



Université - Clermont-Ferrand

**École doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé, Agronomie &
Environnement**

UFR de Médecine & des Professions paramédicales

UMR 1019 Unité de Nutrition Humaine – Equipe ASMS

Influence de l'acide eicosapentaénoïque sur l'activité cardiaque et sa modulation par le stress oxydant – Perspectives pour l'obésité et l'endocardite aiguë humaines

Leger Thibault

Spécialité Génétique, Physiologie, Pathologies, Nutrition, Microbiologie
Santé, Innovation

Directeurs de thèse : **Dr. Luc Demaison & Pr. Kasra Azarnoush**

Soutenue publiquement le 06 décembre 2019

Présidente de jury :

Dr. Béatrice Morio, Directrice de Recherche, CarMeN INSERM U1060 INRA UMR1397, Lyon

Membres du jury :

Pr. Catherine Vergely, Professeure d'Université, PEC2 EA 7460, Dijon

Dr. Christelle Guillet, Maître de Conférences Universitaire, UNH UMR1019 INRA-UCA,
Clermont-Ferrand

Dr. Cyril Reboul, Maître de Conférences, LaPEC EA4278, Avignon

ERRATUM

Dans les articles 2 et 4 présentés dans ce manuscrit, la notion de nitrosylation des protéines apparaît (modification post-traductionnelle induite par la réaction avec le NO disponible). Cette dénomination est erronée. En effet, l'anticorps utilisé dans les études correspondantes était un anticorps anti-Nitrotyrosine (ThermoFisher Scientific, #32-1900). Les résultats observés caractérisent donc la nitrotyrosination des protéines (modification post-traductionnelle induite par la présence des peroxy-nitrites).

« La curiosité n'est pas un goût pour ce qui est bon ou ce qui est beau, mais pour ce qui est rare, unique, que les autres n'ont point ; ce n'est pas un amusement mais une passion. »

François de La Rochefoucauld

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Docteur Luc Demaison, mon directeur de thèse, sans qui ce doctorat n'aurait pas eu lieu, sans qui mon parcours aurait été bien différent et sans qui je n'aurais pas écrit ce manuscrit. Votre encadrement depuis le stage de Master 1 jusqu'à aujourd'hui et l'apprentissage qui en a découlé continuera sans aucun doute à m'accompagner dans mon futur projet professionnel. Vous avez cru en moi et souhaité que je poursuive en thèse avec vous. Grâce à cette opportunité que vous m'avez offerte, je peux aujourd'hui présenter ce manuscrit après ces 3 années d'aventures professionnelles et humaines. Tout l'enrichissement qui en découle me suivra tout au long de mon avenir et pour cela je vous remercie.

Je remercie le Professeur Kasra Azarnoush d'avoir accepté de co-encadrer ma thèse. Il m'a permis de faire un premier pas concret dans le monde de la recherche clinique. Merci pour le temps que vous m'avez accordé et pour m'avoir aidé pour tous les aspects nécessaires à un doctorat. De plus, découvrir un bloc opératoire faisait partie de mes souhaits et grâce à vous il est aujourd'hui exaucé, je vous en remercie.

Je tiens à remercier chaleureusement le Docteur Christelle Guillet qui m'a accompagné durant de nombreuses années. En tant qu'enseignante pendant mon cursus universitaire puis collègue durant mon doctorat, tu boucles le cycle en me faisant l'honneur de participer à mon jury de thèse. Je te remercie chaleureusement pour toutes ces années où ton accompagnement a participé à mon apprentissage.

J'adresse également mes remerciements aux Docteurs Béatrice Morio et Cyril Reboul qui ont généreusement accepté d'être rapporteurs de ce travail.

Je remercie aussi la Professeure Catherine Vergely qui a aimablement consenti à être membre de mon jury de thèse.

Mes prochains remerciements s'adressent à toutes les personnes m'ayant entouré au sein de l'équipe ASMS qui m'a accueilli pendant toutes ces années.

Tout d'abord, je tiens à remercier tout particulièrement les Professeurs Yves Boirie et Stéphane Walrand pour m'avoir accueilli au sein de cette équipe ASMS durant toutes ces années. Les échanges humains et professionnels que j'ai pu avoir avec vous pendant tout ce temps ont toujours été des plus enrichissants.

Je remercie également chaudement le Docteur Marine Gueugneau qui, avec Stéphane, croit en moi au point de m'offrir un poste après ma thèse. Par votre confiance, vous me permettez d'élargir mon expérience professionnelle en découvrant une autre facette de la recherche et je vous en remercie. Marine, depuis ton arrivée dans cette équipe il y a 2 ans, tes qualités scientifiques et humaines ont été des plus appréciables et elles m'enthousiasment à l'idée de travailler avec toi pendant les prochains mois.

Je remercie vivement la Professeure Corinne Malpuech-Brugère pour m'avoir recommandé pour mon stage de Master et pour son soutien apporté aux travaux de recherche.

Ma thèse n'aurait pas été la même sans le Docteur Alexandre Pinel que je remercie chaleureusement. Tu as toujours répondu présent à la moindre demande d'aide qu'elle soit d'ordre technique ou scientifique. Ta sympathie, ta gentillesse naturelle, ton écoute et ta réflexion ont toujours aidé à m'aiguiller quand je me retrouvais dans une impasse. Notre passion commune pour le billard nous a également permis de nous divertir en dehors du laboratoire et j'espère que l'on continuera même après ma thèse. Alexandre, je te remercie pour tout et je te souhaite une bonne continuation dans tes nouvelles fonctions de MCU.

Je tiens à remercier vivement le Docteur Olivier Le Bacquer pour son soutien important durant mon doctorat. Tu m'as toujours épaulé grâce à ton analyse scientifique et ton expérience technique ; elles m'ont régulièrement aidé à éclaircir mes questionnements, parfois nombreux. Ta sympathie et ton humour ont très souvent égayé les journées et tu as, en plus, enrichi mon répertoire en « blagues à papa » !

