, V_{max} . Lorsque tout l'ADP est phosphorylé en ATP, la vitesse de respiration chute pour revenir à l'état de repos (stade 4). A partir de ces données, sont calculés l'ICR et le rapport ADP/O pour évaluer la qualité de la préparation mitochondriale (tableau 41). Les valeurs de l'ICR (contrôle= $9,41 \pm 0,25$ vs ETOH 12%= $8,88 \pm 0,12$) et du rapport ADP/O (contrôle= $3,12 \pm 0,08$ vs ETOH 12%= $3,01 \pm 0,09$) sont conformes aux valeurs obtenues avec ce genre de modèle expérimental. Généralement, des mitochondries cardiaques isolées affichent des valeurs d'ICR entre 6 et 10 et un rapport ADP/O environ égal à 3 en présence de glutamate et malate. Les conditions d'isolement n'ont donc pas endommagé l'intégrité fonctionnelle des mitochondries.

Test du cytochrome c

Les mitochondries sont déposées dans une solution de respiration KCl et la respiration est stimulée par l'addition de 2 mM d'ADP (stade 3). Après addition de 8 μ M de cytochrome c, les deux groupes présentent chacun une vitesse de respiration statistiquement comparable à celle obtenue au stade. En présence de cytochrome c, la vitesse de respiration a augmenté respectivement de 6,8 et 10,5% dans les groupes contrôle et ETOH 12% (tableau 41). Ces

valeurs sont inférieures à 15%, seuil au-dessus duquel l'échantillon de mitochondries est rejeté pour cause de découplage. Ces résultats permettent donc de conclure que la membrane mitochondriale externe n'a pas été endommagée au cours du protocole d'isolement.

L'ensemble de ces résultats démontrent que les conditions d'isolement n'ont pas altérées l'intégrité fonctionnelle et structurale des mitochondries. La qualité de la préparation mitochondriale est donc satisfaisante.

	Paramètres	Contrôle (n=5)	ETOH 12% (n=5)
Test contrôle respiratoire	ICR	9,41 ± 0,25	8,88 ± 0,12
	ADP/O	3,12 ± 0,08	3,01 ± 0,09
Test du cytochrome c	VO ₂ au stade 3 (nmoles O ₂ /min/mg)	229,51 ± 30,50	205,65 ± 19,33
	VO ₂ après addition du cytochrome c (nmoles O ₂ /min/mg)	246,36 ± 30,52	229,73 ± 20,91

Tableau 41: Tests et paramètres d'évaluation de la qualité de la préparation mitochondriale.

VO₂ : consommation d'O₂; ICR: indice du contrôle respiratoire. Moyenne ± SEM.

7.2. Etude du couplage fonctionnel sur mitochondries isolées de cœur de rat

L'hypothèse à tester est de déterminer si les changements structuraux (d'origine lipidique) engendrés par l'éthanol ont un impact sur l'efficacité de la fonction mitochondriale, à savoir un meilleur couplage fonctionnel de la Ckmit avec la phosphorylation oxydative et ANT.

Pour se faire, les mitochondries sont déposées dans un milieu de respiration standard. La respiration est stimulée par des concentrations croissantes d'ATP (0,12; 0,29; 0,58 et 1,16 mM), en présence ou en absence de créatine (20 mM).

Ce protocole favorise donc la réaction ATP + créatine → ADP + PCr et permet d'étudier:

- le couplage fonctionnel entre l'activité de la Ckmit et la phosphorylation oxydative
- le couplage entre Ckmit et ANT

7.2.1. Couplage fonctionnel entre la créatine kinase et la phosphorylation oxydative

L'étude de ce couplage repose sur le suivi de la consommation d'O₂ en fonction de concentrations croissantes d'ATP, en présence ou en absence de créatine (figure 54A).

On remarque que les VO₂ des groupes contrôles et ETOH 12% augmentent avec la concentration en ATP. Avec l'addition de créatine, la vitesse de saturation de la respiration est plus haute et est atteinte plus rapidement pour les deux groupes. Cependant, sans ou avec créatine, la consommation d'O₂ des mitochondries éthanol tend à être légèrement plus lente.

Les paramètres cinétiques de la respiration sont obtenus après linéarisation (figure 54B) des données représentées sur la figure 54A. Ces données sont résumées dans le tableau 42.

En absence de créatine, l'affinité de l'ATP est statistiquement comparable entre les deux groupes (Km : contrôle= 154,0 ± 11,0 μM vs ETOH 12%= 158,0 ± 11,7 μM). La Vmax tend légèrement à ralentir dans le groupe éthanol et confirme les observations faites ci-dessus. En présence de créatine, le Km des deux groupes est comparable mais est réduit d'environ 70% par rapport à la situation sans créatine.

En présence de créatine, la Vmax du groupe ETOH 12% conserve encore un léger retard comparée au groupe contrôle (contrôle= 106,0 ± 12,2 nmoles O₂/min/mg vs ETOH 12%= 87,7 ± 11,1 nmoles O₂/min/mg).

En résumé, la créatine augmente l'affinité de l'ATP pour la respiration mais n'a pas d'effet stimulant notable sur la vitesse de la respiration. Ces résultats permettent de vérifier que le couplage fonctionnel Ckmit/phosphorylation oxydative offre un meilleur rendement à la respiration mitochondriale. Ce phénomène se traduit par une meilleure affinité de l'ATP pour la respiration permettant une canalisation de l'ATP vers Ckmit et de baisser la perméabilité de la membrane externe pour l'ATP. Cette compartimentation permet ainsi un renouvellement continu du pool d'ADP est donc d'assurer une stimulation efficace de la respiration et par la même de la synthèse d'ATP.

Quant aux effets d'une CCME, l'éthanol tend à légèrement ralentir la vitesse de la respiration mitochondriale mais sans affecter l'efficacité du couplage fonctionnel entre la Ckmit et la phosphorylation oxydative.

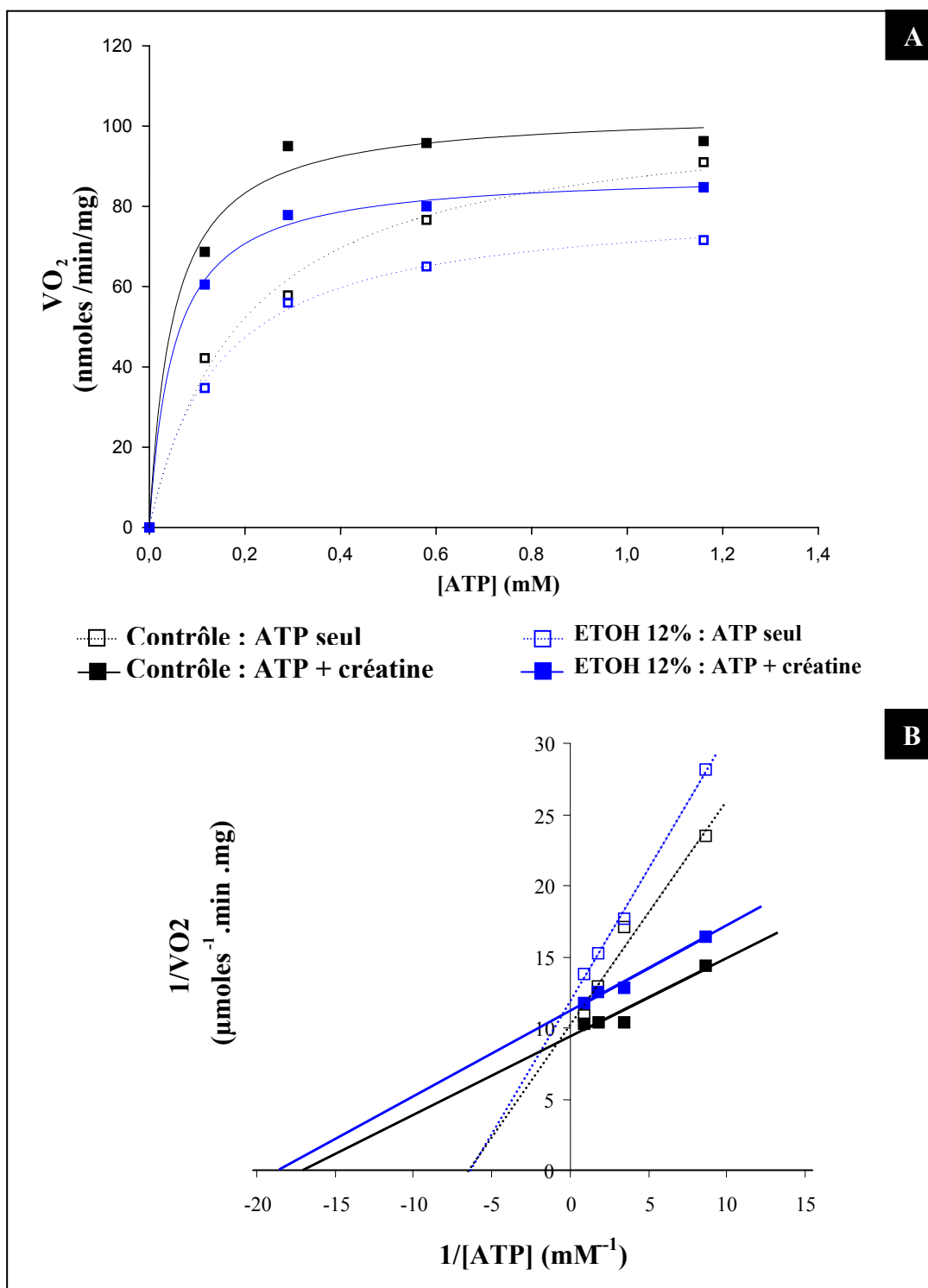


Figure 54 : Effet de l'ATP sur la respiration mitochondriale en présence ou en absence de créatine.

(A) Relation entre l'ATP exogène et la vitesse de la respiration mitochondriale, en absence (pointillés) et en présence (trait plein) de 20 mM de créatine.

(B) Linéarisation des valeurs présentées en (A).

VO_2 : consommation d' O_2 , égale à la différence entre la consommation d'oxygène pour une concentration donnée en ATP exogène et la vitesse initiale V_0 (sans ATP).

	ATP			ATP + Créatine		
	Contrôle (n=5)	ETOH 12% (n=5)	p	Contrôle (n=5)	ETOH 12% (n=5)	p
K_m (μ M)	154,0 \pm 11,0	158,0 \pm 11,7	ns	52,0 \pm 8,5	49,0 \pm 4,5	ns
V_{max} (nmoles O ₂ /min/mg)	96,8 \pm 11,7	83,3 \pm 13,0	ns	106,0 \pm 12,2	87,7 \pm 11,1	ns

Tableau 42 : Paramètres cinétiques apparents de la respiration pour l'ATP en présence ou en absence de créatine.

K_m= constante de Michaëlis-Menten; V_{max}= vitesse maximale. Moyenne \pm SEM. Ns: non significatif.

7.2.2. Couplage fonctionnel entre la créatine kinase et l'adénine nucléotide translocase

L'étude de ce couplage repose sur le suivi de la vitesse de production de PCr (VPCr) en fonction de concentrations croissantes d'ATP (figure 55A). On remarque que les VPCr des groupes contrôles et éthanol 12% augmentent avec la concentration d'ATP. Cependant, la VPCr tend à être plus lente dans le groupe ETOH 12%, suggérant que la C_{kmit} tend à atteindre l'état de saturation moins rapidement après une CCME.

Les paramètres cinétiques de la respiration sont obtenus après linéarisation (figure 55B) des données représentées sur la figure 55A. Ces données sont résumées dans le tableau 43.

L'affinité de l'ATP est statistiquement comparable entre les deux groupes (K_m : contrôle= 60,0 \pm 11,0 μ M vs ETOH 12%= 54,0 \pm 17,0 μ M). La V_{max} tend à être plus lente dans le groupe ETOH 12% et confirme les observations faites ci-dessus.

Une CCME n'entraîne donc aucune modification significative sur l'affinité de l'ATP pour la C_{kmit} mais tend à ralentir la vitesse de synthèse de PCr. Une CCME n'a donc aucune influence significative sur l'efficacité du couplage entre C_{kmit} et ANT.

Au vue des résultats obtenus en §7.2.1 et §7.2.2, la cardioprotection induite par l'éthanol impliquent certainement des mécanismes mitochondriaux mais différents de ceux impliquant le couplage fonctionnel et la régulation de la fonction mitochondriale.

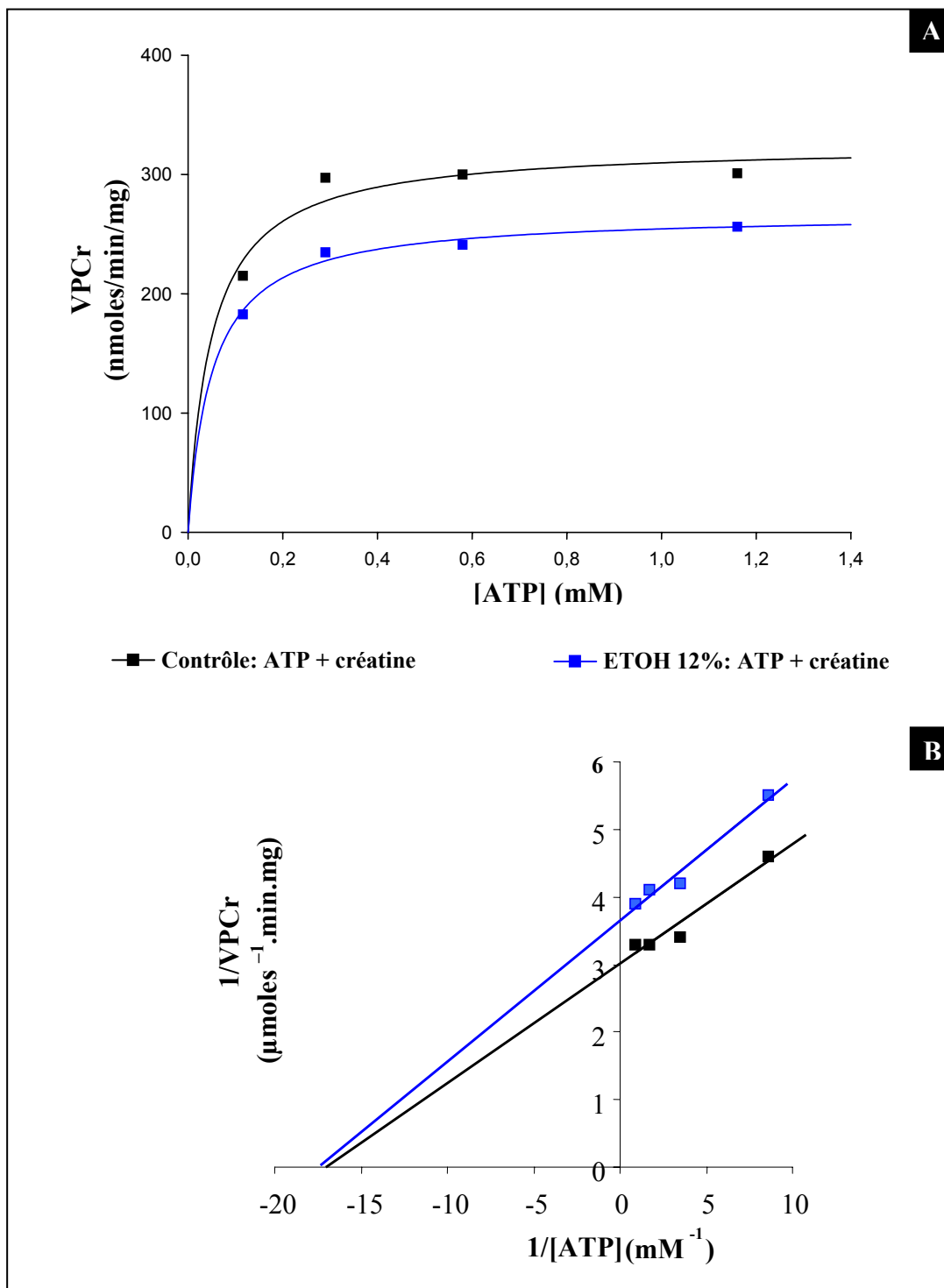


Figure 55: Simulation des effets de l'ATP sur la cinétique de formation de phosphocréatine (PCr).

(A) Relation entre l'ATP exogène et la vitesse de formation de PCR (VPCr).

(B) Linéarisation des valeurs présentées en (A).

VPCr : vitesse de production de phosphocréatine, égale au produit entre la VO_2 en présence de créatine (valeurs VO_2 figure 56A) et le rapport ADP/O (voir tableau 42).

	Paramètres cinétiques de la Ckmit		
	Contrôle (n=5)	ETOH 12% (n=5)	p
Km (μ M)	60,0 \pm 11,0	54,0 \pm 17,0	ns
Vmax (nmol O ₂ /min/mg)	333,0 \pm 38,3	262,4 \pm 33,2	ns

Tableau 43: Paramètres cinétiques apparents de la créatine kinase mitochondriale (CKmit) pour l'ATP.

Km= constante de Michaëlis-Menten; Vmax= vitesse maximale. Moyenne \pm SEM. Ns: non significatif.

VIII. Discussion

Cette seconde partie a eu pour but de tester si l'éthanol pouvait mimer, en partie au moins, les mécanismes cardioprotecteurs des AGPI n-3. Plus exactement, nous avons déterminé si l'éthanol pouvait interférer avec les AGPI n-3, un mécanisme habituellement observable avec les AGPI n-3 d'origine alimentaire. Enfin, nous avons évalué si de telles modifications mitochondriales pouvaient avoir un impact sur la fonction mitochondriale et expliquer la meilleure résistance du myocarde à l'ischémie/reperfusion après une CCME.

Nos résultats montrent qu'une supplémentation journalière et à dose nutritionnelle en ALA-DHA-EPA (Mix alpha 3®, Laboratoire Synergia) protège efficacement contre la nécrose cellulaire sur un modèle de cœur isolé perfusé de rat. Une supplémentation en AGPI n-3 et une CCME sont donc comparables sur un premier point à savoir qu'ils protègent directement le myocarde contre la nécrose cellulaire. Par ailleurs, nous avons démontré que les membranes mitochondriales cardiaques s'enrichissent en AGPI n-3 après une supplémentation en AGPI n-3. Parallèlement, une CCME entraîne une induction des AGPI n-3 dans le sang et les mitochondries cardiaques. Une supplémentation en AGPI n-3 et une CCME sont donc comparables sur un second point à savoir qu'ils sont à l'origine d'une induction des AGPI n-3. Si une CCME induit un enrichissement en AGPI n-3 des membranes mitochondriales, ce remodelage lipidique ne semble toutefois pas perturber la fonction mitochondriale. Enfin, nous avons relevé une réduction de la teneur en palmitate dans le compartiment sanguin. Cet acide gras est connu pour son rôle apoptotique. Etant donné les effets anti-infarctus de l'éthanol, il est possible que l'éthanol interagisse avec les voies de l'apoptose à l'origine de l'«ethanol preconditioning».

Supplémentation en AGPI n-3 et nutrition

Les rats ont été supplémentés avec de la graisse de palme ou du Mix alpha 3® (mélange ALA-EPA-DHA) pendant 8 semaines. Après analyse du suivi alimentaire, on constate qu'aucune de ces suppléments à un effet sur le comportement alimentaire des animaux puisque la ration alimentaire est similaire entre les deux groupes. Toutefois, les apports en acides gras sont totalement incomparables. Un rat supplémenté avec de la graisse de palme a environ trois-quart de ses apports lipidiques partagés entre les acides gras saturés (C16) et les acides gras monoinsaturés (OA), le reste étant des AGPI n-6 essentiellement (LA principalement). A l'inverse, un rat supplémenté avec du Mix alpha 3® a un tiers de ces apports lipidiques en acides gras saturés et monoinsaturés, les deux-tiers restants étant des AGPI et majoritairement des AGPI n-3 (ALA et DHA surtout). Globalement, un régime enrichi en Mix alpha 3® permet de multiplier par 10 la teneur de chaque AGPI n-3 comparé à un régime enrichi en graisse de palme.

Par ailleurs, cette étude expérimental est la première à tester les effets 1°) d'une supplémentation en ALA, EPA et DHA et 2°) en utilisant un tel dosage nutritionnel.

Pour notre part, nous avons soigneusement établi une dose de 600 mg Mix alpha 3® de telle sorte que la supplémentation en AGPI n-3 et la consommation journalière de croquettes permettent d'obtenir un rapport n-6/n-3 et un rapport LA/ALA proches de 1. Un rapport n-6/n-3 compris entre 4 et 1 (Simopoulos, 1991) et un rapport LA/ALA inférieur à 4 (Renaud, 1990) sont reconnus optimaux pour obtenir des bénéfices cardiovasculaires et permettre une conversion adéquate de l'ALA en AGPI-TLC n-3 (Indu *et al.*, 1992).

Le traitement est un élément clé pour les travaux de recherche en nutrition. Dans le cas des AGPI n-3, les traitements sont d'ailleurs très discutables d'une étude à l'autre et souvent source de résultats difficilement comparables (tableau 13).

Certains investigateurs étudient les effets cardioprotecteurs des AGPI n-3 alimentaires en utilisant des dosages que l'on peut qualifier de pharmacologiques, loin de refléter la réalité alimentaire. Pour illustrer ces propos, la supplémentation lipidique peut représenter jusqu'à 25% des apports énergétiques totaux (Culp *et al.*, 1980) contre 6% pour cette présente étude. En ce qui concerne le mode d'administration, les AGPI n-3 peuvent-être administré per os (Kinoshita *et al.*, 1994; Oskarsson *et al.*, 1993; McLennan *et al.*, 1996), l'avantage est alors que l'animal reçoit quotidiennement la même dose. Les AGPI n-3 peuvent également être incorporés à la diète (Hock *et al.*, 1987 et 1990; Yanagisawa *et al.*, 1988; Yang *et al.*, 1993; Demaison *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 1994), cependant cela a trois inconvénients: 1°) l'apport en AGPI n-3 de chaque animal est difficile à quantifier 2°) les apports en AGPI n-3 risquent fort de ne pas être identique d'un jour à l'autre et 3°) les AGPI n-3 risquent de s'oxyder à la

lumière et à l'air. Enfin, les AGPI n-3 administrés lors des études d'intervention nutritionnelle (aussi bien clinique qu'expérimentale) ne sont jamais rigoureusement identiques. Certains administrent des acides gras purifiés, d'autres des huiles de poissons, sources d'ailleurs de grande variabilité en terme de composition en AGPI n3. En effet, une huile de poissons est le résultat de l'huile extraite d'un seul poisson ou d'un mélange original de poissons. L'huile extraite d'un seul poisson est source de variabilité. En effet, suivant la saison, le lieu de pêche, la maturité du poisson, les techniques d'alimentation (pour les poissons d'élevage), la composition en acides gras est très variable. Pour les huiles à base de mélange de poissons, la composition quantitative et qualitative en poissons est très variable et par ce fait, la composition en acides gras et notamment en AGPI-TLC n-3 est très différente d'une huile de poissons à une autre. En conséquence, tous les travaux de recherche qui consistent à étudier les effets sanitaires des AGPI n-3 ont en commun l'étude des AGPI n-3. En revanche, la formule en AGPI n-3 est originale d'une étude à l'autre. Par ce fait, une combinaison inimaginable de mélange en AGPI n-3 peut-être retrouvée dans la littérature. L'avantage, c'est que la majorité de ces travaux démontrent un effet bénéfique des AGPI n-3 et donc que scientifiquement, il est difficile de contester le bienfait de ces molécules. L'inconvénient, c'est que l'on ne peut jamais scrupuleusement superposer deux études. Le biais permanent sera toujours la formule en acides gras utilisée. Cette lacune est toutefois le lot de la majorité des études en nutrition.

Supplémentation en AGPI n-3 et taille de l'infarctus

Nos résultats ont permis de vérifier qu'une supplémentation journalière à dose nutritionnelle de Mix alpha 3® protège efficacement contre la nécrose cellulaire après un infarctus du myocarde. Des effets similaires des AGPI n-3 avaient déjà été démontrés sur d'autres modèles expérimentaux. Ainsi, de nombreux travaux ont démontré une réduction de la libération d'enzymes cardiaques (CK, LDH) et plus objectivement une réduction de la taille de l'infarctus après une supplémentation en EPA ou un régime enrichi en huile de poissons chez le rat (Hock *et al.*, 1987; Yanagisawa *et al.*, 1988;; Yang *et al.* 1993; Zhu *et al.*, 1994), le chien (Culp *et al.*, 1980; Oskarsson *et al.*, 1993) et le lapin (Ogita *et al.* 2003).

Cette présente étude est également la première à démontrer qu'une supplémentation en ALA, EPA et DHA exerce un effet cardioprotecteur sur la taille de l'infarctus et ce, à partir d'un modèle de cœur isolé perfusé de rat. Obtenir une telle cardioprotection avec un tel modèle permet donc de démontrer qu'une supplémentation en n-3 protège directement le myocarde contre les altérations liées à l'ischémie/reperfusion.

La consommation d'AGPI n-3 et une CCME sont donc comparables sur un premier point à savoir que la consommation répétée de ces deux nutriments est une forme de préconditionnement du myocarde à l'ischémie.

Supplémentation en AGPI n-3 et fonction ventriculaire gauche

Après 8 semaines de supplémentation, les AGPI n-3 n'ont aucun effet bénéfique significatif sur la récupération fonctionnelle post-ischémique. Cela peut paraître surprenant. Cependant, l'éthanol (Krenz *et al.*, 2001; Guiraud *et al.*, 2004) et le préconditionnement ischémique sont reconnus pour entraîner une limitation de la taille de l'infarctus sans amélioration de la fonction ventriculaire post-ischémique surtout sur ce modèle expérimental d'ischémie régionale/reperfusion. Ce phénomène a d'ailleurs fait l'objet de nombreux commentaires dans la littérature, notamment celui des illustres Kloner and Jennings (Kloner and Jennings, 2001). Ces auteurs expliquent que de brèves épisodes d'ischémie (ischémie préconditionnante) peuvent entraîner un dysfonctionnement de la fonction cardiaque (syndrome de stunning) et un effet protecteur contre la nécrose cellulaire. On peut alors supposer qu'à la suite d'une supplémentation en AGPI n-3, le cœur développe un stunning myocardique qui pourrait masquer un éventuel effet protecteur sur la récupération fonctionnelle post-ischémique.

Par contre, des résultats différents sont obtenus avec le modèle de cœur isolé perfusé soumis à ischémie globale et reperfusion. En effet, si ce dernier modèle n'est pas adapté pour évaluer objectivement l'étendue de la nécrose, en revanche il l'est parfaitement pour étudier la fonction hémodynamique et plus exactement les phénomènes d'arythmies. D'ailleurs, cette thématique est l'axe de recherche de nombreux travaux expérimentaux sur AGPI n-3 et myocarde (Culp *et al.*, 1980; Hock *et al.*, 1990; Hallaq *et al.*, 1990 et 1992; Kinoshita *et al.*, 1994; Charnock *et al.*, 1992; McLennan *et al.*, 1990, 1992, 1993, 1995 et 1996; Billman *et al.*, 1994 et 1999).

Supplémentation en AGPI n-3 et lipides de la mitochondrie

Après 8 semaines de supplémentation en Mix alpha 3®, nous avons également analysé la composition en acides gras de trois principaux phospholipides de la mitochondrie cardiaque, à savoir : PC, PE et CL.

La PC et la PE s'enrichissent en AGPI n-3 (comprenant ALA et AGPI-TLC n-3) et ce, au dépend d'un appauvrissement en AGPI-TLC n-6. Très certainement qu'enrichir une diète en ALA au point que l'apport en ALA soit comparable à la consommation en LA entraîne un

shunt complet du métabolisme des AGPI-TLC n-6 vers celui des AGPI-TLC n-3. Une supplémentation en AGPI entraîne donc le remplacement d'une partie des AGPI-TLC n-6 par des AGPI-TLC n-3 (AGPI-TLC n-3 à 22 carbones essentiellement) dans la composition de la PC et de la PE mitochondriales de cœur de rat. Une supplémentation en AGPI n-3 entraîne également d'importants changements sur le profil en acides gras de la CL. Comme pour la PC et la PE, la CL s'enrichit en AGPI n-3 au dépend des AGPI-TLC n-6. Cependant, comparée à la PC et à la PE, la CL s'enrichit davantage en C18:3 n-3 qu'en AGPI-TLC n-3.

Ces analyses lipidiques sur mitochondries cardiaques permettent de vérifier qu'une supplémentation en AGPI n-3 interfère avec les acides gras des membranes mitochondriales en induisant principalement un enrichissement en AGPI n-3 de ces membranes. On retrouve davantage d'AGPI-TLC n-3 à 22 carbones que d'ALA dans la PC et la PE. Une modification des apports alimentaires en AGPI entraîne également des modifications de la composition en AGPI de la CL mais elles restent quantitativement marginales comparées à celles de la PC et de la PE. En effet, après le LA, seul l'ALA semble l'AGPI le plus facilement incorporable dans la CL. Il est probable que la configuration de cet AGPI n-3 (18 carbones, 3 doubles liaisons configurations cis) offre un faible encombrement allostérique et parfaitement adaptable pour s'intégrer à la volumineuse structure que représente la CL (double phospholipide relié par un glycérol).

CCME et lipides sanguins

En croisant les résultats de la littérature sur AGPI n-3 et éthanol, une consommation d'AGPI n-3 et une CCME semblent avoir des effets cardioprotecteurs similaires. Cette présente étude a d'ailleurs permis de valider cette précédente observation. Nous avons en effet montré qu'une CCME et une supplémentation en AGPI n-3 limitent la nécrose post-ischémique sur un modèle de cœur isolé de rat. Ces deux nutriments sont donc réellement capables de protéger spécifiquement et directement le myocarde contre les altérations liées à un infarctus. Consommer de l'éthanol comme consommer des AGPI n-3 peut donc être assimilé à une forme de préconditionnement myocardique. Par ailleurs, l'éthanol est connu pour être un puissant modulateur du métabolisme lipidique dans de nombreux tissus (Baraona *et al.*, 1970; Cunnane *et al.*, 1987; Contaldo *et al.*, 1989; Gomez-Tubio *et al.*, 1995). Des études menées sur l'homme ont récemment montré qu'une consommation modérée d'éthanol entraîne une augmentation des AGPI n-3 dans le sang (de Lorgeril *et al.*, soumis) alors que de telles modifications sont habituellement observables après une consommation de poissons (Iso *et al.*, 1989; Bonea *et al.*, 1992; Kuriki *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003). Observations qui

renforce davantage notre hypothèse selon laquelle la cardioprotection induite par une CCME pourrait fortement ressembler à celle induite par des AGPI n-3.

Profil lipido-lipoprotéinique plasmatique

Nous avons souhaité reproduire expérimentalement les effets cliniques du vin sur l'induction des AGPI n-3. Etant donné que l'éthanol est un composant majeur du vin et qu'il est reconnu pour être un modulateur puissant du métabolisme lipidique, on peut donc supposer qu'une CCME puisse moduler le métabolisme des acides gras. L'analyse du profil lipido-lipoprotéinique est d'ailleurs adapté à cela.

Après 7 semaines de consommation modérée d'éthanol (12% v/v), le profil lipido-lipoprotéinique laisse apparaître que le métabolisme des AGPI-TLC n-3 est stimulé au dépend d'une perturbation du métabolisme des AGPI-TLC n-6. L'éthanol réduit également le taux d'acides gras saturés et notamment celui en palmitate (C16).

Après 18 semaine de CCME, l'éthanol semble diminuer le métabolisme des n-7 et celui des acides gras saturés, principalement celui du C16. Bien que le métabolisme des AGPI n-3 soit stimulé jusqu'à l'EPA, le métabolisme des AGPI n-6 semble moins affecter par le prolongement de la durée de consommation d'éthanol.

Il est alors fort probable que les modifications précoces (après 7 semaines de CCME) induites par l'éthanol sur le métabolisme des AGPI-TLC n-3 aient des conséquences tardives sur l'ensemble de l'organisme. Plus précisément, l'EPA a de multiples rôles: structural, fonctionnel, métabolique et doit donc rester disponible à l'ensemble de l'organisme et pour se faire, de l'EPA circulant est toujours présent dans le sang. En revanche, le DPA est un intermédiaire métabolique et un composant membranaire, le DHA lui, a plutôt un rôle structural et un rôle fonctionnel local (Stillwell et Wassall, 2003; La Guardia *et al.*, 2005). Ces acides gras restent donc dans la cellule ou ils sont implantés et c'est probablement pour cela que ces AGPI-TLC n-3 à 22 carbones sont moins présents dans l'espace plasmatique.

Enfin, un argument de poids permet de démontrer que l'éthanol interfère avec le métabolisme des AGPI n-3, c'est la consultation des apports nutritionnels. D'après nos précédents résultats (voir partie 1), nous avons constaté que les rats éthanol ont une consommation alimentaire moindre, donc des apports lipidiques moindres et forcément des apports en AGPI n-3 moindres. Or, le profil en acides gras sanguin des rats éthanol est enrichi en AGPI n-3. Il n'y a donc pas de meilleur argument pour démontrer les bénéfices de l'éthanol sur le métabolisme des AGPI n-3.

Profil lipidique des globules rouges

La composition en acides gras des GR est un très bon indice de la composition en acides gras des cellules cardiaques (Harris *et al.*, 2004). L'analyse de ce profil lipidique est donc indispensable à notre étude.

Après 7 semaines de consommation modérée d'éthanol, les membranes des GR s'enrichissent en C20, ALA et en AGPI-TLC et 20 carbones. On peut toutefois se demander pourquoi les AGPI-TLC à 22 carbones ne sont-ils pas remaniés dans les GR. Plusieurs hypothèses à cela.

La première fait référence à la synthèse des GR, l'érythropoïèse. Idée originale mais pas tant que cela. En effet, au cours de ce processus, des cellules souches se différencient en précurseurs d'érythrocytes qui à leurs tours se différencient en une succession de cellules qui, au cours de leur maturation, vont éjecter leur noyau puis leurs organites pour donner une cellule mature : le GR. L'érythrocyte est donc dépourvu de mitochondrie, de réticulum endoplasmique, de peroxyosome et de noyau. Le GR n'ayant aucun enzyme pour la synthèse des AGPI-TLC, il ne peut procéder à aucune synthèse d'AGPI-TLC. Alors d'où viennent les AGPI-TLC à 20 carbones ? Etant donné que l'érythrocyte est incapable de synthétiser des acides gras, le profil en acides gras du GR est donc celui hérité de ses précurseurs. Alors pourquoi ces cellules n'auraient-elles pas d'AGPI-TLC à 22 carbones ? Du fait de différenciations successives, ces cellules ont probablement une demi-vie insuffisante par rapport au temps nécessaire à l'éthanol pour induire des modifications significatives sur le métabolisme des AGPI-TLC. On peut également se demander si la composition en acides gras d'une cellule ne fait-elle pas sa spécificité. Si le DHA est l'acide gras préféré de la rétine et du cerveau (Anderson *et al.*, 1990; Connor *et al.*, 1990), les cellules précurseurs des GR n'ont peut-être pas besoin d'AGPI-TLC à 22 carbones pour leur bon fonctionnement.

Autre hypothèse, moins originale et davantage plausible, est de se demander si 7 semaines de CCME n'est pas une durée trop brève pour entraîner de profonds bouleversements dans la composition lipidique des membranes des GR. Il faut probablement plus de 7 semaines de CCME pour que les GR portent les empreintes des modifications induites par l'éthanol. Etant donné que la demi-vie d'un GR est de 120 jours (16 semaines) et que le renouvellement de chaque GR n'étant pas synchrone, il faut donc un temps certain pour s'assurer de profonds changements au niveau de la composition membranaire en acides gras. C'est pourquoi nous avons analysé le profil lipidique des membranes des GR après 18 semaines de consommation modérée d'éthanol. Des modifications alors plus nettes apparaissent. Les membranes des GR contiennent moins d'acides gras saturés (C16 et C18 principalement) mais davantage d'AGPI-TLC n-3 (DHA exclusivement).

En résumé, ces analyses préliminaires sur plasma et GR sont encourageantes. Une CCME interagit avec le métabolisme des acides gras. Les changements notables sont un enrichissement en AGPI n-3 et une diminution de la teneur en palmitate dans le plasma et les phospholipides membranaires des GR. On peut à présent se demander quelles peuvent-être les conséquences cardiaques de telles modifications lipidiques ?

Au cours de l'ischémie, la β -oxydation est inhibée, entraînant une accumulation en acides gras et en acides gras β -oxydés (Ford 2002) qui a pour conséquence une activation de l'apoptose lors de la reperfusion (Takeo *et al.*, 1999; Ford 2002; Murphy 2004). Deux types d'acide gras peuvent réguler l'apoptose, à savoir les AGPI n-3, connus pour protéger les cellules contre l'apoptose (Engelbrecht *et al.*, 2005; Pfrommer *et al.*, 2006) et le palmitate, connu pour stimuler l'apoptose (DeVries *et al.*, 1997; Hickson-Bick *et al.*, 2000; Ostrander *et al.*, 2001; Sparagna *et al.*, 2000). Étant donné que la teneur de ces acides gras est modulée par une CCME, il est donc fort probable que ces modifications lipidiques représentent un des mécanismes par lequel une CCME protège le myocarde contre la nécrose cellulaire. Ces dernières explications sont extrêmement encourageantes et renforcent notre hypothèse sur l'existence d'une possible interaction entre l'éthanol et les acides gras des membranes cardiaques et plus spécifiquement au niveau des membranes mitochondriales cardiaques.

CCME et lipides de la mitochondrie

De nombreux travaux expérimentaux ont montré que les AGPI n-3 d'origine alimentaire interféraient avec les AGPI n-3 des membranes cardiaques et plus spécifiquement au niveau des membranes de la mitochondrie (Hock *et al.* 1987; Yang *et al.*, 1993; Isensee *et al.*, 1994), organelle reconnue pour jouer un rôle critique durant l'ischémie, la reperfusion et le préconditionnement myocardique (Takeo et Nasa, 1999; Murphy 2004).

Quantification de la PC, PE et CL dans les membranes mitochondriales de cœur de rat

La répartition des phospholipides de la mitochondrie cardiaque n'est pas altérée après 18 semaines de consommation d'éthanol à 12% (v/v). Les 3 principaux phospholipides sont la PC, la PE et la CL et représentent respectivement 49%, 36% et 15% des phospholipides totaux. Résultats en accord avec les données de la littérature (tableau 3).

En revanche, la composition en acides gras de ces trois phospholipides mitochondriaux est significativement modifiée après une CCME.

Composition en acides gras de la PC, PE et CL mitochondriales cardiaques

Après 8 semaines de CCME à 12% (v/v), la PC s'est enrichi en ALA et DHA au dépend du LA et de l'AA.

La CL est excessivement riche en LA (75% des acides gras totaux). Quant aux restes des AGPI, leurs teneurs restent bien inférieures à 1% mais c'est principalement sur ces acides gras que l'éthanol modifie la composition en acides gras de la CL. L'AA est ainsi préférentiellement remplacés par de l'ALA et du DHA.

Quant à la composition en acides gras de la PE, l'éthanol entraîne une diminution des teneurs en LA et AA et tend à induire un enrichissement en DHA. Une CCME semble donc avoir peu d'influence sur la composition en acides gras de la PE.

D'après l'ensemble de nos analyses lipidiques sur la mitochondries cardiaques, une CCME et les l'éthanol AGPI n-3 d'origine alimentaire induisent un enrichissement en AGPI n-3 des membranes mitochondriales cardiaques. Bien que le remodelage lipidique induit par une CCME n'est pas aussi puissant que celui induit par une supplémentation en AGPI n-3, des doses modérées d'éthanol parviennent toutefois à induire un enrichissement en ALA et DHA dans deux principaux phospholipides de la mitochondrie cardiaque: la PC et la CL.

CCME et fonction mitochondriale

Une CCME induit un remodelage lipidique des membranes mitochondriales en induisant un enrichissement de la PC et de la CL en ALA et DHA. Notre objectif a donc été de tester si ces modifications sont suffisantes pour influencer l'efficacité du couplage fonctionnel entre la Ckmit, la phosphorylation oxydative et ANT. Ce mécanisme de couplage est très important du point de vue bioénergétique car il permet un recyclage local de l'ADP et donc une stimulation efficace (plus rapide) et économique de la phosphorylation oxydative. L'éthanol pourrait donc potentialiser ce fonctionnement économique de la mitochondrie et expliquer la meilleure résistance du myocarde à l'ischémie/reperfusion.

Couplage fonctionnel entre la CKmit et la phosphorylation oxydative

Nous avons vérifié que le couplage fonctionnel entre l'activité de la Ckmit et la phosphorylation oxydative permet à la respiration mitochondriale de fonctionner avec un meilleur rendement. En effet, la créatine augmente l'affinité de l'ATP pour la respiration et baisse la perméabilité de la membrane externe pour l'ATP, sans modification de la vitesse de consommation d'O₂. En présence de créatine, l'ATP est donc compartimenté entre la matrice

et la Ckmit permettant un renouvellement continu du pool d'ADP par la Ckmit, d'où une stimulation efficace de la respiration en présence de créatine et d'ATP exogène.

Quant aux effets d'une CCME, elle tend à légèrement ralentir la vitesse de la respiration mitochondriale, cependant sans effet sur le couplage fonctionnel entre la Ckmit et la phosphorylation oxydative. La cardioprotection induite par une CCME ne semblent donc pas impliqués des mécanismes intervenant dans la régulation du couplage fonctionnel entre la CKmit et la phosphorylation oxydative. On peut simplement retenir qu'à la suite d'une CCME, la vitesse de la respiration mitochondriale est légèrement ralentie. La mitochondrie cardiaque tend donc à fonctionner à l'économie après une CCME. Cet effet apparaît toutefois mineur, il est donc peu probable que ce soit le mécanisme mitochondrial majeur à l'origine de l'«ethanol preconditioning» mais peut toutefois y contribuer.

Couplage fonctionnel entre la CKmit et ANT

En ce qui concerne le couplage fonctionnel entre la Ckmit et ANT, une CCME ne modifie pas l'affinité de l'ATP pour la CKmit mais tend à diminuer la vitesse de synthèse de la PCr par la CKmit. En fait, les vitesses de synthèse de la PCr ne sont pas mesurées mais sont estimées à partir du produit: $VO_2 \times \text{rapport ADP/O}$. Etant donné qu'après une CCME, le rapport ADOP/O est très légèrement diminué (-3,5%) et que la mitochondrie éthanol tend à respirer légèrement plus lentement, il est donc normal que l'on retrouve une légère baisse de la VPCr.

L'éthanol et la créatine ne semblent donc pas intervenir dans les mêmes mécanismes. Une CCME n'a donc aucune influence sur l'efficacité du couplage fonctionnel entre la Ckmit, la phosphorylation oxydative et ANT. Une CCME induit un remodelage lipidique des membranes mitochondriales et ces modifications structurales ont certainement des conséquences sur la mitochondries mais différents de celles impliquant le couplage fonctionnel et la régulation de la fonction mitochondriale.

En ce qui concerne les effets des AGPI n-3 sur la CL et la fonction mitochondriale les études offrent des résultats contradictoires sur le cœur de rat : certains trouvent une augmentation de la CL (Yamaoka *et al.*, 1988; Pepe *et al.*, 1999), d'autre non (McMillin *et al.*, 1992). Des études montrent également que la fonction mitochondriale peut-être altérée (Yamaoka *et al.*, 1988), améliorée (Pepe *et al.*, 1999) ou pas modifiée (McMillin *et al.*, 1992). Dans notre cas, la cardioprotection induite par une CCME n'implique apparemment ni pas la nécessité de changements quantitatifs de la CL, ni un effet sur la fonction mitochondriale.

Ces modifications lipidiques ont sans nul doute des conséquences sur la mitochondrie cardiaque, mais lesquelles?

Conséquences possibles du remodelage lipidique induit par une CCME

Comme il a été dit précédemment, les AGPI n-3 sont impliqués dans la protection contre l'apoptose. Ces acides gras peuvent avoir une origine extra-cellulaire (fraction libre du plasma) ou être libérés des phospholipides membranaires sous l'action de phospholipases durant l'ischémie (Ford, 2002). D'ailleurs, Leaf (Leaf *et al.*, 2003) et McLennan (McLennan *et al.*, 1996) ont démontré sur le modèle de cœur isolé perfusé que des cellules cardiaques enrichies en AGPI n-3 relâchent des AGPI n-3 qui peuvent exercer leurs effets anti-arythmiques durant l'ischémie et la reperfusion.