Je remercie également le Docteur Frédéric Capel. Ton soutien, tes conseils et tes encouragements ont été précieux. Tu m'as également offert la chance de participer à mon premier congrès en me faisant prendre connaissance du CTPIOD. De plus, tu m'as spontanément proposé de corriger une partie de mon manuscrit alors que rien ne t'y obligeait. Merci pour tout cela et surtout pour ta sympathie.

Je tiens à adresser des remerciements tout particuliers à Jean-Paul Rigaudière qui m'a accompagné depuis mon stage de Master 1. Tu m'as également formé à certaines techniques de laboratoire et tu as toujours fait en sorte que les expérimentations se déroulent dans la bonne humeur. Outre tes qualités professionnelles, tu as régulièrement partagé ta culture et tes voyages apportant un peu d'évasion pour l'esprit. Pour tout cela, merci.

Je remercie également Chrystèle Jouve pour sa sympathie et son aide technique tout au long de ma thèse. En particulier durant ces derniers mois de rédaction intense, pendant lesquels tu m'as allégé d'une grande partie des derniers dosages nécessaires pour mon doctorat, me permettant ainsi de me concentrer sur l'écriture des articles et de mon manuscrit. C'était une aide très précieuse, merci beaucoup.

Je souhaite aussi remercier Christophe Montaurier. Outre tes connaissances et ta façon passionnante de parler des chambres et cages calorimétriques, ta sympathie a toujours rendu très agréable le fait de travailler avec ces instruments ou simplement d'échanger au quotidien. Tes qualités humaines ont été renforcées par tes goûts musicaux qui m'ont toujours encouragé à covoyer avec toi !

Je tiens également à remercier Véronique Patrac, Jérôme Salles et Christophe Giraudet dont les connaissances et l'expérience m'ont souvent secouru durant ces années. Bien que nous n'ayons jamais travaillé ensemble sur un même projet, chacun de vous m'a aidé à un moment ou à un autre. Je vous remercie également pour la sympathie qui a accompagné nos échanges.

Le travail dans une telle équipe n'aurait pu se faire sans la participation de notre super secrétaire Irène Fernandes. Irène, tu as toujours été dévouée pour aider chacun d'entre nous le plus efficacement et le plus rapidement possible. Outre ton professionnalisme, ta bonne humeur quotidienne a toujours été un plaisir. Merci pour tout cela.

J'adresse également mes remerciements à Phelipe Sanchez pour sa sympathie, à Mathieu Rambeau qui sait nous régaler les papilles et à Sarah de Saint-Vincent dont la gentillesse est connue de tous.

Je remercie également toutes les personnes qui sont passées plus ou moins brièvement dans l'équipe au cours de ces années. Tout d'abord, un grand merci à Claire pour sa gentillesse, sa joie de vivre et pour le temps qu'elle m'a accordé à me former aux Western blots. Mes remerciements vont également à Karima, Laurie, Carla et Elodie. Votre rencontre a été un réel plaisir.

Je souhaite remercier également Joëlle Demaison dont la gentillesse et la sympathie naturelles ont toujours rendu nos échanges des plus agréables.

Une thèse ne serait pas aussi agréable sans les autres doctorants et étudiants qui partagent nos journées. Je remercie tout particulièrement Julianne et Laura pour nos très sympathiques moments de détente en terrasse après le boulot. Je vous remercie pour tous ces rires partagés et votre amitié. Je vous souhaite bon courage pour la suite de vos projets.

Je ne pourrais pas rédiger ces lignes sans te remercier Camille pour ta sympathie, ta joie de vivre et l'écoute dont tu as fait preuve dès ton arrivée dans ce laboratoire. Depuis ton stage de simples connaissances du laboratoire, nous sommes devenus amis et tu fais toujours preuve de ces mêmes qualités. Pour cela, un grand merci ! Je remercie également Kassandra Lanchais pour ta sympathie et pour l'exemple de motivation dont tu fais preuve sans relâche. Je te souhaite un succès mérité pour ton doctorat.

Une thèse ne serait pas la même sans l'appui de ses proches. Pour cela, je tiens à remercier ma famille qui m'a accompagné toutes ces années durant, me conduisant à la fin de ce doctorat. Mon parcours a été un peu sinueux, mais si je suis là aujourd'hui, c'est aussi grâce à vous. A vous mes parents qui, tout ce temps, m'avez apporté tout ce que vous pouviez pour que je puisse avancer, pour la patience et le soutien indéfectible dont vous avez fait preuve. Merci pour votre amour, pour la confiance et la fierté dont vous faites preuve à mon égard. Je pourrais écrire mille lignes sans forcément trouver les mots justes alors je vais simplement, avec tout mon amour, vous dire : merci.

Je veux également dire merci à ma sœur Anne-Aurore et à mon frère Pierre-Alexis. J'ai grandi à vos côtés et je ne serais pas celui que je suis aujourd'hui sans cela. Maintenant nous avançons en parallèle mais vous êtes toujours à mes côtés et je vous en remercie de tout mon cœur. Merci aussi à Marta et toi mon frère qui m'avez offert la chance de devenir tonton durant cette thèse. Pour le bonheur que m'apporte Hugo, je ne peux que vous remercier. A toi ma sœur et à Paul, merci pour toutes ses escapades lyonnaises qui m'ont aéré la tête.