On peut alors supposer que ce mécanisme puisse également s'appliquer à l'effet anti-infarctus observée après une supplémentation en AGPI n-3 (Culp *et al.*, 1980; Oskarsson *et al.*, 1993 AGPI n-3; Zhu *et al.*, 1994; Ogita *et al.*, 2003) voire même après une CCME. En effet, étant donné que l'éthanol et les AGPI n-3 exercent une protection similaire contre la nécrose cellulaire et qu'une CCME, comme une supplémentation en AGPI n-3, induisent également un enrichissement en AGPI n-3 des membranes mitochondriales cardiaques, on peut alors supposer qu'ces deux nutriments partagent des voies de cardioprotection similaires. En conséquence, l'effet anti-infarctus obtenue après une CCME (Pagel *et al.*, 200 et 2002; Kehl *et al.*, 2003; Guiraud *et al.*, 2004) ou après une supplémentation en AGPI n-3 (Culp *et al.*, 1980; Oskarsson *et al.*, 1993 AGPI n-3; Zhu *et al.*, 1994; Ogita *et al.*, 2003) pourrait-être le résultat d'un effet anti-apoptotique induit par la relâche cardiaque d'AGPI n-3.

Une autre question est de se demander si un remodelage lipidique de la CL pourrait jouer un rôle dans la réduction de la taille de l'infarctus induit par une CCME. En effet, la CL comporte des sites de liaison pour le cytochrome c au niveau de la membrane interne et la liaison du cytochrome c dépend largement de la composition en acides gras de la CL (DeVries *et al.*, 1997; Shidoji Y *et al.*, 1999). La peroxydation des acides gras de la CL peut notamment perturber la liaison entre le cytochrome c et la CL (Shidoji Y *et al.*, 1999; Nakagawa Y *et al.*, 2004). Hors, les AGPI n-3 ont la capacité de stimuler des système antioxydants comme la glutathion peroxydase (Crosby *et al.*, 1996). Par ce mécanisme, on peut supposer qu'une CCME, par l'intermédiaire des AGPI n-3, puisse protéger la CL contre l'oxydation, éviter le décrochement et la fuite du cytochrome c et ainsi inhiber l'apoptose (Nomura *et al.*, 1999). Toutefois, il faudrait de plus amples investigations pour déterminer si

l'enrichissement mitochondrial en AGPI n-3 induit par une CCME est suffisant pour induire une protection minimale contre l'oxydation.

L'augmentation des AGPI n-3 dans la CL et la PC des rats éthanol est impressionnante (ALA: +43% et DHA: +23% dans la PC; ALA: +38% et DHA: +30% dans la PC) et leur rôle potentiel durant l'ischémie est assez spectaculaire (zone infarctée: -36,6% vs contrôle). Cependant, la teneur des phospholipides en ALA et en DHA est assez faible (ALA+DHA: 0,67% dans la CL et 2,51% dans la PC). Néanmoins, les AGPI n-3 sont des molécules avec des propriétés biophysiques puissantes. Même avec des concentrations très faibles, les AGPI n-3 peuvent interagir avec des microdomaines spécifiques de la membrane comme par exemple des canaux ioniques et peuvent ainsi exercer de profonds changements sur les propriétés physico-chimiques (Hulbert *et al.*, 1999) et la physiologie de la cellule cardiaque (McLennan *et al.*, 1996; Leaf *et al.*, 2003). Supposer que les effets cardioprotecteurs d'une CCME résulte de petits changements en AGPI n-3 n'est pas irréaliste. D'ailleurs, des études cliniques ont montré qu'une légère élévation de la consommation en AGPI n-3 peut être associée à de puissants effets cardioprotecteurs (Leaf *et al.*, 2003; Harris *et al.*, 2004).

Autre acide gras, le palmitate. Une étude a montré que des cellules cardiaques néonatales exposées à des petites doses d'éthanol ont une réponse apoptotique altérée au palmitate (Sparagna *et al.*, 2004). Cette protection était par ailleurs associée à une perte de C16. Les auteurs ont alors émis l'hypothèse qu'un prétraitement d'éthanol protège les cardiomyocytes en augmentant le métabolisme oxydatif du palmitate et donc en abaissant son effet inhibiteur sur la synthèse de CL (Sparagna *et al.*, 2004). Toutefois, nous n'avons pas pu confirmer cette hypothèse car nous n'avons observé aucun effet de la CCME sur la CL sur notre modèle de cœur isolé de rat.

Alors que ce travail n'était pas conçu (et prévu) pour étudier les mécanismes spécifiques de la mort cellulaire post-ischémique, nous pouvons faire quelques rapprochements avec l'apoptose. Des études ont montré que l'apoptose induit par le palmitate est associée à une baisse de la synthèse de CL dans les myocytes cardiaques néonataux (Sparagna *et al.*, 2000 et 2004; Ostrander *et al.*, 2001). L'appauvrissement en CL est supposé prédisposer la fuite du cytochrome c hors de la mitochondrie, étape majeure de l'apoptose (Ostrander *et al.*, 2001).

Si nous extrapolons ce résultat à notre présent travail, on peut supposer que si une CCME protège contre la nécrose cellulaire, c'est probablement parce qu'une CCME induit un enrichissement de la CL en AGPI n-3 et non en palmitate ce qui permettrait d'éviter une baisse de synthèse de CL, une fuite de cytochrome c et donc le déclenchement de l'apoptose.

Par ailleurs, toute membrane biologique est constituée de protéines et lipides en proportions variables. Si l'environnement lipidique des protéines membranaires changent, le profil

protéique peut-être bouleversé à son tour. Appliquée à la mitochondrie, le remodelage lipidique induit par une CCME pourrait donc avoir des conséquences sur le fonctionnement des protéines membranaires. Etant donné les effets protecteurs d'une CCME sur l'apoptose et la nécrose, on peut supposer qu'une CCME interfère avec les protéines régulant le flux de calcium durant l'ischémie/reperfusion. Une élévation cytosolique trop importante du calcium est en effet reconnue pour stimuler la mort cellulaire. On peut citer par exemple le pore de perméabilité transitoire (PTP) implanté dans la membrane externe de la mitochondrie et qui intervient dans les phénomènes de mort cellulaire. Lors d'une perfusion post-ischémique, la survie de la cellule est menacée et ces conditions cytotoxiques stimulent l'ouverture du PTP (Griffiths *et al.*, 1995). Du calcium est alors libéré hors de la mitochondrie et il en résulte une surcharge calcique dans le cytosol qui stimule ensuite la voie de la mort cellulaire par nécrose et/ou apoptose (Di Lisa *et al.*, 2001; Pacher *et al.*, 2001). Il apparaît alors fort probable que cette protéine occupe un rôle non négligeable dans les phénomènes de préconditionnement myocardique. D'ailleurs, Halestrap collaborateurs Javadov *et al.*, 2003) ont montré que la cardioprotection induite par un préconditionnement ischémique passe par l'inhibition de l'ouverture du PTP à la reperfusion. On peut alors supposer que « l'éthanol preconditioning » puisse également inhiber (ou au moins partiellement) le PTP. Plus précisément, on peut supposer qu'à la suite des modifications structurales lipido-protéiniques induites par l'éthanol, le fonctionnement de certaines protéines s'en trouve altéré. Par exemple, l'ouverture post-ischémique du PTP pourrait être inhibée et donc, la libération de calcium bloquée. En résumé, une CCME pourrait réduire la taille de l'infarctus en limitant l'étendue de la nécrose et/ou de l'apoptose par limitation de la surcharge calcique via l'inhibition de l'ouverture de PTP.

IX. Conclusion

Ce travail est le premier à démontrer qu'une supplémentation journalière et à dose nutritionnelle en ALA-DHA-EPA (Mix alpha 3®, Laboratoire Synergia), protège efficacement contre la nécrose cellulaire après un infarctus du myocarde. Nous avons également vérifié qu'une supplémentation en AGPI n-3 entraîne un remodelage lipidique des membranes mitochondriales cardiaques en induisant un puissant enrichissement en AGPI n-3. Parallèlement, nous avons étudié les mécanismes cardioprotecteurs d'une CCME sur le cœur de rat. Nous avons montré pour la première fois qu'une CCME entraîne un enrichissement en AGPI n-3 dans le plasma, les GR, la phosphatidylcholine et la cardiolipine de mitochondries cardiaques. La cardioprotection induite par une CCME peut donc être apparentée à celle

-Partie 2-

induite par une consommation d'AGPI n-3. Une CCME entraîne également un appauvrissement en palmitate dans le plasma et les GR, un acide gras connu pour son rôle apoptotique. Malgré ce remodelage lipidique, l'éthanol n'a entraîné aucun effet notable sur la fonction mitochondriale. D'autres mécanismes mitochondriaux pourraient cependant être à l'origine de l'«ethanol preconditioning». Etant donné l'influence de l'éthanol sur les AGPI n-3 - acides gras cardioprotecteur et sur le palmitate - acide gras pro-apoptotique, il est probable que l'effet anti-infarctus d'une CCME soit le résultat, au moins en partie, d'une interaction entre l'éthanol, la voie des AGPI n-3 et les mécanismes de la mort cellulaire. L'apoptose est par ailleurs un phénomène complexe qui implique de nombreux médiateurs et effecteurs répartis dans de nombreuses voies de signalisation. On peut alors supposer que l'«ethanol preconditioning» pourrait résulter d'une somme de petits mécanismes plutôt que l'implication d'une seule et puissante voie de cardioprotection.

—— **CONCLUSION GÉNÉRALE** ——



-Conclusion générale-

La consommation modérée de boissons alcoolisées est associée à une diminution significative de la morbi-mortalité cardiovasculaire. Quoiqu'un effet bénéfique sur le métabolisme des lipoprotéines (augmentation des HDL), le risque thrombotique (effet anti-plaquettaire) et l'inflammation puisse partiellement expliquer cette protection, il est probable que d'autres mécanismes interviennent. De récentes études cliniques ont montré qu'une consommation modérée d'alcool pourrait diminuer le risque de complications post-infarctus et diminuer les risques de mort subite cardiaque suggérant un effet direct de l'éthanol sur le myocarde (préconditionnement myocardique). D'autres études cliniques ont également montré qu'une consommation modérée d'alcool entraîne une augmentation des acides gras polyinsaturés oméga 3 (AGPI n-3) dans le sang et les cellules. De telles modifications sont habituellement observables après une consommation d'AGPI n-3, acides gras réputés pour leurs effets cardioprotecteurs. Les données expérimentales et cliniques sur les effets cardiaques des AGPI n-3 et de l'éthanol laissent suggérer que la cardioprotection induite par une consommation chronique et modérée d'éthanol (CCME) ressemblent à celle induite par les AGPI n-3.

Ce présent travail a donc eu pour but d'évaluer les effets cardioprotecteurs d'une CCME et de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de ce preconditionnement myocardique. Plus exactement, nous avons testé si, à la manière des AGPI n-3, la cardioprotection induite par une CCME pourrait être la conséquence d'une induction des AGPI n-3 au niveau des membranes de la mitochondrie, organelle reconnue pour jouer un rôle critique durant l'ischémie, la reperfusion et le preconditionnement myocardique.

Dans la première partie de ce travail, nous avons évalué les effets d'une consommation chronique et modérée d'éthanol (CCME) sur la protection du myocarde après une ischémie régionale et reperfusion chez le rat. Nos travaux sont les premiers à démontrer qu'une consommation d'éthanol à des doses chroniques et modérées protège efficacement contre la nécrose cellulaire sur le modèle de cœur isolé perfusé de rat. Une CCME protège donc directement le myocarde contre les altérations liées à l'ischémie/reperfusion et peut donc être considéré comme une forme de preconditionnement myocardique appelé «ethanol preconditioning».

Notre second objectif a été de comprendre les mécanismes à l'origine de l'«ethanol preconditioning». Dans un premier temps, nous avons vérifié si une supplémentation en AGPI n-3 induit 1°) une cardioprotection comparable à celle induite par une CCME et 2°) un enrichissement en AGPI n-3 au niveau des membranes mitochondriales cardiaques. Dans un

-Conclusion générale-

second temps, nous avons déterminé si, l'éthanol, à la manière des AGPI n-3, pourrait induire un remodelage lipidique des membranes mitochondriales cardiaques à l'origine de modifications fonctionnelles qui pourraient expliquer la meilleure résistance du myocarde à l'ischémie/reperfusion.

Nos résultats montrent pour la première fois qu'une supplémentation journalière, à dose nutritionnelle en ALA-DHA-EPA (Mix alpha 3®, Laboratoire Synergia) protège efficacement contre la nécrose cellulaire sur un modèle de cœur isolé perfusé de rat. Une supplémentation en AGPI n-3 et une CCME sont donc comparables sur un premier point à savoir qu'ils protègent directement le myocarde contre la nécrose cellulaire. Par ailleurs, nous avons démontré que les membranes mitochondriales cardiaques s'enrichissent en AGPI n-3 après une supplémentation en AGPI n-3. Parallèlement, une CCME entraîne une induction des AGPI n-3 dans le plasma, les érythrocytes et les phospholipides de la mitochondrie cardiaque. Une supplémentation en AGPI n-3 et une CCME sont donc comparables sur un second point à savoir qu'ils sont à l'origine d'une induction des AGPI n-3. Si une CCME induit un enrichissement en AGPI n-3 des membranes mitochondriales, ce remodelage lipidique ne semble toutefois pas perturber la fonction mitochondriale. Enfin, nous avons également relevé une réduction de la teneur en palmitate dans le compartiment sanguin.

Etant donné l'influence de l'éthanol sur les AGPI n-3 – des acides gras cardioprotecteurs et sur le palmitate – un acide gras pro-apoptotique, il est fort probable que l'«ethanol preconditioning» soit la conséquence, au moins en partie, d'une interaction entre l'éthanol, la voie des AGPI n-3 et celle de la mort cellulaire.

———— **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES** ————



-Références bibliographiques-

A

Abe Y, El-Masri B, Kimball K. Soluble cell adhesion molecules in hypertriglyceridemia and potential significance on monocyte adhesion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:723-731.

Abeywardena M, McLennan P, Charnock J. Differential effects of dietary fish oil on myocardial prostaglandin I₂ and thromboxane A₂ production. *Am J Physiol* 1991;260:379-385.

Abeywardena M, McLennan P, Charnock J. Essential fatty acids and eicosanoids. In: Sinclair A, Gibson R, "Role of eicosanoids in dietary fat modification of cardiac arrhythmia and ventricular fibrillation". Edition: AOCS Publication, Champaign (IL);1993:pp257-261.

Abrahams J, Leslie A, Luuter R, Walker J. Structure and resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 1994;370:621-628.

Achleitner G, Gaigg B, Krasser A, Kainersdorfer E, Kohlwein S. Association between the endoplasmic reticulum and mitochondria of yeast facilitates interorganelle transport of phospholipids through membrane contact. *Eur J Biochem* 1999;264:545-553.

Albano E, French S, Ingelmann-Sundberg M. Hydroxyethyl radicals in ethanol hepatotoxicity. *Frontiers in Bioscience* 1999;4:533-540.

Albert C, Hennekens C, O'Donnell C, Ajani U, Carey V, Willett W, Ruskin J, Manson J. Fish consumption and risk of sudden cardiac death. *JAMA* 1998; 279:23-28.

Albert C, Manson J, Cook N, Ajani U, Gaziano J, Hennekens C. Moderate alcohol consumption and the risk of sudden cardiac death among US male physicians. *Circulation* 1999;100:944-950.

Albert C, Campos H, Stampfer M, Ridker P, Manson J, Willet W, Ma J. Blood levels of long-chain n-3 fatty acids and the risk of sudden death. *N Engl J Med* 2002;346:1113-1118.

Albert M, Glynn R, Ridker P. Alcohol consumption and plasma concentration of C-Reactive Protein. *Circulation* 2003;107:443-447.

Allain C, Pool L, Chan C, Richmond W, Fu P. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 1974;20:470-475.

Amarasuriya R, Gupta A, Civen M, Horng Y, Maeda T, Kashyap M. Ethanol stimulates apolipoproteine A-I secretion by human hepatocytes implications for a mechanism for atherosclerosis prevention. *Metabolism* 1992;1:827-832.

Anderson G, Connor W, Corliss J. Docosahexaenoic acid is the preferred dietary n-3 fatty acid for the development of the brain and retina. *Pediatr Res* 1990;27:89-97.

Ansell G, Spanner B. Plasmalogenase activity in normal and demyelinating tissue of the central nervous system. *Biochem J* 1968;108:207-209.

Antohe F, Dobrila L, Heltianu C, Simionescu N, Simionescu M. Albumin-binding proteins function in the receptor-mediated binding and transcytosis of albumin across cultured endothelial cells. *Eur J Cell Biol* 1993;60:268-275.

-Références bibliographiques-

Appel L, Miller E, Seidler A. Does supplementation of diet with 'fish oil' reduce blood pressure? A meta-analysis of controlled clinical trials. *Arch Intern Med.* 1993;153:1429-1438.

Archer S, Green D, Chamberlain M. Association of dietary fish and n-3 fatty acid intake with hemostatic factors in the coronary artery risk development in young adults (CARDIA) study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:1119-1123.

Artaud Wild S, Connor S, Sexton G, Connor E. Differences in coronary mortality can be explained by differences in cholesterol and saturated fat intakes in 40 countries but not in France and Finland. *Circulation* 1993;88:2771-2779.

Ascherio A, Rimm E, Stampfer M, Giovannucci E, Willett W. Dietary intake of marine n-3 fatty acids, fish intake, and the risk of coronary disease among men. *N Engl J Med* 1995;332:977-982.

Ascherio A, Rimm E, Giovannucci E. Dietary fat and risk of coronary heart disease in men: cohort follow up study in the United States. *BMJ.* 1996;313:84-90.

Awasthi Y, Chuang T, Keenan T, Crane F. Tightly bound cardiolipin in cytochrome oxidase. *Biochim Biophys Acta* 1971;226:42-52.

B

Badger T, Huang J, Ronis M, Lumpkin C. Induction of cytochrome P4502E1 during ethanol exposure occurs via transcription of the CYP2E1 gene when blood concentrations are high. *Biochim Biophys Res Commun* 1993;190:780-785.

Bang H, Dyerberg J, Sinclair H. The composition of the Eskimo food in north western Greenland. *Am J Clin Nutr* 1980;33:2657-2661.

Baraona E, Lieber C. Effects of chronic ethanol feeding on serum lipoprotein metabolism in the rat. *J Clin Invest.* 1970, 49:769-778.

Baraona E, Abittan C, Dohmen K, Moretti M, Pozzato G. Gender differences in pharmacokinetics of alcohol. *Alcohol Clin Exp Res* 2001;25:502-507.

Barboriak J, Rimm A, Anderson A, Schmidhoffer M, Tristani F. Coronary artery occlusion and alcohol intake. *Br Heart J* 1977;39:289-293.

Barr D, Russ E, Eder H. Protein-lipid relationships in human Plasma. In atherosclerosis and related conditions. *Am J Med* 1951;11:480-493.

Barth E, Stammler G, Speiser B, Schaper L. Ultrastructural quantitation of mitochondria and myofilaments in cardiac muscle from 10 different animal species including man. *J Mol Cell Cardiol* 1992;24:669-681.

Beilin L, Puddey I, Burke V. Alcohol and hypertension – kill or cure? *J Hum Hypertens* 1996;10:1-5.

Bellows S, Hale S, Kloner R. Acute ethanol does not protect against ischemic/reperfusion injury in rabbit myocardium. *J Thromb Thrombolys* 1996;3:181-184.

-Références bibliographiques-

- Bell-Parikh L**, Guengerich F. Kinetics of cytochrome P450E1-catalyzed oxidation of ethanol to acetic acid via acetaldehyde. *J Biol Chem* 1999;274:23833-23840.
- Berger K**, Ajani U, Kase C, Gaziano J, Buring J, Glynn R, Hennekens C. Light-to-moderate alcohol consumption and the risk of stroke among US male physicians. *Circulation* 1999;100:944-950.
- Berner J**, Sprecher H. An analysis of partial reactions in the overall chain elongation of saturated and unsaturated fatty acids by rat liver microsomes. *J Bio Chem* 1977;252:6736-6744.
- Bertièrè M**, Betoulle D, Apfelbaum M, Girard-Bloba A. Time-course, magnitude and nature of the changes induced in HDL by moderate alcohol intake in young no drinking males. *Atherosclerosis*, 1986;61:7-14.
- Bessman**, Fonyo A. The possible role of the mitochondrial bound creatine kinase in regulation of mitochondrial respiration. *Biochim Biophys Res Commun* 1966;22:597-602.
- Beyer K**, Klingenberg M. ADP/ATP carrier protein from beef heart mitochondria has high amounts of tightly bound cardiolipin, as revealed by ³¹P nuclear magnetic resonance. *Biochemistry* 1985;24:3821-3836.
- Billman G**, Hallaq H, Leaf A. Prevention of ischemia-induced ventricular fibrillation by ω -3 fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994;91: 4427-4430.
- Billman G**, Kang J, Leaf A. Prevention of sudden cardiac death by dietary pure ω -3 polyunsaturated fatty acids in dogs. *Circulation* 1999;99:2452-2457.
- Bjerregaard P**, Dyerberg J. Mortality from ischaemic heart disease and cerebrovascular disease in Greenland. *Int J Epidemiol* 1988; 17:514-519.
- Bjerregaard P**, Mulvad G, Pedersen H. Cardiovascular risk factors in Inuit of Greenland. *Int J Epidemiol* 1997;26:1182-90.
- Blomstrand R**, Svensson L. The effects of partially hydrogenated marine oils on the mitochondrial function and membrane phospholipid fatty acids in rat heart. *Lipids* 1983;18:151-170.
- Boffetta P**, Garfinkel L. Alcohol drinking and mortality among men enrolled in an American cancer Society prospective study. *Epidemiology* 1990;1:342-348.
- Bolli R**, Goldstein R, Davenport N, Epstein S. Influence of sulfinpyrazone and naproxen on infarct size in dog. *Am J cardiol* 1981;47:841-847.
- Bonaa K**, Bjerve K, Nordoy A. Habitual fish consumption, plasma phospholipid fatty acids, and serum lipids: the Tromso study. *Am J Clin Nutr* 1992;55:1126-1134.
- Bonow R**, Lipson L, Sheehan F. Lack of effect of aspirin on myocardial infarct in the dog. *Am J Cardiol* 1981;47:258-264.
- Bosron W**, Crabb D, Housinger T, Li T. Effect of fasting on the activity and turnover of rat liver alcohol dehydrogenase. *Alcohol Clin Exp Res* 1984;8:196-200.

-Références bibliographiques-

Bosron W, Li T. Genetic polymorphism of human liver alcohol and aldehyde dehydrogenases, and their relationship to alcohol metabolism and alcoholism. *Hepatology* 1986;6:502-510..

Boyer P. The binding change mechanism for ATP synthase-some probabilities and possibilities. *Biochim Biophys Acta* 1993;1140:215-250.