Je tiens également à remercier mes amis qui m'ont accompagné durant ces dernières années. Jeanne, après le lycée où nous faisions les 400 coups entre deux barbecues, nous nous sommes retrouvés en doctorat. Merci de me faire toujours autant rire et merci de ton amitié. Merci aussi à Marine pour ton amitié. Il faudra qu'on fasse les puces ensemble la prochaine fois ! Merci à vous deux pour m'avoir fait connaître Doct'Auvergne. En plus de l'enrichissement personnel et scientifique, cette association m'a permis de rencontrer Ludivine. Depuis, que de rires et de bons moments passés ensemble. Tant d'aventures faites et à faire avec toi ! Merci à Christelle, Angélique, Olivier, Sylvain et Jeff pour cette amitié qui dure depuis des années et qui a commencé si simplement autour d'une table de billard. Merci à Thomas et Cédric pour leur amitié et pour tous ces bons moments passés ensemble. Toutes ces soirées « jeux de société », ces feux d'artifices, les sorties de ski et bien d'autres. Je tiens à remercier tous ceux dont l'amitié m'a permis d'être qui je suis aujourd'hui : Thomas,

Florian, La Blonde, Agathe, Bidouille, Alice, Thomas, Louis, Elisa, Julien, Cassandra, etc. A tous ceux que je ne cite pas, je ne vous oublie pas mais la liste est déjà longue et les lignes me manquent. A vous tous, merci.

Pour finir, je souhaite de tout mon cœur te remercier Delphine. Tu as su être là pour moi, m'emmener voyager aux quatre coins du monde pour me changer les idées et accomplir certains de mes rêves. Tu m'as soutenu et cru en moi tout ce temps, tout en me poussant à prendre du temps pour moi et ne pas me faire engloutir par la thèse. En plus de ton soutien, tu as réussi à me supporter dans les moments difficiles. Pour tous ces merveilleux moments qui n'auraient pas été pareils sans toi, pour ta présence à mes côtés, pour ton amour : merci.

Résumé

Les maladies cardiovasculaires constituent la première cause de mortalité dans le monde. De nombreuses situations conduisent à une insuffisance cardiaque généralement associée à une altération mitochondriale. Le stress oxydant est un acteur majeur favorisant ces dysfonctionnements. Les acides gras polyinsaturés de la famille $\omega 3$ et, en particulier l'EPA, ont été souvent associés à des effets cardio-protecteurs. Cependant, dans certains cas, l'impact engendré était délétère. L'hypothèse qui a porté cette thèse soutient que l'EPA devient nocif dans les situations où le stress oxydant est trop intense : l'association avec un agent antioxydant adapté permettrait de maintenir les propriétés cardioprotectrices. Divers modèles de situations pathologiques, d'un stress oxydant faible vers une situation où il est sévère et chronique, ont été étudiés. L'EPA a montré des effets bénéfiques pour le cœur en modulant le collagène, la réactivité coronaire, la fonction mitochondriale, le statut oxydant, l'inflammation, le métabolisme énergétique, l'homéostasie calcique et le profil lipidique. Cependant, dans le cas d'un stress oxydant intense et chronique modélisé par un diabète sucré associé à un régime obésogène, l'EPA a entraîné un accroissement radical de la mortalité. Cet effet a été contrecarré par un enrichissement en extrait de thé vert grâce aux propriétés anti-oxydantes et hypolipémiantes de ce dernier. L'association de l'EPA à un agent antioxydant adapté à la situation et administré à doses adéquates est indispensable dans les situations où le stress oxydant est suffisamment sévère pour induire une peroxydation lipidique. L'impact bénéfique de l'EPA est lié à des acteurs mitochondriaux tels que la SOD2, l'UCP3 et la Sirt3. Les observations récoltées au cours de ces travaux nous incitent à étudier la fonction mitochondriale chez l'Homme afin de déterminer si l'effet cardioprotecteur de l'EPA combiné à un antioxydant est maintenu. Cette thèse décrit également une méthode fiable pour extraire des mitochondries cardiaques humaines à partir de rejections atriales obtenues lors de circulations extracorporelles. Des analyses omiques sur le plasma permettraient également de découvrir des biomarqueurs du fonctionnement mitochondrial permettant la mise en lumière d'altérations éventuelles survenant en amont du développement de l'insuffisance cardiaque et l'adaptation précoce d'un traitement adéquat.

Mots clefs : Cœur, Stress oxydant, Mitochondries, EPA, Antioxydant

Abstract

Cardiovascular disease is the leading cause of death in the world. Many situations trigger heart failure which is usually associated with mitochondrial dysfunction. Oxidative stress is a major contributor to these dysfunctions. Polyunsaturated fatty acids of the ω 3 family, in particular EPA, have often been associated with cardioprotective effects, but in some cases their impact is deleterious. The hypothesis behind this thesis is that EPA becomes harmful in situations in which the oxidative stress is too high: an appropriate combination with an antioxidant would maintain the cardio-protective properties. Several models of pathological situations characterized by a low or severe and chronic oxidative stress were studied. EPA displays beneficial effects on the heart by modulating collagen, coronary reactivity, mitochondrial function, oxidative status, inflammation, energy metabolism, calcium homeostasis and lipid profile. However, in case of a high and chronic oxidative stress triggered by diabetes mellitus and an obesogenic diet, EPA results in a dramatic increase in animal mortality. This effect is countered by enriching the diet with green tea extract thanks to the antioxidant and lipid-lowering properties of this last. The combination of EPA with an antioxidant adapted to the situation and administered in adequate doses is essential when the oxidative stress is severe enough to induce lipid peroxidation. The beneficial impact of EPA is related to mitochondrial actors such as SOD2, UCP3 and Sirt3. The findings obtained in these animal studies need to be verified in humans to determine whether the cardioprotective effect of EPA combined with an antioxidant is maintained. This thesis also describes a reliable method allowing the extraction of human cardiac mitochondria from atrial rejection obtained during extracorporeal circulation. Omic studies on the plasma would also allow the discovery of new biomarkers of mitochondrial function permitting clinicians to highlight possible dysfunctions prior to onset of the heart failure and to adapt a precocious treatment to the particular patient situation.

Keywords: *Heart, Oxidative stress, Mitochondria, EPA, Antioxidant*

Sommaire

Abréviations	1
Liste des publications, communications et techniques acquises	7
Liste des publications :	7
Liste des communications :	8
Liste des figures	9
Liste des tableaux	11
Liste des annexes.....	12
Avant-propos.....	13
Chapitre 1 : Etat de l'art	15
Partie 1.....	15
Le système cardiovasculaire	15
1.1 Généralités sur le cœur	15
1.2 Structure du cœur et des vaisseaux sanguins	17
1.3 Système électrique cardiaque et contraction musculaire.....	20
Partie 2.....	25
Les mitochondries	25
2.1 Brève histoire sur les mitochondries	25
2.2 Caractéristiques principales des mitochondries	26
2.3 L'oxydation phosphorylante : principale fonction des mitochondries.....	29
2.3.1 Les complexes de la chaîne respiratoire.....	32
2.3.2 Les principaux substrats de l'oxydation phosphorylante	37
Partie 3.....	43
Maladies cardiovasculaires et stress oxydant	43
3.1 Le stress oxydant.....	43
3.1.1 Notions sur le stress oxydant.....	43
3.1.2 Les facteurs du stress oxydant	44
3.1.2.1 Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)	45
3.1.2.2 Les espèces réactives de l'azote (RNS).....	48
3.1.3 Les systèmes antioxydants endogènes	50
3.2 Maladies cardiovasculaires et relations avec le stress oxydant.....	55
3.2.1 L'implication de l'obésité et du diabète dans les maladies cardiovasculaires	58
3.2.1.1 L'obésité, sa transition vers un diabète de type 2 et la santé cardiovasculaire.....	60

3.2.1.2 L'hypoxie dans l'obésité	62
3.2.1.3 Le diabète sucré, le stress oxydant et le système cardiovasculaire	63
3.2.1.4 L'impact du diabète sur les mitochondries cardiaques	65
3.2.2 Pathologies infectieuses et cardiopathies : cas du sepsis	66
3.2.2.1 Altérations cardiaques en cas de sepsis	67
3.2.2.2 Acteurs de l'atteinte cardiaque dans le sepsis	68
Partie 4.....	75
Nutriments et maladies cardiovasculaires	75
4.1 Les acides gras polyinsaturés n-3 (AGPI n-3 ou oméga 3 ou ω3)	75
4.1.1 Rappels sur les oméga 3	75
4.1.2 Métabolites issus des AGPI.....	79
4.1.3 Oméga 3, maladies cardiovasculaires et stress oxydant.....	82
4.1.3.1 Posologie des oméga 3	82
4.1.3.2 Oméga 3 et cœur	84
4.1.3.3 Oméga 3 et maladies métaboliques	86
4.1.3.4 Oméga 3 et sepsis	87
4.1.3.5 Controverse sur les oméga 3	88
4.2 Nutrition et antioxydants	93
4.2.1 Exemples d'antioxydants alimentaires	94
4.2.2 Effets antioxydants du thé vert.....	95
4.2.3 Autres actions du thé vert sur la santé cardiovasculaire.....	96
4.2.4 Effets spécifiques de certains composés du thé vert	97
Chapitre 2 : Objectifs & Stratégies	99
Chapitre 3 : Principales méthodes d'étude employées	102
3.1 Cœur isolé perfusé selon la méthode de Langendorff.....	102
3.2 Réactivité coronaire.....	103
3.3 Imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM)	105
3.4 Ligature et perforation cœcale pour déclencher un sepsis précoce	107
3.5 Extraction de mitochondries cardiaques	107
3.6 Oxygraphie et étude de la respiration mitochondriale	108
3.7 Fluorimétrie et mesure de la libération des ROS	110
3.8 Evaluation de la production d'ATP par bioluminescence.....	110
Chapitre 4 : Résultats	112
Publication n°1	112
Dietary canolol protects the heart against the deleterious effects induced by the association of rapeseed oil, vitamin E and coenzyme Q10 in the context of a high-fat diet	112

Publication n°2	128
Dietary EPA increases rat mortality in diabetes mellitus, a phenomenon which is compensated by green tea extract.....	
Publication n°3	155
Early sepsis does not stimulate reactive oxygen species production and does not reduce cardiac function despite an increased inflammation status.	
Publication n°4	169
Antioxidant and Cardioprotective Effects of EPA on Early Low-Severity Sepsis through UCP3 and SIRT3 Upholding of the Mitochondrial Redox Potential.....	
Publication n°5	192
A procedure to extract functional isolated mitochondria from small-sized human atrial samples. Applications to the influence of obesity.....	
Chapitre 5 : Discussion générale	217
5.1 Effets du niveau de stress oxydant associés aux maladies métaboliques sur la fonction cardiovasculaire	218
5.1.1 Relations entre l'obésité, le stress oxydant et la santé cardiovasculaire	218
5.1.2 Modifications induites par les composés antioxydants de l'huile de colza sur la santé cardiovasculaire dans l'obésité	219
5.1.3 Impact de l'huile de colza et de ses composés antioxydants sur le statut oxydant dans l'obésité.....	220
5.2 Modulation de l'impact cardiaque de l'EPA par un extrait de thé vert dans un modèle de stress oxydant chronique sévère : le diabète sucré	221
5.2.1 Choix des enrichissements pour l'étude des conséquences du stress oxydant dans le diabète sucré.....	221
5.2.2 Effets de l'EPA et du thé vert sur le stress oxydant du diabète sucré.	222
5.2.3 Modifications du métabolisme intermédiaire.....	224
5.2.4 Réflexion sur la survie des animaux	224
5.3 Implication du statut oxydant et de l'EPA sur la santé cardiaque en situation infectieuse	226
5.3.1 Effets d'un régime carencé en $\omega 3$ dans le cas du sepsis précoce associé à un faible stress oxydant	226
5.3.2 Impact de l'EPA par rapport au régime de type occidental carencé en $\omega 3$	228
Chapitre 6 : Conclusion & Perspectives	230
Références bibliographiques	233
Annexes	271
Annexe 1: Demaison L, Leger T, Vergely C, Rochette L, Azarnoush K. About the controversies of the cardioprotective effect of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) between animal studies and clinical meta-analyses: a review with several strategies to enhance the beneficial effects of n-3 PUFAs. J Physiol Biochem. 2019 Mar 1. Review. doi: 10.1007/s13105-019-00670-y.	
Annexe 2 : Liste des techniques acquises au cours de la thèse	283