Bradford M. A rapid and sensitiv method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle protein-dye bindong. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.

Braunwald E, Kloner R. The stunned myocardium: prolonged postischemic ventricular dysfunction. *Circulation* 1982;66:1146-1149.

Brenna J. Efficiency of conversion of alpha-linolenic acid to long chain n-3 fatty acids in man. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002; 5:127-132.

British Nutrition Foundation. Fish and Seafood. Press Information 2002. [<http://www.nutrition.org.uk/>].

Brown R, Cunningham C. Negatively charged phospholipid requirement of the oligomycin-sensitive mitochondrial ATPase. *Biochim Biophys Acta* 1982;684:141-145.

Burr M, Fehily A, Rogers S, Holliday R, Sweetnam P, Elwood P, Deadman N. Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). *Lancet* 1989;30:757-761.

Burr M, Sweetham P, Fehily A. Diet and reinfarction. *Eur Heart J*. 1994;15:1152-1153.

Burstein C, Kandrach A, Racker E. Effect of phospholipases and lipase on submitochondrial particles. *J Biol Chem* 1971;246:4075-4082.

Burstein C, Kandrach A, Racker E. Effect of phospholipases and lipase on submitochondrial particles. *J Biol Chem* 1971;246:4083-4089.

C

Camacho T, Kaplan G, Cohen R. Alcohol consumption and mortality in Alameda County. *J Chronic Dis* 1987;40:229-236.

Camargo C, Hennekens C, Gaziano J, Glynn R, Manson J, Stampfer M. Prospective study of moderat alcohol consumption and mortality in US male physicians. *Arch Intern Med* 1997;157:79-85.

Camargo C, Stampfer M, Glynn R, Grodstein F, Gaziano J, Manson J, Buring J, Hennekens C. Moderate alcohol consumption and risk for angina pectoris or myocardial infarction in U. S. male physicians. *Ann Intern Med*. 1997;126:372-375.

Cao J, Blond J, Juaneda P, Durand G, Bezard J. Effect of low levels of dietary fish oil on fatty acid desaturation and tissue fatty acids in obese and lean rats. *Lipids* 1995;30:825-832.

Chance B, Williams G. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv Enzymol* 1956;17:65-134.

-Références bibliographiques-

Charnock J, McLennan P, Abeywardena M. Dietary modulation of lipid metabolism and mechanical performance of the heart. *Mol Cell Biol* 1992;116:19-25.

Charnock J. Lipids and cardiac arrhythmias. *Prog. Lip. Res.* 1994;33:355-385.

Chen Y, Saari J, Kang Y. Weak antioxidant defenses make the heart a target for damage in copper-deficient rats. *Free Radic Biol Med* 1994;17:529-536.

Chen C, Gray M, Mochly-Rosen D. Cardioprotection from ischemia by a brief exposure to physiological levels of ethanol: role of epsilon protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:12784-12789.

Chen C, Mochly-Rosen D. Opposing effects of delta and epsilon PKC in ethanol-induced cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* 2001;31:581-585.

Cheneval D, Carafoli E. Identification and primary structure of the cardiolipin-binding domain of mitochondrial creatine kinase. *Eur J Biochem* 1988;171:1-9.

Chin J, Dart A. How do fish oils affect vascular function? *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1995;22:71-81.

Christensen E, Woldseth T, Hagve B, Poll R, Wanders H, Sprecher O, Stokke. Peroxisomal oxidation of polyunsaturated long chain fatty acids in human fibroblasts. The polyunsaturated and the saturated long chain fatty acids are retroconverted by the same acyl-CoA oxidase. *Scand. J. Clin. Lab. Invest* 1993;536:61-74.

Christensen J, Christensen M, Dyerberg J, Schmidt E. Heart rate variability and fatty acid content of blood cell membranes: a dose-response study with n-3 fatty acids. *Am J Clin Nutr* 1999;70:331-337.

Christensen J, Skou H, Fog L, Hansen V, Vesterlund T, Dyerberg J, Toft E, Schmidt E. Marine n-3 fatty acids, wine intake, and heart rate variability in patients referred for coronary angiography. *Circulation.* 2001;103:651-657.

Cinti D, Cook L, Nagi M, Suneja S. The fatty acid chain elongation system of mammalian endoplasmic reticulum. *Prog Lipid Res* 1992;31:1-51.

Clot P, Albano E, Eliasson E, Tabone M, Arico S. Cytochrome P4502E1 hydroxyethyl radical adducts as the major antigen in autoantibody formation among alcoholics. *Gastroenterology* 1996;111:206-216.

Clot P, Parola M, Bellomo G, Dianzani U, Carini R. Plasma membrane hydroxyethyl radical adducts cause antibody-dependent cytotoxicity in rat hepatocytes. *Exposed to alcohol gastroenterology* 1997;113:265-276.

Coker S, Paratt J, Ledingham I. Evidence that thromboxane contributes to ventricular fibrillation induced by reperfusion of the ischaemic myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 1982;14:483-485.

Coker S, Paratt J. AH23848, a thromboxane antagonist, suppresses ischemia and reperfusion induced arrhythmias in anaesthetized greyhounds. *Br J Pharmacol* 1985;86:259-264.

-Références bibliographiques-

Collins T, Berridge M, Lipp P, Bootman M. Mitochondrial are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *EMBO* 2002;21:1616-1627.

Colombini M. A candidate for the permeability pathway of the outer mitochondrial membrane. *Nature* 1979;279:643-645.

Colombini M. Regulation of the mitochondrial outer membrane channel, VDAC. *J Bioenerg Biomembr* 1987;19:309-320.

Comte J, Gautheron D, Peypoux F, Michel G. Lipid composition and endogenous respiration of pig heart mitochondria. *Lipid* 1971;6:882-888.

Comte J, Maisterrena B, Gautheron D. Lipid composition and protein profiles of outer and inner membranes from pig heart mitochondria. Comparison with microsomes. *Biochim Biophys Acta* 1976;419:271-284.

Connor W, Neuringer M, Lin D. Dietary effects on brain fatty acid composition: the reversibility of n-3 fatty acid deficiency and turnover of docosahexaenoic acid in the brain, erythrocytes, and plasma of rhesus monkeys. *J Lipid Res* 1990;31:247-247.

Connor W. Alpha-linolenic acid in health and disease. *Am J Clin Nutr* 1999;69:827-828.

Connor W. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *Am J Clin Nutr* 2000; 71:171-176.

Contaldo F, D'Arrigo E, Caradente V, Cortese C, Coltorti A, Mancini M, Taskinen M, Nikkila E. Short-term effects of moderate alcohol consumption on lipid metabolism and energy balance in normal men. *Metabolism* 1989;38:166-171.

Corr P, Gross R, Sobel B. Amphipathic metabolites and membrane dysfunction in ischemic myocardium. *Circulation res* 1980;20:1021-1031.

Crabb D. Ethanol oxidizing enzymes : roles in alcohol metabolism and alcoholic Liver disease. *Prog Liver Dis* 1995;13:151-172.

Criqui M, Cowan L, Tyroler H, Bangdiwala S, Heiss G, Wallace R, Cohn R. Lipoproteins as mediators for the effects of alcohol consumption and cigarette smoking on cardiovascular mortality: results from the Lipid research Clinics Follow-up Study. *Am J Epidemiol* 1987;126:629-637.

Criqui M, Ringel B. Does diet or alcohol explain the French paradox? *Lancet* 1994;344:1719-23.

Crosby A, Wahle K, Duthie G. Modulation of glutathione peroxidase activity in human vascular endothelial cells by fatty acids and the cytokine interleukin-1 beta. *Biochim Biophys Acta* 1996;1303:187-192.

Cross R. The rotary binding change mechanism of ATP synthase. *Biochim Biophys Acta* 2000;1458:270-275.

Cross R. molecular motors: turning the ATP motor. *Nature* 2004;427:407-408.

-Références bibliographiques-

Crow K, Cornell N, Veech R. The role of alcohol dehydrogenase in governing rates of ethanol metabolism in rats. In: "Alcohol and Aldehyde Metabolizing Systems". Edition: Thurman, Williamson, Drott and Chance, New York Academic;1977:pp334-342.

Cuevas A, Guash V, castillo O, Iribarra V, Mizon C, San Martin A, Strobel P, Perez D, Germain A, Leighton F. A high-fat diet induces and red wine counteracts endothelial dysfunction in human volunteers. *Lipids* 2000;35:143-148.

Cullen K. The Busselton Population Studies. In: Conference Proceedings: "The medicinal virtues of alcohol in moderation". Sydney, Australia;1991:pp110-119.

Culp B, Lands W, Lucches B, Pitt B, Romson J. The effect of dietary supplementation of fish oil on experimental myocardial infarction. *Prostaglandins* 1980;20:1021-1031.

Cunnane S, McAdoo K, Horrobin D. Long-term ethanol consumption in the hamster: effects on tissue lipids, fatty acids and erythrocyte hemolysis. *Ann Nutr Metab* 1987;31:265-271.

D

Davenas E, Ciavatti M, Nordoy A, Renaud S. Effects of dietary lipids on behaviour, lipid biosynthesis and lipid composition in rat platelets. *Biochim. Biophys. Acta*, 1984;793:278-286.

Daviglus M, Stamler J, Orenca A, Dyer A, Liu K, Greenland P, Walsh M, Morris D, Shekelle R. Fish consumption and the 30-year risk of fatal myocardial infarction. *N Engl J Med* 1997;336:1046-1053.

De Caterina R, Libby P. Control of endothelial leukocyte adhesion molecules by fatty acids. *Lipids*. 1996;31:S57-S63.

De Caterina R, Liao J, Libby P. Fatty acid modulation of endothelial activation. *Am J Clin Nutr* 2000;71:S213-223.

De Leiris J, Opie L, Lubbe W, Bricknell O. Effect of substrate on enzyme release after coronary artery ligation in isolated rat heart. *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab* 1975; 10:291-293.

De Leiris J, Opie L. Effect of substrates and of coronary artery ligation on mechanical performance and on release of lactate dehydrogenase and creatine phosphokinase in isolated working rat hearts. *Cardiovasc Res* 1978;12:585-596.

De Lorgeril M, Renaud S. Serum albumin and platelet reactivity in coronary artery disease. *Lancet* 1990;335:348-349.

De Lorgeril M, Salen P, Martin J. Effect of a mediterranean type of diet on the rate of cardiovascular complications in patients with coronary artery disease. Insights into the cardioprotection effect of certain nutriment. *J Am Coll Cardiol* 1996;28:1103-1108.

De Lorgeril M, Salen P. Wine ethanol, platelets, and Mediterranean diet. *Lancet* 1999;353: 1067.

-Références bibliographiques-

De Lorgeril M, Salen P, Martin J, Monjaud I, Delaye J, Mamelle N. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation* 1999; 99:779-785.

De Lorgeril M, Salen P. Fish and N-3 fatty acids for the prevention and treatment of coronary heart disease: nutrition is not pharmacology. *Am J Med* 2002;112:316-319.

De Lorgeril M, Salen P, Defaye P, Mabot P, Paillard F. Dietary prevention of sudden cardiac death. *European Heart Journal* 2002;23:277-285.

De Lorgeril M, Salen P, Laporte F, de Leiris J. Alpha-linolenic acid in the prevention and treatment of coronary heart disease. *Eur Heart J* 2002;3:26-32.

De Lorgeril M, Salen P, Martin J, Boucher F, Paillard F, de Leiris J. Wine drinking and risks of cardiovascular complications after recent acute myocardial infarction. *Circulation* 2002; 106:1465-1469.

De Lorgeril, Salen P. *Le pouvoir des oméga 3*. Monaco. Edition: Alpen Editions; 2005: 127p.

De Lorgeril M, Salen P, Martin J. Interactions of wine ethanol with omega-3 fatty acids in patients with coronary heart disease. A fish-like effect of moderate drinking? (submitted)

Demaison L, Sergiel J, Moreau D, Grynberg A. Influence of the phospholipid n-6/n-3 polyunsaturated fatty acid ratio on the mitochondrial oxidative metabolism before and after myocardial infarction. *Biochim Biophys Acta* 1994;1227:53-59.

Desai K, Owen J, Wilson D, Hutton R. Platelet aggregation and plasma lipoproteins in alcoholics during alcohol withdrawal. *Thromb Haemost* 1986;55:173-177.

Devries J, Vork M, Roemen Tl. Saturated but not mono-unsaturated fatty acids induce apoptotic cell death in neonatal rat ventricular myocytes. *J Lipid Res* 1997;38:1384-1394.

Dewailly E, Blanchet C, Lemieux S, Sauve L, Gingras S, Ayotte P, Holub B. n-3 Fatty acids and cardiovascular disease risk factors among the Inuit of Nunavik. *Am J Clin Nutr* 2001;74:464-473.

Di Castelnuovo A, Rotondo S, Iacoviello L, Doanti M, de Gaetano G. Meta-analysis of wine and beer consumption in relation to vascular risk. *Circulation* 2002;105:2836-2844.

Dolecek T. Epidemiological evidence of relationships between dietary polyunsaturated fatty acids and mortality in the multiple risk factor intervention trial. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992;200:177-182.

Doll R, Peto R, Hall E, Wheatley K, Gray R. Mortality in relation to consumption of alcohol: 13 years' observations on male British doctors. *BMJ* 1994;309:911-918.

Doroshov J, Locker G, Myers C. Enzymatic defenses of the mouse heart against reactive oxygen metabolites: alterations produced by doxorubicin. *J Clin Invest* 1980;65:128-135.

Dow J, Hale S, Kloner R. Can moderate alcohol intake limit the size of myocardial infarction? *J Cardiovasc Pharmacol* 2001;37:662-667.

-Références bibliographiques-

Drees M, Beyer K. Interaction of phospholipids with the detergent-solubilized ADP/ATP carrier protein as studied by spin-label electron spin resonance. *Biochemistry* 1988;27:8584-8591.

Dupont I, Lucas D, Clot P, Menez C, Albano E. Cytochrome P4502E1 inducibility and hydroxyethyl radical formation among alcoholics. *J Hepatol* 1998;28:564-571.

Durrington P, Mackness B, Mackness M. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:473-480.

Dyerberg J, Bang H, Hjerne N. Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos. *Am J Clin Nutr* 1975;28:958-66.

Dyerberg J. Coronary heart disease in Greenland Inuit: a paradox. Implications for western diet patterns. *Arctic Med Res* 1989;48:47-54.

Dzeja P, Zeleznikar R, Goldberg N. Adenylate kinase: kinetic behaviour in intact cells indicates it is integral to multiple cellular processes. *Mol Cell Biochem* 1998;184:169-182.

E

Eckström G, Ingelman-Sundberg M. Rat liver microsomal NADPH-supported oxidase activity and lipid peroxidation dependent on ethanol-inducible cytochrome P450 (P450IIE1). *Biochem Pharmacol* 1989;38:1313-1319.

Ehrig T, Bosron W, Li T. Alcohol and aldehyde dehydrogenase. *Alcohol* 1990;25:105-116.

Ellison R. Cheers. *Epidemiology* 1990;1:337-339.

Endres S, von Schacky C. n-3 polyunsaturated fatty acids and human cytokine synthesis. *Curr Opin Lipidol*. 1996;7:48-52.

Engelbrecht A, Engelbrecht P, Genade S. Long-chain polyunsaturated fatty acids protect the heart against ischemia/reperfusion-induced injury via a MAPK dependent pathway. *J Mol Cell Cardiol* 2005;39:940-954.

Erickson-Viitanen S, Geiger P, Yang W, Bessman S. Compartmentation of mitochondrial creatine phosphokinase I. Direct demonstration of compartmentation with the use of labeled precursors. *J Biol Chem* 1982;257:14395-14404.

Erickson-Viitanen S, Geiger P, Viitanen P, Bessman P. Compartmentation of mitochondrial creatine phosphokinase II. The importance of outer mitochondrial membrane for mitochondrial compartmentation. *J Biol Chem* 1982;257:14405-14411.

F

Feuvray D. Ultrastructural, functional, and metabolic correlates in the ischemic rat heart. Effects of substrates. *Am J Physiol* 1981;240:391-398.

Fischer S, Weber P. Prostaglandin I₃ is formed in vivo in man after dietary eicosapentaenoic acid. *Nature* 1984;307:165-168.

-Références bibliographiques-

Fontana P, Mooser V, Bovet P, Shamlaye C, Burnand B, Lenain V, Marcovina S, Riesen W, Darioli R. Dose dependent inverse relationship between alcohol consumption and serum Lp(a) levels in black African males. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1075-1082.

Ford D. Alterations in myocardial lipid metabolism during myocardial ischemia and reperfusion. *Prog Lipid Res* 2002;41:6-26.

Fossati P, Prencipe L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem* 1982;29:2077-2080.

Friedman L, Kimball A. Coronary heart disease mortality and alcohol consumption in Framingham. *Amer J Epidemiol* 1986;124:481-489.

Fry M, Green D. Cardiolipin requirement for electron transfer in complex I and III of the mitochondrial respiratory chain. *J Biol Chem* 1981;256:1874-1880.

Fuch C, Stampfer M, Colditz G, Giovannucci E, Manson J, Kawachi I, Hunter D, Hankinson S, Hennekens C, Rosner B, Speizer F, Willett W. Alcohol consumption and mortality among women. *N Engl J Med* 1995;332:1245-1250.

Fujio, Y, Nguyen T, Wencker D, Kitsis R, Walsh K. Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart. *Circulation* 2000;101:660-666.

G

Gardner A, Vaillancourt R, Lange-Carter C, Johnson G. MEK-phosphorylation by MEK kinase, Raf, and mitogen-activated protein kinase: analysis of phosphopeptides and regulation of activity. *Mol Biol Cell* 1994;5:193-201.

Garg M, Sebokova E, Thompson A. Delta-6 desaturase activity in liver microsomes of rats fed diets enriched with cholesterol and/or n-3 fatty acids. *Biochem J* 1988;249:351-356.

Gaziano J, Buring J, Breslow J, Goldhaber S, Rosner B, Vandenburg M, Willett W, Hennekens C. Moderate alcohol intake, increased level of HDL and its subfractions, and decreased risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 1993;329:1829-1834.

Gaziano J, Hennekens C, Godfried SI. Type of alcoholic beverage and risk of myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1999;83:52-7.

Gaziano J, Gaziano T, Glynn R, Sesso H, Glynn R, Breslow J, Buring J. Light-to-moderate alcohol consumption and mortality in the Physicians' Health Study enrollment cohort. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:96-105.

Getz G, Bartley W, Lurie D, Notton B. The phospholipids of various sheep organs, rat liver and of their subcellular fractions. *Biochim Biophys Acta* 1968;152:325-339.

Gillman M, Cook N, Evans D, Rosner B, Hennekens C. Relationship of alcohol intake with blood pressure in young adults. *Am J Epidemiol* 1995;142:1106-1110.

-Références bibliographiques-

GISSI-Prevenzione investigators. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of GISSI-Prevenzione trial. *Lancet* 1999;354:447-455.

Goel D, Maddaford T, Pierce G. Effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids on cardiac sarcolemmal Na(+)/H(+) exchange. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:1688-1694.

Goldberg R, Burchfiel C, Reed D, Wergowske G, Chiu D. A prospective study of the health effects of alcohol consumption in middle-aged and elderly men. The Honolulu Heart Program. *Circulation* 1995;89:651-659.

Gomez-Tubio A, Pita M, Tavares E, Murillo M, Delgado M, Carreras O. Changes in the fatty acid profile of plasma and adipose tissue in rats after long-term ethanol feeding. *Alcohol Clin Exp Res* 1995;19:747-752.

Goode G, Garcia S, Heagerty A. Dietary supplementation with marine fish oil improves in vitro small artery endothelial function in hypercholesterolemic patients: a double-blind placebo-controlled study. *Circulation*.1997;96:2802-2807.

Gordon T, Castelli W, Hjortland M, Kannel W, Dawbert T. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. the Framingham Study. *Am Med* 1977;2:707-714.

Gordon T, Kannel W. Drinking habits and cardiovascular disease. The Framingham Study . *Am Heart J* 1983;105:667-673.

Grobbee D, Rimm E, Keil U, Renaud S. Health issues related to alcohol consumption. In: Mac Donald I, "Alcohol and the cardiovascular system". Edition: Blackwell Science, Londres. pp125-179.

Gronbaek M, Deis A, Sorensen T, Becker U, Schnohr P, Jensen G. Mortality associated with moderate intakes of wine, beer, or spirits. *BMJ* 1995;310:1165-1169.

Gronbaek M, Becker U, Johansen D *et al.* Type of alcohol consumed and mortality from all causes, coronary heart disease and cancer. *Ann Int Med* 2000;133:411-419.

Gross N, Gers G, Rabinowitz M. Apparent turnover of mitochondrial deoxyribonucleic acid and mitochondrial phospholipids in the tissues of the rat. *J Biol Chem* 1969;244:1552-1562

Grosse R, Spitzer E, Kupriyanov V, Saks V, Repke K. Coordinate interplay between (Na⁺/K⁺)-ATPase and creatine phosphokinase optimizes (Na⁺/K⁺)-antiport across the membrane of vesicles formed from the plasma membrane of cardiac muscle cell. *Biochim Biophys Acta* 1980;603:142-156.

Grover G, Schumacher W. Effect of the thromboxane receptor antagonist SQ49,548 on myocardial infarct size in dogs. *J Cardiovasc Pharmacol* 1988;11:29-35.

Grynberg A, Nalbhone G, Leonardi J, Lafont H, Athias P. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in cultured rat ventricular myocytes and hypoxia induced alterations of phospholipase-A activity. *Mol Cell Biochem* 1992;192:75-78.

-Références bibliographiques-

Grynberg A, Fournier A, Sergiel J, Athias P. Effect of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in the phospholipids of rat heart muscle cells on adrenoreceptor responsiveness and mechanism. *J Mol Cell cardiol* 1995;27:2507-2520.

Guengerich F, Shimada T. Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P450 enzymes. *Chem Res Toxicol* 1991;4:391-407.

Guiraud A, de Lorgeril M, Boucher F, Berthonneche C, Rakotosavo A, de Leiris J. Cardioprotective effect of chronic low dose ethanol drinking. Insights into the concept of ethanol preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 2004;36:561-566.

Guiverno M, Baraona E, Lieber C. Acute and chronic effects of ethanol and its metabolites on vascular production of prostacyclin in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1987;240:59-64.

Gunter T, Pfeiffer D. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol* 1990;258:755-786.

H

Hackenberg H, Klingnberger M. Molecular weight and hydrodynamic parameters of the adenosine 5'-triphosphate adenosine 5'-triphosphate carrier in Triton X-100. *Biochemistry* 1980;9:548-555.