Abréviations

4-HNE : 4-hydroxy-2-nonénal

Acétyl-CoA : acétyl-coenzyme A

Ach : acétylcholine

Acyl-CoA : acyl-coenzyme A

ADN : acide désoxyribonucléique

ADP : adénosine diphosphate

Ag2R-1b : récepteur 1b à l'angiotensine 2

AGMI : acide gras monoinsaturé

AGNE : acide gras non estérifié

AGPI : acide gras polyinsaturé

AGPI ω3 : acide gras polyinsaturé n-3 ou oméga 3

AGPI ω6 : acide gras polyinsaturé n-6 ou oméga 6

AGS : acide gras saturé

ALA : acide α-linolénique

AMPK : protéine kinase activée par l'AMP

ANT : translocase des nucléotides adényliques

ARA ou C20 : 4 ω6 : acide arachidonique

ARE : élément de réponse antioxydante

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ARNr : ARN ribosomique

ARNt : ARN de transfert

ATP : adénosine triphosphate

AVCE : activité vasodilatatrice des cellules endothéliales

Ca²⁺ : ion calcium

CoQ ou CoQ10 : coenzyme Q, coenzyme Q10 ou ubiquinone

COX : cyclooxygénase

CPT1 : carnitine palmitoyltransférase 1

CPT2 : carnitine palmitoyltransférase 2

Cu⁺ : ion cuivre

Cyt b : cytochrome b

CYP450 : cytochrome P450

DAG : diacylglycérol

DART : Diet and Reinfarction Trial

DART-2 : Diet and Angina Randomized Trial

DHA ou C22 : 6 ω3 : acide docosahexaénoïque

DPA ou C22 : 5 ω3 : acide docosapentaénoïque

dSirt2 : sirtuine 2 de la drosophile, équivalente de la sirtuine 3 des mammifères

e⁻ : électron

ECG : électrocardiogramme

EGCG : gallate d'épigallocatechine

eNOS : synthase à monoxyde d'azote endothéliale

EPA ou C20 : 5 ω3 : acide éicosapentaénoïque

FAD : flavine adénine dinucléotide oxydée

FADH₂ : flavine adénine dinucléotide réduite

Fe-S : centre Fer-Soufre

FID : Fédération Internationale du Diabète

FMN : flavine mononucléotide

FMNH₂ : flavine mononucléotide réduite

FRAP : capacité de réduction des ions ferriques en ions ferreux

G6PD : glucose-6-phosphate déshydrogénase

GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GISSI : Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico

GPR : récepteur couplé à une protéine G

GPx ou GPX : peroxydase à glutathion

GPx1 ou GPX1 : peroxydase à glutathion classique

GPx2 ou GPX2 : peroxydase à glutathion gastro-intestinal

GPx3 ou GPX3 : peroxydase à glutathion plasmatique

GPx4 ou GPX4 ou PHGPx4 : peroxydase à glutathion des phospholipides hydroperoxydés

GSH : glutathion réduit ou γ-L-Glutamyl-L-cystéinyglycine

GSSG : glutathion oxydé ou disulfure de glutathion

H⁺ : proton

H₂O : eau

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

HBA1c : hémoglobine glyquée

HDAC : histone déacétylase

HF : riche en graisses saturées (high-fat)

HIF-1 : facteur induit par l'hypoxie

HIF-1 α : sous-unité alpha du facteur induit par l'hypoxie

HIF-1 β : sous-unité bêta du facteur induit par l'hypoxie

HK : hexokinase

HO \cdot : radical hydroxyl

HO₂ \cdot : hydroxyperoxyde

HOCl : acide hypochloreux

HOMA-IR : indice d'insulino-résistance (HOMEostatic Assessment of Insulin Resistance)

HSF : facteur de transcription des protéines du stress

Hsp : protéines du stress

ICR : indice de contrôle respiratoire

IL-1 : interleukine-1

IL-1 β : interleukine 1 β

IL-6 : interleukine 6

IMAC : canal anionique de la membrane interne mitochondriale

IMC : indice de masse corporel

iNOS : synthase à monoxyde d'azote inductible

IP3 : inositol 1,4,5-trisphosphate

IRM : imagerie par résonance magnétique nucléaire

JELIS : Japan EPA Lipid Intervention Study

K⁺ : ion potassium

LA : acide linoléique

LDH : lactate déshydrogénase

LOX : lipooxygénase

LPS : lipopolysaccharides bactériens

MAM : points de contact (Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes)