Hagiage M, Marti C, Rigaud D, Senault C, Fumeron F, Apfelbaum M, Girard-Globa A. Effect of a moderate alcohol intake on the lipoproteins of normotriglyceridemic obese subjects compared with normoponderal controls. *Metabolism* 1992;41:856-861.

Hale S, Kloner R. Ethanol does not exert myocardial preconditioning in an intact rabbit model of ischemia/reperfusion. *Heart Dis* 2001;3:293-296.

Hallaq H, Sellmayer A, Smith T, Leaf A. Protective effects of eicosapentaenoic acid on ouabain toxicity in neonatal rat cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:7834-7838.

Hallaq H, Smith T, Leaf A. Modulation of dihydropyridine-sensitive calcium channels in heart cells by fish oil fatty acids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:1760-1764.

Handka K, Sasaki J, Saku K, Kono S, Arakawa K. Alcohol consumption, serum lipids and severity of angiographically determined coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1990;65:287-289.

Hankinson S, Hennekens C, Rosner B, Speizer F, Willett W. Alcohol consumption and mortality among women. *N Engl J Med* 1995;332:1245-1250.

Hansford R. Physiological role of mitochondrial Ca^{2+} transport. *J Bioenerg Biomenbr* 1994;26:495-508.

Hara A, Radin N. Lipid extraction of tissues with a low toxicity solvent. *Anal Bioch* 1978;90:420-426.

-Références bibliographiques-

Harb J, Comte T, Gautheron D. Asymmetrical orientation of phospholipids and their interactions with marker enzymes in pig heart mitochondrial inner membrane. *Arch Biochem Biophys* 1981;208:305-318.

Harris W, Connor W, Alam N. Reduction of postprandial triglyceridemia in humans by dietary n-3 fatty acids. *J Lipid Res.* 1988;29:1451-1460.

Harris W. n-3 Fatty acids and serum lipoproteins: human studies. *Am J Clin Nutr.* 1997;65:1645-1654.

Harris W, Rambjor G, Windsor S. N-3 fatty acids and urinary excretion of nitric oxide metabolites in humans. *Am J Clin Nutr.* 1997;65:459-464.

Harris W, Sands S, Windsor S. Omega-3 fatty acids in cardiac biopsies from heart transplantation patients. Correlation with erythrocytes and response to supplementation. *Circulation* 2004;110:1645-1649.

Haskell W, Camargo C, Williams P, Vranizan K, Krauss R, Lindgren F, Wood P. The effect of cessation and resumption of moderate alcohol intake of serum HDL subfractions. A controlled study. *N. Engl J Med* 1984;310:805-810.

Hasumura Y, Teschke R, Lieber C. Characteristics of acetaldehyde oxidation in rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 1976;251:4908-4913.

Hayashi M, Nasa Y, Tanosaka K, Sasaki H, Miake R, Hayashi J, Takeo S. The effects of long term treatment with eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on hypoxia/reoxygenation injury of isolated cardiac cells in adult rats. *J Moll Cell Cardiol* 1995; 27:2031-2041.

He K, Song Y, Daviglius M, Liu K, Van Horn L, Dyer A, Greenland P. Accumulated evidence of fish consumption and coronary heart disease mortality. A meta-analysis of cohort studies. *Circulation* 2004;109:2705-2711.

Hearse D, de Leiris J. *Enzymes in cardiology. Diagnosis and research.* John Wiley and sons Chichester p3-11.

Hédon E, Gilis P. Sur la reprise de la contraction du cœur, après arrêt complet de ses battements, sous l'influence d'une injection de sang dans les artères coronaires. *Compt rend Soc de Biol* 1892; p760.

Hegsted D, Ausman L. Diet, alcohol and coronary heart disease in men. *J Nutr* 1988;118:1184-1189.

Hendrickson R, Cahill P, McKillop I, Sitzmann J, Redmond E. Ethanol inhibits mitogen activated protein kinase activity and growth of vascular smooth muscle cells in vitro. *Eur J Pharmacol* 1998;362:251-259.

Hendrickson R, Cahill P, Sitzmann J, Redmond E. Ethanol enhances basal and flow-stimulated nitric oxide synthase activity in vitro by activating an inhibitory guanine nucleotide binding protein. *J Pharm Exp Ther* 1999;289:1293-1300.

-Références bibliographiques-

Hendrickson R, Okada S, Cahill P, Yankah E, Sitzmann J, Redmond E. Ethanol inhibits basal and flow-induced vascular smooth cell migration in vitro. *J Surg Res* 1999;84:64-70.

Hennekens C, Willett W, Rosner B. Effect of beer, wine, and liquor in coronary deaths. *JAMA* 1979;242:1973-1974.

Herzog V, Fahimi H. The effect of glutaraldehyde on catalase. Biochemical and cytochemical studies with beef liver catalase and rat liver peroxisomes. *J Cell Biol* 1974;60:303-311.

Hickson-Bick D, Buja M, McMillin J. Palmitate-mediated alterations in the fatty acid metabolism of rat neonatal cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32:511-519.

Hillbom M. What supports the role of alcohol as a risk factor for stroke? *Acta Med Scand* 1987;717:93-106.

Hirai A, Terano T, Tamura Y, Yoshida S. Eicosapentaenoic acid and adult diseases in Japan: epidemiological and clinical aspects. *J Intern Med Suppl* 1989;225:69-75.

Hiramatsu K, Nosaki H, Arimori S. A new method to quantitate lipid contents in human platelets by thin layer chromatography with flame ionization detection. *Tokai J Exp Clin Med* 1980;5:177-186.

Hock C, Holahan M, Reibel D. Effect of dietary fish oil on myocardial phospholipids and myocardial ischaemic damage. *Am J Physiol* 1987;252:H544-H560.

Hock C, Beck D, Bodine R, Reibel D. Influence of dietary n-3 fatty acids on myocardial ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1990;259:1518-1526.

Hoffmann B, Stockl A, Schlame M, Beyer K, Klingenberg. The reconstituted ADP/ATP carrier activity has an absolute requirement for cardiolipin as shown in cysteine mutants. *J Biol Chem* 1994;269:1940-1944.

Holub B. Fish oils and cardiovascular disease. *CMAJ* 1989;141:1063.

Homles R, Courtney Y, Vande Berg J. Alcohol dehydrogenase isozymes in baboons: tissue distribution, catalytic properties, and variant phenotypes in liver, kidney, stomach, and testis. *Alcohol Clin Exp Res* 1986;10:623-630.

Howe P. Dietary fats and hypertension: focus on fish oil. *Ann N Y Acad Sci.* 1997;827:339-352.

Hsu C, Kummerow F. Influence of elaidate and erucate on heart mitochondria. *Lipids* 1977;12:486-494.

Hu F, Stampfer M, Manson J. Dietary intake of alpha-linolenic acid and risk of fatal ischemic heart disease among women. *Am J Clin Nutr.* 1999;69:890-897.

Hu F, Bronner L, Willett W, Stampfer M, Rexrode K, Albert C, Hunter D, Manson J. Fish and omega-3 fatty acid intake and risk of coronary heart disease in women. *JAMA* 2002;287:1815-1821.

-Références bibliographiques-

Huang J, Xian H, Bacaner M. Long chain fatty acids activate calcium channels in ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:6452-6456.

Hulbert A, Else P. Membranes as possible pacemakers of metabolism. *J Theoret Biol* 1999; 199:257-274.

I

Imhof A, Froehlich M, Brenner H. Effect of alcohol consumption on systemic markers of inflammation. *Lancet* 2001;357:763-767.

Indu M, Ghfoorunissa I. N-3 fatty acids in indiets diet-comparison of the effects of precursor (alpha-linolenic acid) vs product (long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids). *Nutr Res* 1992; 12:569-82.

Isensee H, Jacob R. Differential effects of various oil diets on the risk of cardiac arrhythmias in rats. *J Cardiovasc Risk*. 1994;1:353-359.

Iso H, Sato S, Folsom A, Shimamoto T, Terao A, Munger R, Kitamura A, Konishi M, Iida M, Komachi Y. Serum fatty acids and fish intake in rural Japanese, urban Japanese, Japanese American and Caucasian American men. *Int J epidemiol* 1989;18:374-381.

Itoya M, Morrison JD, Downey HF. Effect of ethanol on myocardial infarct size in a canine model of coronary artery occlusion-reperfusion. *Mol Cell Biochem* 1998;186:35-41.

J

Jackson R, Scragg, R, Beaglehole R. Alcohol consumption and risk of coronary heart disease. *British Medical Journal* 1991;303:211-216.

Jacobus W and Lehninger A. Creatine kinase of rat heart mitochondria. Coupling of creatine phosphorylation to electron transport. *J Biol Chem* 1973;248:4803-4810.

Jacobus W and Saks V. Creatine kinase of heart mitochondria: changes in its kinetic properties induces by coupling to oxydative phosphorylation. *Arch. Biochem. Biophys* 1982; 219:167-178.

Jacobs H, Heldt H, Klingenberg M. High activity of creatine kinase in mitochondria from muscle and brain and evidence for asparate mitochondrial isoenzyme of creatine kinase. *Biochim Biophys Acta* 1964;16:516-521.

Jennings R, Sommer H, Smyth G, Flack H, Linn N. Myocardial necrosis induces by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol* 1960;70:68-78.

Jennings R, Ganote C. Structural changes in myocardium during acute ischemia. *Circ Res Suppl* 1974;34 et 35:156-168.

Jennings R, Reimer K. Factors involved in salvaging ischemic myocardium. Effects of reperfusion of arterial blood. *Circulation* 1983;68:125-136.

-Références bibliographiques-

Johansen O, Seljeflot I, Hostmark AT, *et al.* The effect of supplementation with omega-3 fatty acids on soluble markers of endothelial function in patients with coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vas Biol.* 1999;19:1681-1686.

Jugdutt B, Hutchins G, Bulkley B, Becker L. Salvage of ischemic myocardium by ibuprofen during infarction in the conscious dog. *Am J Cardiol* 1980;46:74-82.

K

Kaestner K, Ntambi J, Kelly T, Lane M. Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes. A second differentially expressed gene encoding stearoyl-CoA desaturase. *J Biol Chem* 1989;264:14755-14761.

Kagan A, Yano K, Reed D, MacLean C. Predictors of sudden cardiac death among Hawaiian-Japanese men. *Am J Epidemiol* 1989;130:268-277

Kaimal T, Shanta N. Quantitative analysis of lipid on copper (II) sulfate impregnated chromarods. *J of Chromatography* 1984;288:177-186.

Kamp F, Hamilton A. Movement of fatty acids, fatty acid analogues, and bile acids across phospholipid bilayers. *Biochem* 1993;32:11074-1085.

Kang J, Leaf A. The cardiac arrhythmic effects of dietary polyunsaturated fatty acid. *Lipids* 1996;31:41-44.

Karlsson N, Fellenius E, Kiessling K. The metabolism of acetate in the perfused hind-quarter of the rat. *Acta Physiol Scand* 1975;93:391-400.

Kaufman D, Rosenberg L, Helmrich S. Alcoholic beverages and myocardial infarction in young men. *Am J Epidemiol* 1985;121:548-554.

Kawamura S, Yoshida K, Miura T, Mizukami Y, Matsuzaki M. Ischemic preconditioning translocates PKC-delta and -epsilon and mediates functional protection in isolated rat heart. *Am J Physiol* 1998;275:H2266-2271.

Kay L, Nicolay K, Wieringa B, Saks V, Wallimann T. Direct evidence of the control of mitochondrial respiration by mitochondrial creatine kinase in muscle cells in situ. *J Biol Chem* 2000;275:6967-6944.

Kehl F, Krolikowski J, Ladisa J, Kersten J, Warltier D, Pagel S. Adenosine type 1 (A1) receptors mediate protection against myocardial infarction produced by chronic, intermittent ingestion of ethanol in dogs. *Int J Cardiol* 2003, 88:175-182.

Kervinen K, Savolainen M, Kesaniemi Y. Lp(a) levels increase after ethanol withdrawal. *Alcohol Clin Exp Res* 1993;17:926.

Kinoshita B, Itoh K, Nishida-Nakai M. Antiarrhythmic effects of eicosapentaenoic acid during myocardial infarction enhanced cardiac microsomal (Ca²⁺-Mg²⁺)-ATPase activity. *Jpn J Circ* 1994;58:903-912.

Kinsella J, Lokesh B, Stone R. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and amelioration of cardiovascular disease: possible mechanisms. *Am J clin Nutr* 1990;52:1-28.

-Références bibliographiques-

Kittner S, Garcia-Palmieri M, Costas R Jr, Cruz-Vidal M, Abbott R, Havlik R. Alcohol and coronary heart disease in Puerto Rico. *Am J Epidemiol* 1983;117:538-550.

Klatsky A, Friedman G, Siegelau A. Alcohol consumption before myocardial infarction. Results from the Kaiser-Permanente epidemiologic study of myocardial infarction. *Ann Intern Med* 1974;81:294-301.

Klatsky A, Armstrong M, Friedman G. Relations of alcoholic beverage use to subsequent coronary artery disease hospitalization. *Am J Cardiol* 1986;58:710-714.

Klatsky A, Armstrong M, Friedman G. Risk of cardiovascular mortality in alcohol drinkers, ex-drinkers and nondrinkers. *American Journal of Cardiology* 1990;66:1237-1242.

Klatsky A, Amstrong M, Friedman G. Alcohol and mortality. *Ann Intern med* 1992;117:646-654.

Klatsky A, Amstrong M. Alcoholic beverage choice and risk of coronary artery disease mortality : do red wine drinkers fare best ? *Am J Cardiol* 1993 ;71:467-479.

Klatsky A, Amstrong M, Friedman G. Red wine, white wine, liquor, beer, and risk of coronary artery disease hospitalization. *Am J Cardiol* 1997;80:416-420.

Klatsky A. Is the drink or the drinker?: circumstantial evidence only raises a probability. *Am J Clin Nutr.* 1999;69:2-3.

Klenk E, Mohrhauer H. Studies on the metabolism of polyenic fatty acids in the rat. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1960;320:218-232.

Klingenberg M. Membrane protein oligomeric structure and transport function. *Nature* 1981;290:449-454.

Kloner R, Ganote C, Jennings R. The “no-flow” phenomenon after temporary artery occlusion in the dog. *J Clin Invest* 1974;54:1496-1508.

Kloner R, Jennings R. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications. *Circulation* 2001;104:3158-3167.

Kluft C, Veenestra J, Schaafsma G, Pikaar N. Regular moderate wine consumption for five weeks increases plasma activity of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) in healthy young volunteers. *Fibrinolysis* 1990;4:69-70.

Knapp H. Essential fatty acids and eicosanoids. In: “Physiological and biochemical effects of n-3 fatty acids in man”. Edition: AOCS Publication, Champaign (IL). Edition: Sinclair A, Gibson R;1993:p330-333.

Knudsen J, Mandrup S, Rasmussen J, Andreasen P, Poulsen F. The function of acyl-CoA-binding protein (ACBP)/Diazepam binding inhibitor (DBI). *Mol Cell Bioch* 1993;123:129-138.

Koloravoric L, Fournier NC. A comparison of extraction methods for the isolation of phospholipids from biological sources. *Anal Bioch* 1986;156:244-250.

-Références bibliographiques-

Kono S, Ikeda M, Tokudome S, Nishizumi M, Kuratsune M. Alcohol and mortality : a cohort study of male Japanese physicians. *Int J Epidemiol* 1986;15:527-532.

Koop D, Coon M. Ethanol oxidation and toxicity : role of alcohol-P450 oxygenase. *Alcohol Clin Exp Res* 1986;10:44s-49s.

Koop D, Tierney D. Multiple mechanisms in the regulation of ethanol-inducible cytochrome P450 2E1. *Bioassays* 1990;12:429-435.

Kosarevic D, McGee D, Vojvodic N, radic Z, Dawber T, Gordon T, Zukel W. Frequency of alcohol consumption and morbidity and mortality: the Yugoslavia Cardiovascular Disease Study. *Lancet* 1980;1:613-616.

Kosarevic D, Demirovic J, Gordon T, Kaelber C, McGee D, Zukel W. Drinking habits and coronary heart disease the Yugoslavia Cardiovascular Disease Study. *Am J Epidemiol* 1982;116:748-758.

Krause S, Jacobus W. Specific enhancement of the cardiac myofibrillar ATPase by bound creatine kinase. *J Biol Chem* 1992;267:2480-2486.

Krebs H, Henseleit K. Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. *Hoppe Seyler's Z* 1932;210:33-66.

Krebs J, Hauser H, Carafoli E. Asymmetric distribution of phospholipids in the inner membrane of beef heart mitochondria. *J Biol Chem* 1979;254:5308-5316.

Krenz M, Baines C, Yang X, Downey J, Cohen M. Acute ethanol exposure fails to elicit preconditioning in situ rabbit hearts because of its continued presence during ischemia. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:601-607.

Kris-Etherton P, Taylor D, Yu-Poth S, Huth P, Moriarty K, Fishell V, Hargrove R, Zhao G, Etherton T. Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States. *Am J Clin Nutr* 2000;71:179-188.

Kromhout D, Bosschieter E, de Lezenne C. The inverse relation between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease. *N Engl J Med* 1985;312:1205-1209.

Kromhout D. N-3 fatty acids and coronary heart disease: epidemiology from Eskimos to Western populations. *J Intern Med Suppl* 1989;225:47-51.

Kurien V, Oliver M. A metabolic cause of arrhythmias during acute myocardial hypoxia. *Lancet* 1970;1:813-815.

Kuriki K, Nagaya T, Tokudome Y, Imaeda N, Fujiwara N, Sato J, Goto C, Ikeda M, Maki S, Tajima K, Tokudome S. Plasma concentrations of (n-3) highly unsaturated fatty acids are good biomarkers of relative dietary fatty acid intakes: a cross-sectional study. *J Nutr* 2003;133:3643-3650.

Kuznetsov A, Saks V. Affinity modification of creatine kinase and ATP-ADP translocase in heart mitochondria: determination of their stoichiometric ratio. *Biokhimia* 1986;51:1426-1437.

-Références bibliographiques-

Kuznetsov A, Saks V. Affinity modification of creatine kinase and ATP-ADP translocase in heart mitochondria: determination of their molecular stoichiometry. *Biochim Biophys res Commun* 1986;241:909-915.

L

Landolfi R, Steiner M. Ethanol raises prostacyclin in vivo and in vitro. *Blood* 1984;64:679-682.

Lange L, Bergmann S, Sobel B. Identification of fatty acid ethyl esters as products of rabbit myocardial ethanol metabolism. *J Biol Chem* 1981; 256:12968-12973.

Lange L, Sobel B. Mitochondrial dysfunction induced by fatty acid ethyl esters, myocardial metabolites of ethanol. *J Clin Invest* 1983;72:724-731.

Langendorff O. Untersuchungen am überlebenden Säugertierherzen. *Pflüg Arch* 1895;61: 291-332.

Langer R, Criqui M, Reed D. Lipoproteins and blood pressure as biological pathways for effect of moderate alcohol consumption on coronary heart disease. *Circulation* 1992;85:910-915.

Laporte R, Cresanta J, Kuller L. The relationship of alcohol consumption to atherosclerotic heart disease. *Prev Med* 1980;9:22-40.

Laposata E, Scherrer D, Mazow C, Lange L. Metabolism of ethanol by human brain to fatty acid ethyl esters. *J Biol Chem* 1987;262:4653-4657.

Lazarow B, de Duve C. A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976;73:2043-2046.

Lazarow P. Rat liver peroxisomes catalyze the β -oxidation of fatty acids. *J Biol Chem* 1978;253:1522-1528.

Leaf A, Weber P. Cardiovascular effects of n-3 fatty acids. *N Engl J Med* 1988;318:549-557.

Leaf A, Kang J, Xiao Y, Billman G. Clinical prevention of sudden cardiac death by n-3 polyunsaturated fatty acids and mechanism of prevention of arrhythmias by n-3 fish oils. *Circulation* 2003;107:2646-2652.

Lee R, Libby P. The unstable atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:1859-1867.

Leger A, Cochrane A, Moore F. Factors associated with cardiac mortality in developed country with particular reference to the consumption of wine. *Lancet* 1979;1:1017-1020.

Lepage G, Levy E, Ronco N, Smith L, Galeano N, Roy C. Direct transferication of plasma fatty acid in cystic fibrosis. *J Lip res* 1989;30:1483-1490.

Leppälä J, Paunio M, Virtamo J, Fogelholm R, Albanes D, Taylor P, Heinonen O. Alcohol consumption and stroke incidence in male smokers. *Circulation* 1999;100:1209-1214.

-Références bibliographiques-

Lesnefsky E, Chen Q, Slabe L, Stoll M, Minkler P, Hassan M, Tandler B, Hoppel C. Ischemia, rather than reperfusion, inhibits respiration through cytochrome oxidase in the isolated, perfused rabbit heart: role of cardiolipin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287:258-267.

Lieber C, de Carli L. Ethanol oxidation by hepatic microsomes : adaptative increase after ethanol feeding. *Science* 1968;162:917-918.

Lieber C. Microsomal ethanol-oxidizing system (MEOS): the first 30 years (1968-1998)-a review. *Alcohol Clin Exp Res* 1999;23:991-1007.

Linn S, Carroll M, Johnson C, Fulwood R, Kalsbeek W, Briefel R. High-density lipoprotein cholesterol and alcohol consumption in US white and black adults : data from NHANES II. *Am J Public Health* 1993;83:811-816.

Liu M, Anderson P, Luo J, Roubin G. Local delivery of ethanol inhibits intimal hyperplasia in pig coronary arteries after balloon injury. *Circulation* 1997;96:2295-2301.

M

Ma X, Baraona E, Lieber C. Alcohol consumption enhances fatty acid omega-oxidation, with a greater increase in male than in female rats. *Hepatology* 1993;18:1247-1253.

Maatman R, Van Moerkerk H, Nooren I, Van Zoelen E, Veerkamp J. Expression of human liver fatty acid-binding protein in *Escherichia coli* and comparative analysis of its binding characteristics with muscle fatty acid-binding protein. *BBA* 1991;1219:1-10

Maciejko J, Holmes D, Kottke B, Zinsmeister A, Dinh D, Mao S. Apolipoproteine A-I as a marker of angiographically assessed coronary-artery disease. *N Engl J Med* 1983;309:385-389.

Madsen L, Rustan A, Vaagenes H, Berge K, Dyroy E, Berge R. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid affect mitochondrial and peroxisomal fatty acid oxidation in relation to substrate preference. *Lipids* 1999;34:951-963.