MAPK : MAP kinases

mCAT : catalase mitochondriale

MCP-1 : protéine chimio-attractante 1 du monocyte

MDA : malondialdéhyde

MNF2 : mitofusine-2

mV : millivolts

Na⁺ : ion sodium

NAD⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide oxydée

NADH ou NADH+H⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide réduite

nCAT : catalase nucléaire

NCX1 : échangeur Na⁺/Ca²⁺

NF-κB : facteur nucléaire kappa B

NHE1 : échangeur Na⁺/H⁺

nNOS : synthase à monoxyde d'azote neuronale

NO ou ·NO : monoxyde d'azote ou radical monoxyde d'azote

NOS : synthase à monoxyde d'azote

O₂ : dioxygène

O₂⁻ : anion superoxyde

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ONOO⁻ : peroxydinitrite

ONOOH : acide peroxydinitrique

OXPHOS : oxydation phosphorylante

P : onde P relative à la contraction des oreillettes

pCAT : catalase des peroxysomes

PDH : pyruvate déshydrogénase

PDK : pyruvate déshydrogénase kinase

PDK4 : pyruvate déshydrogénase kinase 4

PGAM2 : phosphoglycérate mutase

PGC-1α : coactivateur 1α du récepteur γ activé par le proliférateur du peroxisome (PPARγ)

Pi : phosphate inorganique

PPARγ : récepteur γ activé par le proliférateur du peroxisome

PRA : période réfractaire absolue

PRE : période réfractaire effective

PRR : période réfractaire relative

Prx : peroxyredoxines

PTPm : pore de transition de perméabilité mitochondrial

QH₂ : ubiquinol

QRS : complexe QRS relatif à la contraction des ventricules

RE : réticulum endoplasmique

RNS : espèces réactives de l'azote

ROO⁻ : radicaux peroxydes

ROS : espèces réactives de l'oxygène (reactive oxygen species)

RyR : récepteur à la ryanodine

Sirt : sirtuine

Sirt1 : sirtuine 1

Sirt2 : sirtuine 2

Sirt3 : sirtuine 3

Sirt4 : sirtuine 4

Sirt5 : sirtuine 5

Sirt6 : sirtuine 6

Sirt7 : sirtuine 7

SN : sodium nitroprusside

SOD : dismutase des superoxydes

SOD1 ou CuZn-SOD : dismutase des superoxydes cytosolique

SOD2 ou Mn-SOD : dismutase des superoxydes mitochondriale

SOD3 ou EC-SOD : dismutase des superoxydes extracellulaire

T : onde T relative à la repolarisation des ventricules

TBARS : substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique

TFAM : facteur de transcription mitochondrial A

TNF α : facteur de nécrose tumorale alpha

TRF2 : facteur 2 de liaison répétée au télomère

Trx : thiorédoxine

TrxR : thiorédoxine réductase

UCP : protéine découplante

UCP1 : protéine découplante 1

UCP2 : protéine découplante 2

UCP3 : protéine découplante 3

ω3-LC : oméga 3 à longue chaîne

ΔpH : gradient de protons, gradient de pH

ΔΨ : potentiel de membrane

Liste des publications, communications et techniques acquises

Liste des publications :

- Leger T, Demaison L, Jouve C, Bouvier D, Sapin V, Miguel B, Azarnoush K. **A procedure to extract functional isolated mitochondria from small-sized human atrial samples. Applications to the influence of obesity.** *En cours de soumission*
- Leger T, He B, Azarnoush K, Jouve C, Rigaudière JP, Joffre F, Bouvier D, Sapin V, Pereira B, Demaison L. **Dietary EPA increases rat mortality in diabetes mellitus, a phenomenon which is compensated by green tea extract.** *En cours de soumission*
- Leger T, Azarnoush K, Traoré A, Cassagnes L, Rigaudière JP, Jouve C, Pagès G, Bouvier D, Sapin V, Pereira B, Bonny JM, Demaison L. **Antioxydant and cardio-protective effects of EPA in early low-severity sepsis through UCP3- and Sirt3- upholding of the mitochondrial redox potential.** *Oxid Med Cell Longev.* 2019, Aug vol. 2019, Article ID 9710352. doi : 10.1155/2019/9710352.
- Demaison L, Leger T, Vergely C, Rochette L, Azarnoush K. **About the controversies of the cardioprotective effect of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) between animal studies and clinical meta-analyses: a review with several strategies to enhance the beneficial effects of n-3 PUFAs.** *J Physiol Biochem.* 2019 Mar 1. doi : 10.1007/s13105-019-00670-y.
- Leger T, Hininger-Favier I, Capel F, Geloën A, Rigaudière JP, Jouve C, Pitois E, Pineau G, Vaysse C, Chardigny JM, Michalski MC, Malpuech-Brugère C, Demaison L. **Dietary canolol protects the heart against the deleterious effects induced by the association of rapeseed oil, vitamin E and coenzyme Q10 in the context of a high-fat diet.** *Nutr Metab (Lond).* 2018 Feb 13;15:15. doi : 10.1186/s12986-018-0252-4.

- Léger T, Charrier A, Moreau C, Hininger-Favier I, Mourmoura E, Rigaudière JP, Pitois E, Bouvier D, Sapin V, Pereira B, Azarnoush K, Demaison L. **Early sepsis does not stimulate reactive oxygen species production and does not reduce cardiac function despite an increased inflammation status.** *Physiol Rep.* 2017 Jul;5(13). pii: e13231. doi : 10.14814/phy2.13231.