Mannella C. Electron microscopy and image analysis of the mitochondrial outer membrane channel, VDAC. *J Bioenerg Biomembr* 1987;19:329-340.

Mannella C. Conformational changes in the mitochondrial channel protein VDAC and their functional implication. *J Struct Biol* 1998;21:207-218.

Manning A, Hearse D. Reperfusion-induced arrhythmias: mechanisms and prevention. *J Mol Cell Cardiol* 1984;16:497-518.

Marchioli R, Barzi F, Bomba E, Chieffo C, Di Gregorio D, Di Mascio R, Grazia Franzosi M, Geraci E, Levantesi G, Maggioni A, Mantini L, Marfisi R, Mastrogiuseppe M, Mininni N, Nicolosi G, Santini M, Schweiger C, Tavazzi L, Tognoni G, Tucci C, Valagussa F, on behalf of the GISSI-Prevenzione Investigators. Early Protection Against Sudden Death by n-3 Polyunsaturated Fatty Acids After Myocardial Infarction Time-Course Analysis of the Results of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI)-Prevenzione. *Circulation*. 2002;105:1897-1903.

-Références bibliographiques-

- Marckmann P**, Bladbjerg E, Jespersen J. Dietary fish oil (4 g daily) and cardiovascular risk markers in healthy men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:3384-391.
- Marckmann P**, Gronbaek M. Fish consumption and coronary heart disease mortality. A systematic review of prospective cohort studies. *Eur J Clin Nutr* 1999;53:585-590.
- Marmot M**, Brunner E. Alcohol and cardiovascular disease: The status of the U shaped curve. *British Medical Journal* 1991; 303:565-568.
- Martinez M**. Polyunsaturated fatty acid changes suggesting a new enzymatic defect in Zellweger syndrome. *Lipids* 1989;24:261-265.
- Maxwell S**, Cruickshank A, Thorpe G. Red wine and antioxidant activity in serum. *Lancet* 1994;344:193-4.
- Mc Gregor L**, Renaud S. Inhibitory effect of alcohol on platelet functions of rats fed saturated fats. *Thromb Res* 1981;22:221-225.
- Mc Lennan P**, Abeywardena M, Charnock J. Reversal of the arrhythmogenic effects of long-term saturated fatty acid intake by dietary n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *Am J Clin Nutr* 1990;51:53-58.
- McLennan P**, Bridle T, Abeywardena M, Charnock J. Comparative efficiency of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids in modulating ventricular fibrillation threshold in the marmoset monkey. *Am J Clin Nutr* 1993;58:666-669.
- McLennan P**, Dallimore J. Dietary canola oil modifies myocardial fatty acids and inhibits cardiac arrhythmias in rat. *J Nutr* 1995;125:1003-1009.
- McLennan P**, Howe P, Abeywardena M, Muggli R, Raederstorff D, Mano M, Rayner T, Head R. The cardiovascular protective role of docosahexanoic acid. *Eur J Pharmacol* 1996;300:83-89.
- McLennan P**. Myocardial membrane fatty acids and the antiarrhythmic actions of dietary fish oil in animal models. *Lipids* 2001;36:111-114.
- McMillin J**, Bick R, Benedict C. Influence of dietary fish oil on mitochondrial function and response to ischemia. *Am J Physiol* 1992;263:H1479-485.
- McVeigh G**, Brennan G, Cohn J. Fish oil improves arterial compliance in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb.* 1994;14:1425-1429.
- Mendall M**, Patel P, Asante M. Relation of serum cytokine concentrations to cardiovascular risk factors and coronary heart disease. *Heart* 1997;78:273-277.
- Mendoza S**, Zerpa A. Estradiol, testosterone, Apolipoproteins, lipoprotein cholesterol and lipolytic enzymes in men with premature myocardial infarction and angiographically assessed coronary occlusion. *Artery* 1983;12:1-23.
- Merritt R**, Guruge B, Miller D, Chaitman B, Bora P. Moderate alcohol feeding attenuates post-injury vascular cell proliferation in rabbit angioplasty model. *J Cardiovasc Pharm* 1997;30:19-25.

-Références bibliographiques-

Mezzano D, Leighton F, Martinez C. Complementary effects of Mediterranean diet and moderate wine intake on haemostatic cardiovascular risk factors. *Eur J Clin Nutr* 2001;55:444-451.

Mikelson J, Simpson P, Lucchesi B. Ischemic heart disease: pathology and pharmacology management. In: Antonaccio M, "Cardiovascular Pharmacology". Edition: Raven Press, New York (3ème édition), pp293-340.

Mishin V, Rosman A, Basu P, Kessova I, Oneta C, Liebers C. Chlorzoxazone pharmacokinetics as a marker of hepatic cytochrome P4502E1 in humans. *Am J Gastroenterol* 1998;93:2154-2161.

Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 1961;191:144-148.

Mitchell M, Meng X, Ao L, Brown J, Harken A, Banerjee A. Preconditioning of isolated rat heart is mediated by protein kinase C. *Circ Res* 1995;76:73-81.

Miyamae M, Diamond I, Weiner M, Camacho S, Figueredo V. Regular alcohol consumption mimics cardiac preconditioning by protecting against ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3235-3239.

Miyamae M, Camacho A, Zhou H, Diamond I, Figueredo V. Alcohol consumption reduces ischemia-reperfusion injury by species-specific signaling in guinea pigs and rats. *AJP-Heart and Circulatory Physiology* 1998;275:H50-H56.

Miyamae M, Rodriguez M, Camacho S, Diamond I, Mochly-Rosen D, Figueredo V. Activation of epsilon protein kinase C correlates with a cardioprotective effect of regular ethanol consumption. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:8262-8267.

Moreno A, Pares X. Purification and characterization of a new alcohol dehydrogenase from human stomach. *J Biochem* 1991;266:1128-1133.

Mori T, Beilin L, Burke V, Morris J, Ritchie J. Interactions between dietary fat, fish, and fish oils and their effects on platelet function in men at risk of cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17: 279-286.

Mori T, Watts G, Burke V. Differential effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on vascular reactivity of the forearm microcirculation in hyperlipidemic, overweight men. *Circulation*. 2000;102:1264-1269.

Morris M, Sacks F, Rosner B. Does fish oil lower blood pressure? A meta-analysis of controlled trials. *Circulation*. 1993;88:523-533.

Morris M, Manson J, Rosner B, Buring J, Willett W, Hennekens C. Fish consumption and cardiovascular disease in the physicians' health study: a prospective study. *Am J Epidemiol* 1995;142:166-175.

Mozaffarian D, Lemaitre R, Kuller L, Burke G, Tracy R, Siscovick D. Cardiac Benefits of Fish Consumption May Depend on the Type of Fish Meal Consumed. *The Cardiovascular Health Study*. *Circulation*. 2003;107:1372-1377.

-Références bibliographiques-

- Mukamal K**, Maclure M, Muller J, Sherwood J, Mittleman M. Prior alcohol consumption and mortality following acute myocardial infarction. *JAMA* 2001;285:1965-70.
- Mukamal K**, Conigrave K, Mittleman M, Camargo C, Stampfer M, Willett W, Rimm E. Roles of drinking pattern and type of alcohol consumed in coronary heart disease in men. *N Engl J Med* 2003;348:109-118.
- Muntwyler J**, Hennekens C, Buring J, Gaziano J. Mortality and light to moderate alcohol consumption after myocardial infarction. *Lancet* 1998;352:1882-1885.
- Murphy E**. Primary and secondary signalling pathways in early preconditioning that converge on the mitochondria to produce cardioprotection. *Circ Res* 2004;94:7-16.
- Murry C**, Jennings R, Reimer K. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74:1124-1136.
- N**
- Nagatomo T**, Hattori K, Ikeda M, Shimada K. Lipid composition of sarcolemma, mitochondria and sarcoplasmic reticulum from newborn and adult rabbit cardiac muscle. *Biochem med* 1980;23:108-118.
- Nair S**, Leitch J, Falconer J, Garg M. Prevention of cardiac arrhythmia by dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids and their mechanism of action. *J Nutr* 1997;127:383-393.
- Nair S**, Leitch J, Falconer J, Garg M. Cardiac (n-3) nonesterified fatty acids are selectively increased in fish oil-fed pigs following myocardial ischemia. *J Nutr* 1999;129:1518-1523.
- Nakagawa Y**. Initiation of apoptotic signal by the peroxidation of cardiolipin of mitochondria. *Ann NY Acad Sci* 2004;1011:177-184.
- Nanji A**. Alcohol and ischemic heart disease : wine, beer or both? *Int J Cardiol* 1985;8:487-489.
- Nanji A**, French S. Alcoholic beverages and coronary heart disease. *Atherosclerosis* 1986;60:1997-1998.
- Nanji A**, Zhao S, Sadrzadeh S, Dannenberg A, Tahan S, Waxman D. Markedly enhanced cytochrome P450 2E1. Induction and lipid peroxidation is associated with severe liver injury in fish oil-ethanol-fed rats. *Alcohol Clin Exp Res* 1994;18:1280-1285.
- Nasa Y**, Hayashi M, Sasaki H, Hayashi J, Takeo S. Long-term supplementation with eicosapentaenoic acid salvages cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced injury in rats fed with fish-oil deprived diet. *Jpn J Pharmacol* 1998;77: 137-146.
- Newmann W**, Propst M, Middaugh J. Atherosclerosis in Alaska natives and non-natives. *Lancet* 1993;341:1056-1057.
- Nervi A**, Peluffo R, Brenner R, Leikin A. Effect of ethanol administration on fatty acid desaturation. *Lipids* 1980;15:263-268.

-Références bibliographiques-

Nimmo H. The location of glycerol phosphate acyltransferase and fatty acyl CoA synthase on the inner surface of the mitochondrial outer membrane. FEBS 1979;101:262-264.

Nomura K, Imai H, Koumura T. Mitochondrial phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase suppresses apoptosis mediated by a mitochondrial death pathway. J Biol Chem 1999;274:29294-29302.

Nugteren D. The enzymic chain elongation of fatty acids by rat-liver microsomes. Biochim Biophys Acta 1965;106:280-290.

O

Ogita H, Node K, Asanuma H, Sanada S, Takashima S, Minamino, Soma M. Eicosapentenoic acid reduces myocardial injury induced by ischemia and reperfusion in rabbits hearts. J Cardiovasc Pharmacol 2003;41:964-969.

Oomen C, Ocke M, Feskens E, Kok F, Kromhout D. alpha-Linolenic acid intake is not beneficially associated with 10-y risk of coronary artery disease incidence: the Zutphen Elderly Study. Am J Clin Nutr 2001;74:457-463.

Opie L, Thomas N, Owen P, Norris N, Holland A, Van Noorden S. Failure of high concentrations of free circulating fatty acids to provoke arrhythmias in experimental myocardial infarction. Lancet 1971;1:818-822.

Opie L. The heart physiology, from cell to contraction, 3^e ed. Edition: New York: Lippincott-Raven;1998.

Oskarsson H, Godwin J, Gunnar R, Thomas J. Dietary fish oil supplementation reduces myocardial infarct size in a canine model of ischemia and reperfusion. JACC 1993;21:1280-1285.

Osmundsen H, Bremer J, Pederson J. Metabolic aspects of peroxisomal beta-oxidation. Biochim Biophys Acta 1991;1085:141-158.

Ostrander D, Sparagna G, Amoscato A, McMillin J, William Dowhan W. Decreased cardiolipin synthesis corresponds with cytochrome c release in palmitate-induced cardiomyocyte apoptosis. J Biol Chem 2001;276:38061-38067.

Oudot F, Grynberg A, Sergiel J. Eicosapentaenoic synthesis in cardiomyocytes: influence of hypoxia, reoxygenation and polyunsaturated fatty acids. Am J Physiol 1995;268:308-315.

Owen A, Peter-Przyborowska B, Hoy A, McLennan P. Dietary fish oil and time-response effects on cardiac phospholipid fatty acid composition. Lipids 2004;39:955-961.

P

Paassita M, Kervinen K, Rantakka A, Savolainen M, Lilja M, Reunanen A, Kesaniemi Y. Social alcohol consumption and low Lp(a) lipoprotein concentrations in middle age Finnish men: population based study. British Med J 1998;316:594-595.

-Références bibliographiques-

Pagel P, Toller W, Gross E, Gare M, Kersten J, Warltier D. K_{ATP} channel mediate the beneficial effects of chronic ethanol ingestion. *AJP-Heart and Circulatory Physiology* 2000; 279:H2574-H2579.

Pagel P, Krolikowski J, Kehl F, Mraovic B, Kersten J, Warltier D. The role of mitochondrial and sarcolemmal (K_{ATP}) channels in canine ethanol-induced preconditioning in vivo. *Anesth Anal* 2002; 94:841-848.

Palmer J, Schmid P, Pfeiffer D, Schmid H. Lipids and lipolytic enzyme activities of rat heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 1981,211:674-682.

Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Di Venosa N, Federici A, Ruggiero F. Decrease in Mitochondrial Complex I Activity in Ischemic/Reperfused Rat Heart: Involvement of Reactive Oxygen Species and Cardiolipin. *Circ Res* 2004;94:53-59.

Parkinson A, Cruz A, Heyward W, Bulkow L, Hall D, Barstæd L, Connor W. Elevated concentrations of plasma omega-3 polyunsaturated fatty acids among Alaskan Eskimos. *Am J Clin Nutr* 1994;59:384-388.

Pawlosky R, Salem N, . Perspectives on alcohol consumption: liver polyunsaturated fatty acids and essential fatty acid metabolism. *Alcohol* 2004;34:27-33.

Pelech S, Sanghera J. Mitogen-activated protein kinases: versatile transducers for cell signaling. *Trends Biochem Sci* 1992;17:233-238.

Pellegrini N, Simonetti P, Brusamolino A, Bottasso B, Pareti F. Composition of platelet phospholipids after moderate consumption of red wine in healthy volunteers. *Eur J Clin Nutr*

Pepe S, Tsuchiya N, Lakatta E. PUFA and aging modulate cardiac mitochondrial membrane lipid composition and Ca^{2+} activation of PDH. *Am J Physiol* 1999;276: H149-H158.1996;50:535-541.

Pepe S, Mc Lennan P. Cardiac membrane fatty acid composition modulates myocardial oxygen consumption and postischemic recovery of contractile function. *Circulation* 2002; 105:2303-2308.

Perkins G, Frey T. Recent structural insight into mitochondria gained by microscopy. *Micron* 2000; 31:97-111.

Perret P, Ruidavets J, Vieu C, Jaspard B, Cambou J, Terce F, Collet X. Alcohol consumption is associated with enrichment of high-density lipoprotein particles in polyunsaturated lipids and increased cholesterol esterification rate. *Alcohol Clin Exp Res* 2002;26:1134-1140.

Petersen D, Atkinson N, Hjelle J. Increase in hepatic microsomal oxidation by a single dose of ethanol. *J Pharmacol Exp Ther* 1982;221:275-281.

Pfrommer C, Erl W, Weber P. Docosahexaenoic acid induces *ciap1* mRNA and protects human endothelial cells from stress-induced apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;Feb 10.

Prescott S. The effect of eicosapentenoic acid on leukotriene B production by human neutrophils. *J Biol Chem* 1984;259:7615-7621.

-Références bibliographiques-

Puchois P, Ghalim N, Zylberberg G, Fievet P, Demarquilly C, Fruchart J. Effect of alcohol intake on human apolipoprotein A-I containing lipoprotein subfractions. *Arch Intern Med* 1990;150:1638-1641.

Pugh E, Kates M. Desaturation of eicosatrienoyl lecithin to arachidonoyl lecithin by rat liver microsomes. *J Biol Chem* 1977;252:68-73.

R

Raines E, Ross R. Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. *Br Heart J* 1993;69:30-37.

Randerath K. Chromatographie sur couche mince. Edition: Gauthier-Villars édition, Paris; 1971, pp149-153.

Rao G, Riley D, Larkin E. Comparison of thin layer chromatography/flame ionization detection system with other methods for the quantitative analysis of liver lipid contents in alcohol-fed rats and controls. *Lipids* 1985;20:531-535.

Rehm J, Bondy S, Sempos C, Vuong C. Alcohol consumption and coronary heart disease morbidity and mortality. *Am J Epidemiol* 1997;146:495-501.

Renaud S, Dumont E, Godsey F, Suplisson A, Thevenon C. Platelet functions in relation to dietary fats in farmers from two regions of France. *Thromb Haemost* 1978;40: 518-531.

Renaud S, Mc Gregor L. Alcohol, plaquettes sanguines et maladies coronaires. *Cah Nutr Diet* 1981;16:21-25.

Renaud S, Mc Gregor L, Martin J. Diet Diabet and atherosclerosis. In: Pozza G, "Influence of alcohol on platelet functions in relation to atherosclerosis". Edition: Raven Press, New York;1984:177-187.

Renaud S. Linoleic acid, platelet aggregation and myocardial infraction. *Atherosclerosis* 1990;80:255-6.

Renaud S, Beswick A, Fehily A, Sharp D, Elwood P. Alcohol and platelet aggregation: the Caerphilly Prospective Heart Disease Study. *Am J clin Nutr* 1992;55:1012-1017.

Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelet aggregation and the French Paradox for coronary heart disease. *Lancet* 1992;339:1523-1526.

Renaud S, Guegen R, Siest G, Salamon R. Wine, Beer, and mortality in middle-aged men from Eastern France. *Epidemiology* 1998;9:184-188.

Renaud S, Gueguen R, Siest G, Salamon R. Wine, beer and mortality in middle-aged men from eastern France. *Arch Intern med* 1999;159:1865-1870.

Resnicoff M, Sell C, Ambrose D, Baserga R, Rubin R. Ethanol inhibits the autophosphorylation of the insulin-like growth factor 1 (IGF-1) receptor and IGF-1 mediated proliferation of 3T3 cells. *J Biol Chem* 1993;268:21777-21782.

-Références bibliographiques-

Richmond W. Preparation and properties of a cholesterol oxidase from *Nocardia* sp. and its application to the enzymatic assay of total cholesterol in serum. *Clin Chem* 1973;19:1950-1956.

Ridker P, Vaughan D, Stampfer M. Association of moderate alcohol consumption and plasma concentration of endogenous tissue-type plasminogen activator. *JAMA* 1994;272:929-933.

Riemersma R, Sargent C, Saman S, Rebergen S, Abraham R. Dietary fatty acids and ischemic arrhythmias. *Lancet* 1988; 2:285-286.

Rimm E, Giovannucci E, Willett W, Colditz G, Ascherio A, Rosner B, Stampfer M. Prospective study of alcohol consumption and risk of coronary disease in men. *Lancet* 1991; 338:464-468.

Rimm E, Ellison R. Alcohol in the Mediterranean diet. *Am J Clin Nutr* 1995;61:1378S-1382S.

Rimm E. Review of moderate alcohol consumption and reduced risk of coronary heart disease: is the effect due to beer, wine, or spirits? *BMJ* 1996;312:731-736.

Rimm E, Williams P, Fosher K, Criqui M, Stampfer M. Moderate alcohol intake and lower risk of coronary heart disease: meta-analysis of effects on lipids and haemostatic factors. *BMJ* 1999;319:1523-1528.

Roberts B, Shoaf S, Jeong K, Song B. Induction of CYP2E1 in liver, kidney, brain and intestine during chronic ethanol administration and withdrawal. *Biochim Biophys Res Commun* 1994;205:1064-1071.

Roberts B, Shoaf S, Song B. Rapid changes in cytochrome P4502E1 (CYP2E1) activity and other P450 isozymes following ethanol withdrawal in rats. *Biochem Pharmacol* 1995;49:1665-1673.

Robinson N, Strey F, Talbert L. Investigation of the essential boundary layer phospholipids of cytochrome c oxidase using Triton X-100 delipidation. *Biochemistry* 1980;19:3656-3661.

Roche H, Gibney M. Postprandial triacylglycerolaemia: the effect of low-fat dietary treatment with and without fish oil supplementation. *Eur J Clin Nutr.* 1996;50:617-624.

Rochette L, Didier J, Lmoreau D, Bralet J. Effect of substrate on release of myocardial norepinephrine and ventricular arrhythmias following reperfusion on the ischemic isolated working rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 1980;2:267-279.

Rockerbie R, Dobson R, Frohlich J. Gas chromatographic analysis of patterns of fatty acids of cholesteryl esters and phosphatidylcholine. *Clin Chem* 1979;25:1411-1414.

Romelsjö A, Leifman A. Association between alcohol consumption and mortality, myocardial infarction and stroke in 25 year follow-up of 49618 young Swedish men. *BMJ* 1999;319:821-822.

-Références bibliographiques-

Romson J, Bush L, Jolly S, Lucchesi B. Cardioprotective effects of ibuprofen in experimental regional and global myocardial ischemia. *J Cardiovasc Pharmacol* 1982;4:187-196.

Rosenberg L, Slone D, Shapiro S, Kaufman D, Miettinen O, Stolley P. alcoholic beverages and myocardial infarction in young women. *Am J Public Health* 1981;71: 82-85.

Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-126.

Ruf J, Berger J, Renaud S. Platelet rebound effect of alcohol withdrawal and wine drinking in rats. *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 1995;15:140-144.

S

Sacks F, Pfeffer M, Moye L, Rouleau J, Rutherford J, Cole T, Brown L, Warnica J, Arnold J, Wun C, Davis B, Braunwald E. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N Engl J Med* 1996; 335:1001-1019.

Saks V et Charnousova G. Kinetics properties and the functional role of particulate MM-isoenzyme of creatine phosphokinase bound to heart muscle myofibrils. *FEBS* 1975;62:293-296.

Saks V, Chernousova G, Guvosky D, Smirnov V, Chazov E. Studies of energy transport in heart cells. Mitochondrial enzyme of cretaine phophokinase. Kinetic properties and regulatory action of Mg²⁺ ions. *Eur J Biochem* 1975;57:273-290.

Saks V, Lipina N, Liulina I, Chernousova G, Fetter R, Smirnov V, Chazov E. Functional characterization of the creatine phosphokinase reactions in heart mitochondria and myofibrils. *Biokhimiia* 1976;41:1460-1470.

Saks V, Lipina N, Smirnov V, Chazov E. Studies of energy transport in cardiac cells. The functional coupling between mitochondrial creatine phophokinase and ATP ADP translocase. *Arch Biochem Biophys* 1976;173:34-41.

Saks VA, Kupriyanov VV, Elizarova GV, Jacobus EJ. Studies of energy transport in heart cells. The importance of creatine kinase localization for the coupling of mitochondrial phosphorycreatine production to oxidative phosphorylation.. *J Biol Chem* 1980;255:755-763.