Liste des communications :

- CTPIOD (Toulouse) – 04.07.2018 - *Communication orale.* **Effects of eicosapentaenoic acid (EPA) and/or green tea extract (GTE) on the cardiac function during type 2 diabetes.** Léger T, He B, Rigaudière JP, Azarnoush K, Demaison L.
- 18ème journée de l'IMBL (Clermont-Ferrand) – 23.05.2018 - *Communication orale.* **Effets de l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et/ou d'un extrait de thé vert sur la fonction cardiaque dans un modèle murin de diabète de type 2.** Léger T, He B, Rigaudière JP, Azarnoush K, Demaison L.
- Printemps de la Cardiologie (Montpellier) – 05.04.2018 - *Poster commenté.* **Impact sur les fonctions mécanique et mitochondriale cardiaques de l'acide eicosapentaénoïque alimentaire en situation de sepsis précoce.** Léger T, Rigaudière JP, Azarnoush K, Demaison L.
- Journées Francophones de Nutrition (Nantes) – 13.12.2017 - *Poster + flash-poster.* **Impact sur les fonctions mécanique et mitochondriale cardiaques de l'acide eicosapentaénoïque alimentaire en situation de sepsis précoce.** Léger T, Rigaudière JP, Azarnoush K, Demaison L.
- Journée du CRNH (Clermont-Ferrand) – 23.11.2017 - *Communication orale.* **Impact sur les fonctions mécanique et mitochondriale cardiaques de l'acide eicosapentaénoïque (EPA) alimentaire en situation de sepsis précoce.** Léger T, Rigaudière JP, Azarnoush K, Demaison L.
- Assises Régionales de Nutrition (Saint-Galmier) – 22.11.2017 - *Communication orale.* **Impact sur les fonctions mécanique et mitochondriale cardiaques de l'acide eicosapentaénoïque (EPA) alimentaire en situation de sepsis précoce.** Léger T, Rigaudière JP, Azarnoush K, Demaison L.

Liste des figures

Figure 1 : Localisation du cœur dans le thorax.

Figure 2 : Cœur droit & cœur gauche.

Figure 3 : Structure du cœur.

Figure 4 : Vascularisation cardiaque.

Figure 5 : Structure du réseau vasculaire.

Figure 6 : Stimulation électrique cardiaque et représentation d'un électrocardiogramme.

Figure 7 : Phases du potentiel de membrane et parallèle avec un ECG.

Figure 8 : Mécanisme calcium-dépendant de la contraction musculaire.

Figure 9 : Origine des mitochondries.

Figure 10 : Structure de la mitochondrie.

Figure 11 : Génome mitochondrial.

Figure 12 : Principaux rôles des mitochondries.

Figure 13 : La chaîne respiratoire mitochondriale.

Figure 14 : Structure de la F₁F₀-ATP synthase mitochondriale.

Figure 15 : Synthèse de la créatine et son implication dans le système de la navette créatine phosphate.

Figure 16 : Le cycle de l'acide tricarboxylique ou cycle de l'acide citrique ou cycle de Krebs.

Figure 17 : Principales sources et voies de détoxification des ROS au niveau mitochondrial.

Figure 18 : Principales sources et destinées des RNS au niveau mitochondrial.

Figure 19 : Schéma simplifié non exhaustif des systèmes endogènes de lutte contre le stress oxydant.

Figure 20 : Schéma simplifié non exhaustif du système thiorédoxine et son implication dans la lutte contre le stress oxydant.

Figure 21 : Illustration de l'implication des sirtuines dans l'équilibre oxydatif de la cellule.

Figure 22 : Caractéristiques de 4 phénotypes de l'obésité chez la femme (A) et l'homme (B).

Figure 23 : Evolution du diabète.

Figure 24 : Les différentes causes possibles d'atteintes cardiaques en cas de sepsis.

Figure 25 : Effets de la voie de signalisation du NF-κB dans le sepsis.

Figure 26 : Relation entre la fonction mitochondriale et la concentration matricielle en calcium.

Figure 27 : Schéma décrivant l'implication des mitochondries dans les déficiences septiques.

Figure 28 : Synthèse et conversions des ω6 et des ω3.

Figure 29 : Vue d'ensemble des métabolites issus des acides gras polyinsaturés $\omega 6$ et $\omega 3$.

Figure 30 : Relation entre la consommation quotidienne de thé et la mortalité.

Figure 31 : Mécanismes impliqués dans l'effet cardioprotecteur des catéchines.

Figure 32 : Représentation du système de cœur isolé selon la méthode de Langendorff en débit imposé.

Figure 33 : Schéma théorique de la courbe de réactivité coronaire.

Figure 34 : Principe de l'imagerie par résonance magnétique nucléaire.

Figure 35 : Exemples d'acquisition par IRM cardiaque.

Figure 36 : Photographies de cæcums des rats en fonction de l'opération subie.

Figure 37 : Schématisation d'une courbe d'oxygraphie mitochondriale.

Figure 38 : Schéma récapitulatif de l'influence du niveau de stress oxydant et de l'EPA sur la santé cardiaque.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Relation entre la masse et la consommation d'oxygène des tissus.

Tableau 2 : Glossaire des acides gras.

Tableau 3 : Teneurs en EPA et DHA dans divers aliments.

Liste des annexes

- **Annexe 1**: Demaison L, Leger T, Vergely C, Rochette L, Azarnoush K. **About the controversies of the cardioprotective effect of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) between animal studies and clinical meta-analyses: a review with several strategies to enhance the beneficial effects of n-3 PUFAs.** J Physiol Biochem. 2019 Mar 1. Review. doi: 10.1007/s13105-019-00670-y.
- **Annexe 2**: Liste des techniques acquises au cours de la thèse.