Saks VA, Kuznetsov AV, Kupriyanov VV, Miceli VM, Jacobus WE. Creatine kinase of rat heart mitochondria. The demonstration of functinal coupling to oxidative phosphorylation in an inner membrane-matrix preparation. *J Biol Chem* 1985;260:7757-7764.

Saks V, Kuchua Z, Kuznetsov A. Specific inhibition of ATP-ADP translocase in cardiac mitoplasts by antibodies against mitochondrial creatine kinase. *Biochim Biophys Acta* 1987;891:138-144.

Saks VA, Vassilyeva EV, Belikova Yu, Kusnetsov AV, Lyapina SA, Petrova L, Perov NA. Retarded diffusion of ADP in cardiomyocytes: possible role of outer membrane and creatine kinase in cellular regulation of oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 1993;1144: 134-148.

-Références bibliographiques-

Saks V, Kuchua Z, Vasilyeva E, Belikova Y, Kuznetsov A. Metabolic compartmentation and substrate channeling in muscle cells. Role of coupled creatine kinases in in vivo regulation of cellular respiration. A synthesis. *Mol Cell Biochem* 1994;133/134:155-192

Saks V, Kaambre T, Sikk P, Eimre M, Orlova E, Paju K, Piirsoo A, Appaix F, Kay L. Intracellular energetic units in red muscle cells. *Biochem J* 2001;356:643-657.

Saks V, Kuznetsov A, Vendelin M. Functional coupling as a basic mechanism of feedback regulation of cardiac energy metabolism. *Mol Cell Biochem* 2004;256-7:185-199.

Saleem M, Al-Tamer Y, Skursky L, Al-Habbal Z. Alcohol dehydrogenase activity in the human tissues. *Biochem Med* 1984;31:1-9.

Salmela K, Kessova I, Tsyrllov I, Lieber C. Respective roles of human cytochrome P450E1, 1A2 and 3A4 in the hepatic microsomal ethanol oxidizing system. *Alcohol Clin Exp Res* 1998;22:2125-2132.

Sanders T, Oakley F, Miller G. Influence of n-6 versus n-3 polyunsaturated fatty acids in diets low in saturated fatty acids on plasma lipoproteins and hemostatic factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:3449-3460.

Sanderson P, Finnegan Y, Williams C, Calder P, BurdgeG, Wootton SA, Griffin BA, Joe MD, Pegge NC, Bemelmans W. UK Food Standards Agency alpha-linolenic acid workshop report. *Br J Nutr* 2002; 88:573-579.

Sandker G, Kromhout D, Aravanis C, Bloemberg B, Mensink R, Karalias N, Katan M. Serum cholesteryl ester fatty acids and their relation with serum lipids in elderly men in Crete and The Netherlands. *Eur J Clin Nutr* 1993;47:201-208.

Santiago E, Lopez-Moratalla N, Segovia J. Correlation between losses of mitochondrial ATPase activity and cardiolipin degradation. *Biochem Biophys res Commun* 1973;53:439-445.

Scandinavian Simvastatin Survival Study. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994;344:1383-1389.

Schaper J, Heins S, Brand T, Schaper W. Contractile proteins and the cytoskeleton in isolated rat myocytes. *J Appli Cardiol* 1989;1: 423-429.

Sciao Y, Balcerzak B, Vance J. A mitochondrial membrane protein is required for translocation of phosphatidylserine from mitochondria associated-membranes to mitochondria. *Biochem J* 1998;331:217-223.

Schlame M, Augustin W. Association of creatine kinase with rat heart mitochondria: high and low affinity binding sites and the involvement of phospholipids. *Biomed Biochim Acta* 1985;44:1083-1088.

Schlattner U, Forstner M, Eder M, Stachowiak O, Fritz-Wolf K, Wallimann T. Functional aspects of the X-ray structure of mitochondrial creatine kinase: a molecular physiology approach. *Mol Cell Biochem* 1998;184:125-140.

-Références bibliographiques-

- Schmidt W**, Popham R. Alcohol consumption and ischemic heart disease: some evidence from population studies. *British Journal of Addiction* 1981;76:407-417.
- Schnyder T**, Engel A, Lustig A, Wallimann T. Native mitochondrial creatine kinase forms octameric structures. II. Characterization of dimers and octamers by ultracentrifugation, direct mass measurements by scanning transmission electron microscopy, and image analysis of single mitochondrial creatine kinase octamers. *J Biol Chem* 1988;263:16954-16962.
- Schultz G**, Schiltz E, Tomasselli A, Frank R, Brune M. Structural relationships in the adenylate kinase family. *Eur J Biochem* 1986;161:127-132.
- Schwartz S**, Liaw L. Growth control and morphogenesis in the development and pathology of arteries. *J Cardiovasc Pharm* 1993;21:31-49.
- Schwartz S**, Deblois D, O'Brien E. The intima: Soil for atherosclerosis and restenosis. *Circ Res* 1995; 77:445-465.
- Seigneur M**, Bonnet J, Dorian. Effect of the consumption of alcohol, white wine and red wine, on platelet function and serum lipids. *J Applied Cardiol* 1990;5:215-222.
- Seljeflot I**, Arnesen H, Brude I. Effects of omega-3 fatty acids and/or antioxidants on endothelial cell markers. *Eur J Clin Invest.* 1998;28:629-635.
- Sesso H**, Stampfer M, Rosner B, Hennekens C, Manson J, Gaziano J. Seven-year changes in alcohol consumption and subsequent risk of cardiovascular disease in men. *Arch Intern Med.* 2000; 160: 2605-2612.
- Seubert W**, Podack E. Mechanisms and physiological roles of fatty acid chain elongation in microsomes and mitochondria. *Mol Cell Biochem* 1973;1:29-40.
- Shahar E**, Folsom A, Wu K. Associations of fish intake and dietary n-3 polyunsaturated fatty acids with a hypocoagulable profile. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Arterioscler Thromb.* 1993;13:1205-1212.
- Shaper A**, Wannamethee G, Walker M. Alcohol and mortality in British men : explaining the U-shaped curve. *Lancet* 1988;2:1267-1273.
- Shaper A**. Alcohol and mortality: A review of prospective studies. *British Journal of Addiction* 1993;185:837-847.
- Shaper A**, Wannamethee S. Alcohol intake and mortality in middle aged men with diagnosed coronary heart disease. *Heart.* 2000;83:394-399.
- Shaw A**, Gescher A, Tooth D, Linhart I, Farmer P. The reaction of alkyl nitronates with glutathione. *Chem Res Toxicol* 1990;3:27-32.
- Shidoji Y**, Hayashi K, Komura S. Loss of molecular interaction between cytochrome c and cardiolipin due to lipid peroxidation. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;264:343-347.
- Sierksma A**, van der Gaag M, Kluft C. Moderate alcohol consumption reduces plasma CRP and fibrinogen levels; a randomized, diet-controlled intervention study. *Eur J Clin Nutr* 2002;56:1130-1136.

-Références bibliographiques-

Siess W, Roth P, Scherer B. Platelet membrane fatty acids, platelet aggregation and thromboxane formation during a mackerel diet. *Lancet* 1980;1:441-444.

Siguel E, Chee K, Gong J, Schaefer E. Criteria for essential fatty acid deficiency in plasma assessed by capillary column chromatography. *Clin Chem* 1987;33:1869-1873.

Simonis G, Weinbrenner C, Strasser R. Ischemic preconditioning promotes a transient, but not sustained translocation of protein kinase C and sensitisation of adenylyl cyclase. *Basic Res Cardiol* 2003; 98:104-113.

Simonsen T, Vartun A, Lyngmo V, Nordoy A. Coronary heart disease, serum lipids, platelets and dietary fish in two communities in northern Norway. *Acta Med Scand* 1987;222:237-245.

Simopoulos A. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am J Clin Nutr* 1991;54: 438-63.

Simopoulos A. Evolutionary aspects of diet: fatty acids, insulin resistance and obesity. In: Vanlallie TB, Simopoulos A, eds. "Obesity: news directions in assessment and management". Edition: Charles Press, Philadelphia;1995:241-261.

Simopoulos A. Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am J Clin Nutr* 1999;70:560-569.

Singh R, Rastogi S, Verma R, Laxmi B, Singh R, Ghosh S, Niaz M. Randomised controlled trial of cardioprotective diet in patients with recent acute myocardial infarction: results of one year follow up. *Br Med J* 1992; 304:1015-1019.

Singh R, Niaz M, Sharma J. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of fish oil and mustard oil in patients with suspected acute myocardial infarction: the Indian experiment of infarct survival-4. *Cardiovasc Drugs Ther* 1997;11:485-491

Sinclair H. Deficiency of essential fatty acids and atherosclerosis, etcetera. *Lancet* 1956; 270: 381-383.

Siscovick D, Raghunathan T, King I, Weinmann S, Wicklund K, Albright J, Bovbjerg V, Arbogast P, Smith H, Kushi L. Dietary intake and cell membrane levels of longchain n-3 polyunsaturated fatty acids and the risk of primary cardiac arrest. *JAMA* 1995; 274:1363-1367.

Siscovick D, Raghunathan T, King I, Weinmann S, Bovbjerg V, Kushi L, Cobb LA, Copass M, Psaty B, Lemaitre R, Retzlaff B, Knopp R. Dietary intake of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and the risk of primary cardiac arrest. *Am J Clin Nutr* 2000;71:208-212.

Smith M. Genetics of human alcohol and aldehyde dehydrogenases. *Adv Hum Genet* 1986;15:249-290.

Sommer J, Jennings R. Ultrastructure of cardiac muscle. In: Fozzard A, Jennings B, Haber A, Katz H, Morgan E. "The heart and cardiovascular system. Scientific foundations". Edition: Raven Press, New York;1986;vol 1:61-100.

-Références bibliographiques-

Sparagna G, Hickson-Bick D, Buja M, McMillin J. A metabolic role for mitochondria in palmitate-induced cardiac myocyte apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:H2124-H2132.

Sparagna G, Jones C, Hickson-Bick D. Attenuation of fatty acid-induced apoptosis by low-dose alcohol in neonatal rat cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287:H2209-2215.

Spirito P, Seidman C, McKenna W, Maron B. The management of hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1997;336:775-785.

Stampfer M, Colditz G, Willett W, Speizer F, Hennekens C. A prospective study of moderate alcohol consumption and the risk of coronary disease and stroke in women. *N Engl J Med* 1988;319:267-273.

Stampfer M, Hu F, Manson J. Primary prevention of coronary heart disease in women through diet and lifestyle. *N Engl J Med* 2000;343:16-22.

Stewart M, Malek K, Xiao Q, Dipple K, Crabb D. The novel aldehyde dehydrogenase gene, ALDH5 encodes an active aldehyde dehydrogenase enzyme. *Biochim Biophys res commun* 1995;211:144-151.

Stewart M. Alcohol and inflammation: a possible mechanism for protection against ischemic heart disease. *Nutr Metab cardiovasc Dis* 2002;12:48-51.

Stewart SH. Alcohol and inflammation: a possible mechanism for protection against ischemic heart disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2002;12:148-151.

Stillwell W, Wassall S. Docosaheptaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. *Chem Phys Lipids* 2003;126:1-27.

Stoner C et Sirak H. Osmotically-induced alterations in volume and ultrastructure of mitochondria isolated from rat liver and bovine heart. *J Cell Biol* 1969;43:521-538.

Storrie B and Madden E. Isolation of subcellular organelles. *Methods in enzymology* in Academic Press 1990;182:203-225.

Strasser R, Simonis G, Schön S, Braun M, Ihl-Vahl R, Weinbrenner C, Marquetant R, Kubler W. Two distinct mechanisms mediate a differential regulation of protein kinase C isozymes in acute and prolonged myocardial ischemia. *Circ Res* 1999;85:77-87.

Suh I, Shaten B, Cutler J, Kuller L. For the multiple risk factor intervention trial research group alcohol use and mortality from coronary heart disease: the role of high density lipoprotein cholesterol. *Ann Intern Med* 1992;116:881-887.

Suhonen O, Aromas A, Reunanen A, Knekt P. Alcohol consumption and sudden coronary death in middle-aged Finnish men. *Acta Med Scan* 1987;221:335-341.

T

Takahashi H, Johansson I, French S, Ingelman-Sundberg M. Effects of dietary fat consumption on activities of the microsomal ethanol oxidizing system and ethanol-inducible

-Références bibliographiques-

cytochrome P450 in the liver of rats chronically fed ethanol. *Pharmacol toxicol* 1992;70:347-352.

Takeo S, Nasa Y. Role of energy metabolism in the preconditioned heart. A possible contribution of mitochondria. *Cardiovasc Res* 1999;43:32-43.

Taskinen M, Välimäki M, Nikkita E, Kuusi T, Ehmholm C, Yllikahri R. HDL subfractions and postheparin plasma lipases in alcoholic men before and after ethanol withdrawal. *Metabolism*, 1982;31:1168-1174.

Taskinen M, Nikkilä E, Välimäki M, Sane T, Kuusi T, Kbsäniemi Y, Ylikahri R. Alcohol induced changes in serum lipoproteins and in their metabolism. *Am Heart J* 1987;113:458-464.

Teissedre P, Cabanis J, Moutounet M. Vin et santé, données actuelles. *Guide Vin et Santé*. Les Editions du Voyage;1996:22-39.

Terelius Y, Norsten-Hoog C, Cronholm T, Ingelman-Sundberg M. Acetaldehyde as an efficient substrate for ethanol-inducible cytochrome P450 (CYP2E1). *Biochim Biophys Res Commun* 1991;179:689-694.

Testa R, Marcovina S. The rate of plasmin formation after in vitro clotting is inversely related to lipoprotein(a) plasma levels. *Int J Clin Lab Res* 1999;29:128-132.

The MRFIT Research Group. Risk factors and mortality in the Multiple Risk Factors Intervention Trial after 10.5 years of follow-up. *J Am Coll Cardiol* 1989;13:11.

Theroux P, Chaitman B, Danchin N, Erhardt L, Meinertz T, Schroeder J, Tognoni G, White H, Willerson J, Jessel A. Inhibition of the sodium-hydrogen exchanger with cariporide to prevent myocardial infarction in high-risk ischemic situations. Main results of the GUARDIAN trial. Guard during ischemia against necrosis (GUARDIAN) Investigators. *Circulation* 2000;102:3032-3038.

Thomas M, Halsall J, Peters J. Role of hepatic acetaldehyde dehydrogenase in Alcoholism: demonstration of persistent reduction of cytosolic activity in abstaining patients. *Lancet* 1982;2:1057-1059.

Thum T, Borlak J. Cytochrome P450 mono-oxygenase gene expression and protein activity in cultures of adult cardiomyocytes of the rat. *Br J Pharmacol* 2000;130:1745-1752.

Thun M, Peto R, Lopez A, Monaco J, Henley S, Heath C, Doll R. Alcohol consumption and mortality among middle-aged and elderly US adults. *N Engl J Med* 1997;337:1705-1714.

Toki Y, Hieda N, Okumura K, Hashimoto H, Ito T, Ogawa K, Satake T. Myocardial salvage by a novel thromboxane A2 synthetase inhibitor in a canine coronary occlusion-reperfusion model. *Arzneimittelforschung* 1988;38:224-227.

U

US Food and Drug Administration. Office of Nutritional Products, Labeling, and Dietary Supplements, Center for Food Safety and Applied Nutrition. Letter responding to

-Références bibliographiques-

a request to reconsider the qualified claim for a dietary supplement health claim for omega-3 fatty acids and coronary heart disease. Docket No. 91N-0103. February 8, 2002.

V

Vajreshwari A, Narayanareddy K. Effect of dietary fats on some membrane-bound enzyme activities, membrane lipid composition and fatty acid profiles of rat heart sarcolemma. *Lipids* 1992;27:339-343.

Välimäki M, Laitinen K, Ylikahri R, Ehnholm C, Jauhiainen M, Bard J, Fruchart J, Taskinen M. The effect of moderate alcohol intake on serum apolipoprotein A-I containing lipoproteins and lipoprotein (a). *Metabolism* 1991;40:1168-1172.

Vamecq J, Valle L, de la Porte P, Fontaine M, de Craemer D, van den Branden C, Lafont H, Gratarolli R, Nalbone G. Effect of various n-3/n-6 fatty acid ratio contents of high fat diets on rat liver and heart peroxisomal and mitochondrial beta-oxidation. *Biochim Biophys Acta* 1993 ;1170:151-156.

Vance J, Schiao Y. Intracellular trafficking of phospholipids: import of phosphatidylserine into mitochondria. *Anticancer Res* 1996;16:1333-1339.

Van der Gaag M, Van Tol A, Scheek L. Daily moderate alcohol consumption increases serum paraoxonase activity ; a diet-controlled, randomised intervention study in middle-aged men. *Atherosclerosis* 1999;147:405-410.

Van der Vusse G, Glatz J, Stam H. fatty acid homeostasis in the normoxic and ischemic heart. *Physiol Rev* 1992;72:881-940.

Vasiliou V, Pappa A. Polymorphisms of human aldehyde dehydrogenases. Consequences for drug metabolism and disease. *Pharmacology* 2000;61:192-198.

Vasisht S, Agarwal D, Wasir H, Srivastava L. Lipoprotein (a) levels in alcohol drinking and alcohol non-dronking coronary artery disease patients. *Indian J Clin Biochem* 1996;11:176-179.

Veerkamp J, Maatman R. Cytoplasmic fatty acid-binding proteins: their structure and genes. *Prog Lipid Res* 1995;34:17-52.

Ventura-Clapier R, Kuznetsov A, Veksler V, Boehm E, Anflous K. Functional coupling of creatine kinases in muscles: species and tissue specificity. *Mol Cell Biochem* 1998;133-134:155-192.

Verdouw H, Bertina R. Affinities of ATP for the dinitrophenol-induced ATPase. *Biochem Biophys Acta* 1973;325:385-396.

Vignais P. Molecular and physiology aspects of adenine nucleotide transport in mitochondria. *Biochem Biophys Acta* 1976;456:1-38.

Voss A, Reinhart M, Sankarappa S, Sprecher H. The metabolism of 7,10,13,16,19-docosapentaenoic acid to 4,7,10,13,16,19-docohexaenoic acid in rat liver is independent of a 4-desaturase. *J Biol Chem* 1991;266:19995-20000.

-Références bibliographiques-

W

Walliman T, Wyss D, Brdiczka K, Nicolay K, Eppenberger H. Transport of energy in muscle: the phosphorylcreatine shuttle. *Biochem J* 1992;281:21-40.

Wang H, Oster G. Energy transduction in the F1 motor of ATP synthase. *Nature* 1998;396:279-282.

Wang Y, Crawford M, Chen J, Li J, Ghebremeskel K, Campbell T, Fan W, Parker R, Leyton J. Fish consumption, blood docosahexaenoic acid and chronic diseases in Chinese rural populations. *Comp Biochem A Mol Integr Physiol* 2003;136:127-140.

Wannamethee G, Shaper A. Men who do not drink: a report from the British Regional Heart Study. *Int J Epidemiol* 1988;17:307-316.

Wannamethee S, Shaper A. Alcohol and sudden cardiac death. *Br heart J* 1992;68:443-448.

Wannamethee S, Shaper A. Patterns of alcohol intake and risk of stroke in middle-aged British men. *Stroke* 1996;27:1033-1039.

Wannamethee S, Shaper A. Lifelong teatotalers, ex-drinkers and drinkers: mortality and the incidence of major coronary heart disease events in middle-aged British men. *Int J Epidemiol* 1997;26:523-531.

Wannamethee S, Shaper A. Type of alcoholic drink and risk of major coronary heart disease events and all-cause mortality. *Am J Public Health* 1999;89:85-90.

Wargovich T, Mehta J, Nichols W. Reduction in myocardial neutrophil accumulation in infarct size following administration of thromboxane inhibitor U-63,557A. *Am Heart J* 1987;114:1078-1085.

Weber P. Fish oil fatty acids and cardiovascular function: epidemiology and biochemical mechanisms. *Biochem Soc Trans* 1990;18:1045-1049.

Weber P, Leaf A. Cardiovascular effects of omega-3 fatty acids. Atherosclerosis risk factor modification by omega-3 fatty acids. *World Rev Nutr Diet* 1991;66:218-232.

Werth J. A little wine for heart's sake [letter]. *Lancet* 1980;2:1141.

Weylandt K, Kang J, Leaf A. Polyunsaturated fatty acids exert antiarrhythmic actions as free acids rather than in phospholipids. *Lipids* 1996;31:977-982.

Wheeldon L, Schumert Z, Turner D. Lipid composition of heart muscle homogenate. *J Lip Res* 1965;6:481-489.

Wilkstrom M. Mechanism of proton translocation by cytochrom c oxidase: a new four stroke histidine cycle. *Biochim Biophys Acta* 2000;1458:188-198.

Wu D, Cederbaum A. Ethanol and arachidonic acid produce toxicity in hepatocytes from pyrazole-treated rats with high levels of CYP2E1. *Mol Cell Biochem* 2000;204:157-167.

-Références bibliographiques-

Y

Yamaoka S, Urade R, Kito M. Mitochondrial function in rats is affected by modification of membrane phospholipids with dietary sardine oil. *J Nutr* 1988;118:290-296.

Yamashita K, Kajstura J, Discher D, Wasserlauf B, Bishopric N, Anversa P, and Webster K. Reperfusion-activated Akt kinase prevents apoptosis in transgenic mouse hearts overexpressing insulin-like growth factor-1. *Circ Res* 2001;88: 609-614.

Yanagisawa A, Matsukura T, Aoki N, Miyagawa M, Satoh K, Metori K, Mineo S, Ishikawa K. Protection of the rat myocardium from ischemic injury by dietary lamprey oil. *Ecosanoids* 1988;1:93-100.

Yang B, Saldeen G, Bryant J, Nichols W, Mehta J. Long-term dietary fish oil supplementation protects against ischemia-reperfusion-induced myocardial dysfunction in isolated rat hearts. *Am Heart J* 1993;126:1287-1292.

Yasunami M, Chen C, Yoshida A. A human alcohol dehydrogenase gene (ADH6) encoding an additional class of isozyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:7610-7614.

Yin S, Cheng C, Chen Y, Chao Y, Tang H, Chang T, Wu C. Human stomach alcohol and aldehyde dehydrogenases (ALDH): a genetic model proposed for ALDH III isozymes. *Biochem Genet* 1988;26:343-360.

Yin S, Han C, Lee A, Wu C. Human alcohol dehydrogenase family. Functional classification, ethanol/retinol metabolism, and medical implications. *Adv Exp Med Biol* 1999;463:265-274.

Yin S, Wang M, Liao C, Chen C, Wu C. Identification of a human stomach alcohol dehydrogenase with distinctive kinetic properties. *Bioch Int* 1990;22:829-835.

Yoshida K, Kamawura S, Misukami Y, Kitakaze M. Implication of protein kinase alpha, delta, epsilon isoforms in ischemic preconditioning in perfused rat hearts. *J Biochem* 1997;122:506-11.

Z

Zairis M, Ambrose J, Lyras A. C Reactive protein, moderate alcohol consumption, and long term prognosis after successful coronary stenting: four year results from the GENERATION study. *Heart* 2004; 90:419-424.

Zeleznikar R, Heyman R, Graeff R, Walseth T, Dawis S, Butz E, Goldberg N. Evidence for compartmentalized adenylate kinase catalysis serving a high energy phosphoryl transfer function in rat skeletal muscle. *J Biol Chem* 1990;265:300-311.

Zhang D, Colombini M. Group IIIA-metal hydroxydes indirectly neutralize the voltage sensor of the voltage-dependant mitochondrial channel, VDAC, by interacting with a dynamic binding site. *Biochim Biophys Acta* 1990;1025:127-134.

Zhang Q, Das K, Siddiqui S, Myers A. Effects of acute, moderate ethanol consumption on human platelet aggregation in platelet-rich plasma and whole blood. *Alcohol Clin Exp res* 2000;24:528-534.

-Références bibliographiques-

Zhu B, Sievers R, Sun Y. Is the reduction of myocardial infarct size by dietary fish oil the result of altered platelet function. *Am Heart J* 1994;127:744-755.

Zhu P, Zhou H, Gray M. Chronic ethanol induced myocardial protection requires activation of mitochondrial K_(ATP) channels. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32:2091-2095.

Zhou H, Karliner J, Gray M. Moderate alcohol consumption induces sustained cardiac protection by activating PKC-epsilon and Akt. *AJP- Heart and Circulatory Physiology* 2002; 283:H165-H174.

Ziegler O, Menez J, Debry G, Drouin P. Consommation d'alcool et lipoprotéines plasmatiques. *Cah Nutr Diet* 1995;0:216-223.

———— **LISTES DES FIGURES** ————



<i>Synthèse bibliographique</i>	<i>Page</i>
Figure 1: Biosynthèse de l'éthanol.	20
Figure 2: Système de transfert du NADH par la navette malate-aspartate.	29
Figure 3: Structure d'un acide gras.	34
Figure 4: Définition d'un acides gras saturé et d'un acide gras insaturé.	35
Figure 5: Nomenclatures des acides gras.	35
Figure 6: Conformation d'un acide gras saturé (a), configuration cis d'un acide gras mono- (b) et polyinsaturé (c), configuration trans d'un acide gras insaturé (d) et isomères géométriques (b,d).	38
Figure 7: Classification des lipides.	40
Figure 8: Digestion des lipides et leur assimilation.	41
Figure 9: Mécanismes de la lipolyse.	43
Figure 10: Transfert de l'acétyl-CoA de la mitochondrie vers le cytosol.	45
Figure 11: Carboxylation de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA.	46
Figure 12: Représentation schématique de l'acide gras synthase et de ses sites catalytiques.	47
Figure 13: Elongation des acides gras.	49
Figure 14: Synthèse des acides gras monoinsaturés.	50
Figure 15: Synthèse des acides gras polyinsaturés à très longues chaînes.	51
Figure 16: Transfert des acides gras par la navette carnitine.	53
Figure 17: La β -oxydation: un cycle de réactions.	54
Figure 18: Réduction et épimérisation : réactions nécessaires avant la β -oxydation des acides gras polyinsaturés.	56
Figure 19: Peroxysome et mitochondrie, siège de la dégradation des acides gras à chaînes longues.	57
Figure 20: Représentation schématique d'un sarcomère.	59
Figure 21: Représentation schématique d'une fibre musculaire cardiaque.	60

-Listes des figures-

Figure 22: Cycle de l'acide citrique.	60
Figure 23: Séquence des altérations cellulaires induites par l'ischémie myocardique.	62
Figure 24: Modèles de structures des membranes mitochondriales (Perkins <i>et al.</i> , 2000).	64
Figure 25: Schéma de la chaîne respiratoire mitochondriale	70
Figure 26: Structure de la MgATP synthase.	73
Figure 27: Schéma du mécanisme de liaison-échange (Boyer 1993).	74
Figure 28: Structure tridimensionnelle de l'adénine nucléotide translocase.	75
Figure 29: Structure tridimensionnelle de VDAC (Mannella 1998).	75
Figure 30: Structure tridimensionnelle de la créatine kinase mitochondriale.	77
Figure 31: Organisation schématique de l'unité énergétique intracellulaire (ICEU) (Saks <i>et al.</i> , 2001).	80
Figure 32: Who Monica Project : corrélation entre le risque de mortalité coronaire et une alimentation riche en cholestérol et en graisses saturées (CSI).	85
Figure 33: Consommation d'alcool et risque de mortalité toutes causes (Renaud <i>et al.</i> , 1999).	88
Figure 34: Type d'alcool consommé et risque de mortalité toutes causes (Renaud <i>et al.</i> , 1999).	88
Figure 35: Alcool et risque de mortalité coronarienne. (Ellison 1990).	89
Figure 36: Synthèse des eicosanoïdes.	102
Figure 37: Exemples de sources alimentaires en acides gras oméga 3.	104
Figure 38: Mécanisme vasorelaxant de l'éthanol.	133

Matériel et méthodes

Figure 39: Dispositif de perfusion aortique à pression constante du cœur isolé de rat.	146
Figure 40: Exemple de coupe de cœur de rat après coloration histoenzymologique au TTC.	146
Figure 41: Représentation schématique d'un chromatographe en phase gazeuse.	146

-Listes des figures-

Figure 42: Représentation schématique du détecteur à ionisation de flamme.	160
Figure 43: Représentation schématique des stades respiratoires.	165
Figure 44 Calcul de la consommation d'oxygène.	168

Partie 1

Figure 45 Effet de l'éthanol sur la croissance pondérale du rat après 7 (A) et 18 (B) semaines de consommation d'éthanol.	175
Figure 46 Ethanol et récupération fonctionnelle post-ischémique du ventricule gauche après 7 semaines de consommation modérée d'éthanol.	184
Figure 47 Ethanol et récupération fonctionnelle post-ischémique du ventricule gauche après 18 semaines de consommation modérée d'éthanol.	185
Figure 48 (A) Zone à risque et (B) taille de l'infarctus après 7 semaines de CCME.	187
Figure 49 (A) Zone à risque et (B) taille de l'infarctus après 18 semaines de CCME.	187

Partie 2

Figure 50 Effet d'une supplémentation en AGPI n-3 sur la croissance pondérale du rat.	199
Figure 51 Supplémentation en AGPI n-3 et récupération fonctionnelle post-ischémique du ventricule gauche.	203
Figure 52 Zone à risque (ZR) exprimée en pourcentage de la masse ventriculaire totale (VT).	204
Figure 53 Effet d'une supplémentation en AGPI n-3 sur la réduction de la taille de l'infarctus (ZI) exprimée en pourcentage de la zone à risque (ZR).	204
Figure 54 Effet de l'ATP sur la respiration mitochondriale en présence ou en absence de créatine.	234
Figure 55 Simulation des effets de l'ATP sur la cinétique de formation de phosphocréatine (PCr).	236

———— **LISTES DES TABLEAUX** ————



	<i>Page</i>
<hr/> Synthèse bibliographique <hr/>	
Tableau 1: Classification des ADH.	24
Tableau 2: Nomenclature et sources alimentaires des principaux acides gras.	37
Tableau 3: Composition phospholipidique de la mitochondrie cardiaque chez différents mammifères.	65
Tableau 4: Composition phospholipidique des membranes mitochondriales interne et externe de cœur de porc (Comte <i>et al.</i> , 1976).	66
Tableau 5: Distribution asymétrique des phospholipides de la membrane mitochondriale interne.	66
Tableau 6: Composition en acides gras des trois principaux phospholipides de la mitochondrie cardiaque de rat (Palmer <i>et al.</i> , 1981) et de bœuf (Wheeldon <i>et al.</i> , 1965).	68
Tableau 7: Composants prosthétiques de la chaîne mitochondriale de transfert d'électrons	70
Tableau 8: Interactions et modulation des enzymes membranaires par les phospholipides de la mitochondrie cardiaque.	81
Tableau 9: Corrélation entre la consommation d'alcool et la mortalité coronarienne.	84
Tableau 10: Type d'alcool consommé et risque de maladies coronariennes.	87
Tableau 11: Consommation d'alcool et risque de maladies cardiovasculaires.	95
Tableau 12: Effets cardioprotecteurs des AGPI n-3 : évidences épidémiologiques et cliniques.	112
Tableau 13: Effets des AGPI n-3 sur la protection du myocarde à l'ischémie/reperfusion.	118
Tableau 14: Consommation modérée d'alcool et taux plasmatique en apolipoprotéines (Ziegler <i>et al.</i> 1995).	127
Tableau 15: Effets de l'éthanol sur la protection du myocarde à l'ischémie/reperfusion.	136
<hr/> Matériel et méthodes <hr/>	
Tableau 16: Composition en acides gras du régime et des suppléments lipidiques.	143

-Listes des tableaux-

Tableau 17: Composition des tampons utilisés pour l'isolement des mitochondries.	151
Tableau 18: Composition en acides gras du mélange étalon.	155
Tableau 19: Compositions des milieux de respiration.	166

Partie 1

Tableau 20: Influence de l'éthanol sur la répartition des apports énergétiques après 7 semaines de consommation d'éthanol.	176
Tableau 21: Influence de l'éthanol sur la répartition des apports énergétiques après 18 semaines de consommation d'éthanol.	177
Tableau 22: Comparaison des apports lipidiques entre les groupes contrôle et éthanol après 7 semaines de consommation d'éthanol.	178
Tableau 23: Comparaison des apports lipidiques entre les groupes contrôle et éthanol après 18 semaines de consommation d'éthanol.	180
Tableau 24: Comparaison de la fonction ventriculaire gauche de base des groupes contrôle et éthanol après 7 et 18 semaines de consommation modérée d'éthanol.	182

Partie 2

Tableau 25: Influence d'une supplémentation en AGPI n-3 sur les apports énergétiques du rat.	200
Tableau 26: Comparaison des apports lipidiques des groupes SAT et OM3.	201
Tableau 27: Fonction ventriculaire gauche de base des groupes SAT et OM3.	202
Tableau 28: Effets d'une supplémentation en AGPI n-3 sur la composition en acides gras de la phosphatidylcholine mitochondriale de cœur de rat.	207
Tableau 29: Effets d'une supplémentation en AGPI n-3 sur la composition en acides gras de la phosphatidyléthanolamine mitochondriale de cœur de rat.	208
Tableau 30: Effets d'une supplémentation en AGPI n-3 sur la composition en acides gras de la cardiolipine mitochondriale de cœur de rat.	210
Tableau 31: Effets de l'éthanol sur le profil lipido-lipoprotéinique du plasma après 7 semaines de consommation d'éthanol.	213
Tableau 32: Effets de l'éthanol sur le profil lipido-lipoprotéinique du plasma après 18 semaines de consommation d'éthanol.	214

-Listes des tableaux-

Tableau 33: Comparaison du profil lipido-lipoprotéinique plasmatique après 7 et 18 semaines de consommation modérée d'éthanol par une ANOVA à 2 facteurs.	216
Tableau 34: Effets de l'éthanol sur le profil lipidique des globules rouges après 7 semaines de consommation d'éthanol.	219
Tableau 35: Effets de l'éthanol sur le profil lipidique des globules rouges après 18 semaines de consommation d'éthanol.	221
Tableau 36: Comparaison du profil lipidique des globules rouges après 7 et 18 semaines de consommation d'éthanol par une ANOVA à 2 facteurs.	223
Tableau 37: Distribution des principaux phospholipides dans la mitochondrie de cœur de rats après 18 semaines de consommation d'éthanol.	225
Tableau 38: Effets de l'éthanol sur la composition en acides gras de la phosphatidylcholine mitochondriale de cœur de rat.	227
Tableau 39: Effets de l'éthanol sur la composition en acides gras de la phosphatidyléthanolamine mitochondriale de cœur de rat.	228
Tableau 40: Effets de l'éthanol sur la composition en acides gras de la cardiolipine mitochondriale de cœur de rat.	230
Tableau 41: Tests et paramètres d'évaluation de la qualité de la préparation mitochondriale.	232
Tableau 42: Paramètres cinétiques apparents de la respiration pour l'ATP en présence ou en absence de créatine.	235
Tableau 43: Paramètres cinétiques apparents de la créatine kinase mitochondriale (CKmit) pour l'ATP.	237

—— **LISTE DES ABRÉVIATIONS** ——



-Liste des abréviations-

AA:	arachidonic acid
ABP:	albumin binding protein
AC:	adénylate cyclase
ACAT:	acyl-coA cholestérol acyltransférase
ACBP:	acyl-CoA binding protein
Acétyl CoA:	acétylcoenzyme A
a.c.t:	apport calorique total
ACT I:	acyl carnitine transférase I
ADH:	alcool déshydrogénase
ADP:	adénosine diphosphate
AgCl:	chlorure d'argent
AGMI:	acide gras monoinsaturé
AGPI n-6/n-3:	acide gras polyinsaturé n-6/n-3
AGPI-TLC n-6/n-3:	acide gras polyinsaturé à très longues chaînes n-6/n-3
AK:	adénylate kinase
ALA:	linolenic acid
ALDH:	aldéhyde déshydrogénase
AMP:	adénosine monophosphate
AMPc:	adénosine monophosphate cyclique
ANOVA:	analyse de la variance
ANT:	adénine nucléotide translocase
ARG:	arginine
ATP:	adénosine triphosphate
BSA:	bovine serum albumin
BV:	battements ventriculaires
CaCl₂, 7H₂O:	chlorure de calcium hydraté
CCME:	consommation chronique et modérée d'éthanol
CK:	créatine kinase
Ckmit:	créatine kinase mitochondriale
CL:	cardiolipine
CML	cellule musculaire lisse
CO₂:	dioxyde de carbone
CoASH:	coenzyme A
CoQ:	coenzyme Q
COX:	cyclooxygénase
CPG:	chromatographie en phase gazeuse
Cr:	créatine
CRP	c reactive protein
DC:	débit coronaire
DGAT:	diacylglycérol acyltransférase
DHA:	docosahexaénoïc acid
DHPR:	dihydropyridine receptor
DO:	densité optique
DPA:	docosapentaénoïc acid
+dP/dt:	dérivée première positive de la pression
-dP/dt:	dérivée première négative de la pression
DTT:	dithiotréitol
e⁻:	électron
EDTA:	ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA:	éthylène glycol-bis[b-aminoethylether]N, N, N', N'-tetraacetic acid
eNOS:	NO synthase endothéliale

-Liste des abréviations-

EPA:	eicospentaénoïc acid
ETOH 6%:	groupe expérimental éthanol 6%
ETOH 12%:	groupe expérimental éthanol 12%
FABP:	fatty acid binding protein
FAD(H2):	flavine adénine nucléotide dinucléotides (réduit)
FMN:	flavine mononucléotide
FV:	fibrillation ventriculaire
GLA:	gamma linolenic acid
GMPc:	guanosine monophosphate cyclique
GTP:	guanosine triphosphate
GR:	globule rouge
H₂O₂:	peroxyde d'hydrogène
HDL:	high density lipoprotein
HEPES:	acide N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-ethanesulfonique
ICEU:	intra cellular energetic unit
ICR:	indice du contrôle respiratoire
IG:	ischémie globale
INM:	infarctus non mortel
IR:	ischémie régionale
KATP:	canal potassique ATP dépendant
KCl:	chlorure de potassium
KH₂PO₄:	potassium dihydrogénophosphate
K_m:	constante de Michaëlis-Menten
KOH:	hydroxyde de potassium
LA:	linolenic acid
LDH:	lactate déshydrogénase
LH:	lipase hépatique
LHS:	lipase hormono-sensible
LPC:	lysophosphatidylcholine
LPL:	lipoprotéine lipase
LPX:	lipoxygénase
LRP:	LDL receptor related protein
LTB:	leucotriène
LVDP:	left ventricular developed pressure
LVEDP:	left ventricular end-diastolic pressure
LVESP:	left ventricular end-systolic pressure
MAMs:	membrane-associated membranes
MAPK:	mitotic activity protein kinase
MCV:	maladies cardiovasculaires
MEOS:	microsomal ethanol oxidizing system
MES:	2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid 4-Morpholineethanesulfonic acid
MGAT:	monoacylglycérol acyltransférase
MgCl₂:	chlorure de magnésium
MGL:	monoacylglycérol
MgSO₄, 7H₂O:	sulfate de magnésium hydraté
MPOS:	3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid 4-Morpholinepropanesulfonic acid
MS:	mort subite
MTP:	microsomal transfert protein
n-3:	acide gras oméga 3
n-6:	acide gras oméga 6
Na₂HPO₄:	hydrogénophosphate disodium

-Liste des abréviations-

Na₂S₂O₃:	dithionite de sodium
NaCl:	chlorure de sodium
NAD(H):	nicotinamide adénine dinucléotide (réduit)
NADP(H):	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (réduit)
NaH₂PO₄:	dihydrogénophosphate de sodium
NaHCO₃:	carbonate de sodium
NaOH:	hydroxyde de sodium
NO	oxyde nitrique
ns:	non significatif
O₂:	dioxygène
O₂^{••}:	superoxyde
OA:	oleic acid
OH:	hydroxyde
•OH:	radical hydroxyle
OM3:	groupe expérimental supplémenté en acides gras oméga 3
PAN-SH:	groupe phosphopantéthéine
PC:	phosphatidylcholine
PCr:	phosphocréatine
PE:	phosphatidyléthanolamine
PEP:	phosphoénolpyruvate
P_G:	protéine G
PGE:	prostaglandine
PI:	phosphatidylinositol
P_i:	phosphate inorganique
PKA:	protéine kinase A
PKC:	protéine kinase C
PS:	phosphatidylsérine
PTK	protein tyrosine kinase
PTP:	permeability transitory pore
R:	reperfusion
RA:	récepteur à adénosine
RE:	régime enrichi
RF:	récupération fonctionnelle post-ischémique
SAT:	groupe expérimental supplémenté en graisses saturés
SEM:	standard error mean
SM:	sphingomyéline
TI:	taille de l'infarctus
TNF-α	tumor necrosis factor α
TTC:	2,3-triphényl-tétrazolium
TV:	tachycardie ventriculaire
TXA:	thromboxane
VDAC:	voltage dependant anion channel
VLDL:	very low density lipoprotein
V_{max}:	vitesse maximale de la réaction
VO₂:	vitesse de consommation d'oxygène
VPCr:	vitesse de production de phosphocréatine
VT:	masse ventriculaire totale
ω3:	acide gras oméga 3
ω6:	acide gras oméga 6
ZI:	zone infarctée
ZR:	zone à risque

Résumé

Etude des effets et des mécanismes cardioprotecteurs de l'éthanol chez le rat.

La consommation chronique et modérée d'éthanol (CCME) est associée à une réduction de la mortalité cardiaque et à une élévation des acides gras oméga 3 (ω 3) dans le sang et les cellules. Les ω 3 d'origine alimentaire sont connus pour réduire la mortalité cardiaque chez l'homme, induire une cardioprotection chez l'animal et s'incorporer dans les membranes notamment de la mitochondrie, siège important de la cardioprotection. Comme l'éthanol et les ω 3 semblent induire des effets cardioprotecteurs similaires, nous avons déterminé si une CCME pouvait mimer le remodelage lipidique mitochondrial induit par une supplémentation en ω 3. Ces modifications structurales pourraient modifier la fonction mitochondriale et expliquer la cardioprotection par l'éthanol. A partir d'un modèle de cœur isolé perfusé de rat, nous avons montré que l'éthanol et les ω 3 protègent de manière similaire le myocarde en limitant la taille de l'infarctus après une ischémie/reperfusion. Après avoir vérifié qu'une supplémentation en ω 3 induit un enrichissement en ω 3 des membranes mitochondriales cardiaques, nous avons démontré qu'une CCME induit une augmentation des ω 3 dans la cardioline et la phosphatidylcholine mitochondriales mais sans conséquence sur la fonction mitochondriale. Dans le plasma et les membranes cellulaires, une CCME augmente les teneurs en ω 3 et réduit la concentration en palmitate, un acide gras pro-apoptotique. En conclusion, une CCME protège le myocarde contre la nécrose cellulaire, augmente la teneur en acides gras cardioprotecteurs (ω 3) et diminue la concentration en acide gras pro-apoptotique (palmitate). La cardioprotection induite par une CCME pourrait donc résulter d'une interaction entre l'éthanol, la voie des ω 3 et celle de l'apoptose.

Mots clés: *éthanol, myocarde, infarctus du myocarde, mitochondrie, fonction mitochondriale, phospholipides, acides gras oméga 3, palmitate.*

Abstract

Study of the cardioprotective effects and mechanisms of ethanol in the rat.

Chronic and moderate ethanol drinking (CMED) is associated with low cardiac mortality and results in increased plasma and cell levels of omega 3 fatty acids (ω 3). Dietary ω 3 are known to reduce cardiac mortality in humans, induce cardioprotection in animals and incorporate in membranes notably in mitochondria, an important target for cardioprotection. As ethanol and ω 3 seem to induce similar cardioprotective effects, our goal was to investigate whether a CMED might mimic dietary ω 3-induced mitochondrial lipid remodeling. These structural modifications might modulate mitochondrial function and explain ethanol cardioprotection. We showed that dietary supplementation with ω 3 and CCME protect both myocardium against ischemic/reperfusion in reducing infarct size on isolated perfused rat heart. After checking dietary ω 3-induced ω 3 increase in mitochondrial membranes, we demonstrated that CCME results in increased mitochondrial phosphatidylcholine and cardioline levels of ω 3 but without disturbance on mitochondrial function. In plasma and cell membranes, CMED resulted in higher ω 3 and lower pro-apoptotic palmitate levels. In conclusion, CMED protects myocardium against cell necrosis, increases cardioprotective fatty acids levels (ω 3) and decreases concentration of pro-apoptotic fatty acid (palmitate). CMED cardioprotection likely results from the interaction between ethanol, ω 3 and death cell pathways.

Key-words: *ethanol, myocardium, myocardial infarction, mitochondria, mitochondrial function, phospholipids, omega-3 fatty acid, palmitate.*