Avant-propos

Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de décès dans le monde comme le souligne l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Cette dernière précise également que cette mortalité concernera plus de 23,6 millions de personnes sur le globe dans la prochaine décennie («OMS | À propos des maladies cardiovasculaires » s. d.). Les méthodes de préventions primaire, secondaire ou tertiaire afin de réduire une telle évolution sont variées. L'une d'entre elles fait intervenir la nutrition. L'impact des nutriments sur la santé n'est plus à démontrer. Les nombreuses études effectuées chez l'Homme, chez l'animal ou encore sur des modèles alternatifs comme les cultures cellulaires, ont permis de mettre en avant une modulation via les nutriments des acteurs physiopathologiques de l'organisme. L'une des causes principales d'apparition ou d'aggravation des maladies cardiovasculaires est le stress oxydant (Cervantes Gracia, Llanas-Cornejo, et Husi 2017). Un accroissement des facteurs oxydatifs tels que les espèces réactives de l'oxygène (ROS pour reactive oxygen species) ou les espèces réactives de l'azote (RNS pour reactive nitrogen species) entraîne des dommages importants au niveau de l'ADN, des cellules, des tissus et au final à l'organisme entier. Le stress oxydant est présent dans divers contextes pathologiques tels que l'obésité, le diabète ou encore des situations infectieuses comme l'endocardite aiguë ou le sepsis. Dans tous ces cas, cette perturbation du statut oxydant va mener vers une altération structurale et/ou fonctionnelle au niveau cardiaque. Cependant, le corps possède également des agents susceptibles de lutter contre le stress oxydant mais dont l'expression ou l'activité peuvent aussi être modulées par différentes situations physiopathologiques. Les plus importants acteurs du système de défense antioxydant sont la dismutase des superoxydes (SOD), la peroxydase à glutathion (GPx ou GPX) et la catalase. Les deux premiers sont d'ailleurs fortement retrouvés au niveau de la mitochondrie, élément cellulaire chargé de la production énergétique de l'organisme mais synthétisant de manière importante les ROS en cas de situation pathologique. Cet organite est extrêmement présent au niveau cardiaque, ce qui s'explique aisément par le besoin énergétique important de cet organe pour jouer son rôle vital lui permettant de répondre aux besoins de l'organisme. Une altération des mitochondries cardiaques conduit inévitablement à un déficit énergétique favorisant la survenue d'une insuffisance cardiaque, facteur de risque majeur de mortalité. Les impacts délétères sur le niveau de stress oxydant ou la viabilité des mitochondries peuvent être prévenus par différents nutriments. En effet, la nutrition joue un rôle quotidien sur la santé et adapter

les apports en nutriments bénéfiques en fonction de la situation de chacun constitue une stratégie des plus prometteuses en terme de résultats, de simplicité de mise en place et de coûts limités. Outre leur aspect préventif, certains nutriments prescrits en doses adéquates dans certaines situations pathologiques peuvent également favoriser la guérison et la récupération des patients. Parmi les nutriments présentant un intérêt pour la santé cardiovasculaire, les acides gras polyinsaturés de la famille des oméga 3 (ω 3) demandent une attention particulière, en particulier les ω 3 à longue chaîne (ω 3-LC) d'origine marine et notamment l'acide eicosapentaénoïque (EPA). Malgré les effets cardioprotecteurs majeurs de l'EPA, cette molécule présente une sensibilité importante au stress oxydant. En effet, ce dernier peut favoriser la peroxydation lipidique. Les ω 3 constituent une cible majeure pour ce phénomène et présentent alors des effets délétères surtout s'ils sont administrés à haute dose. Une méthode simple afin d'éviter l'altération de l'EPA dans l'organisme consiste à l'associer de façon préventive à un agent antioxydant. Le thé vert est connu pour ses capacités antioxydantes mais aussi pour ses propriétés cardio-protectrices permettant de réduire la mortalité des patients atteints de maladies cardiovasculaires (Zhang et al. 2015).

L'objectif principal de ma thèse a consisté à étudier les effets des acides gras ω 3 sur la fonction cardiaque dans divers contextes de stress oxydant. En premier lieu, j'ai souhaité vérifier si l'association de divers antioxydants avec l'huile de colza contenant l'acide α -linoléinique (ALA) précurseur des ω 3-LC offre un effet bénéfique au niveau cardiaque dans une situation d'obésité abdominale connue pour favoriser un stress oxydant modéré mais prolongé dans le cœur. Une seconde étape m'a permis d'évaluer les conséquences d'un apport en EPA, en thé vert ou de l'association des deux composés sur l'activité cardiaque dans un modèle de rat diabétique, présentant donc un stress oxydant chronique de forte intensité. Ensuite, une évaluation du niveau de stress oxydant a été effectuée dans un modèle de sepsis précoce de faible intensité chez le rat Wistar. Après avoir validé le modèle, les effets d'un enrichissement en EPA sur l'activité cardiaque et la fonction mitochondriale ont été déterminés ainsi que les mécanismes mis en jeu. Finalement, au vu des résultats bénéfiques constatés, une extrapolation à l'Homme a débuté en initiant une étude clinique afin d'étudier l'effet d'un enrichissement en EPA dans des situations d'obésité et d'endocardite aiguë. Afin de pouvoir étudier la fonction mitochondriale sur du tissu cardiaque humain fraîchement prélevé, nous avons adapté notre protocole animal afin qu'il soit optimal pour travailler chez l'Homme.

Chapitre 1 : Etat de l'art

Partie 1

Le système cardiovasculaire

1.1 Généralités sur le cœur

Le cœur est un des organes « nobles » du corps humain. Cette appellation caractérise les organes essentiels au fonctionnement autonome et à la survie de l'organisme. En plus du cœur, ils correspondent au cerveau, aux poumons, au foie, au pancréas et aux reins. Pour un homme de 70 kg, le cœur pèse 260-300 g ce qui représente environ 0,4% du poids corporel. Il est situé dans le thorax, entre les poumons, devant la trachée et l'œsophage, derrière le sternum et au-dessus du diaphragme (Figure 1). Sa forme est généralement associée à une pyramide à 3 faces. La base de cette « pyramide » concentre la jonction des vaisseaux et la pointe du cœur, appelée apex, s'accroche au poumon gauche. Sa morphologie et son orientation favorisent son développement plus important vers la gauche. En conséquence, le poumon gauche est partiellement comprimé et est anatomiquement divisé en deux lobes, au lieu des trois définis pour le poumon droit.

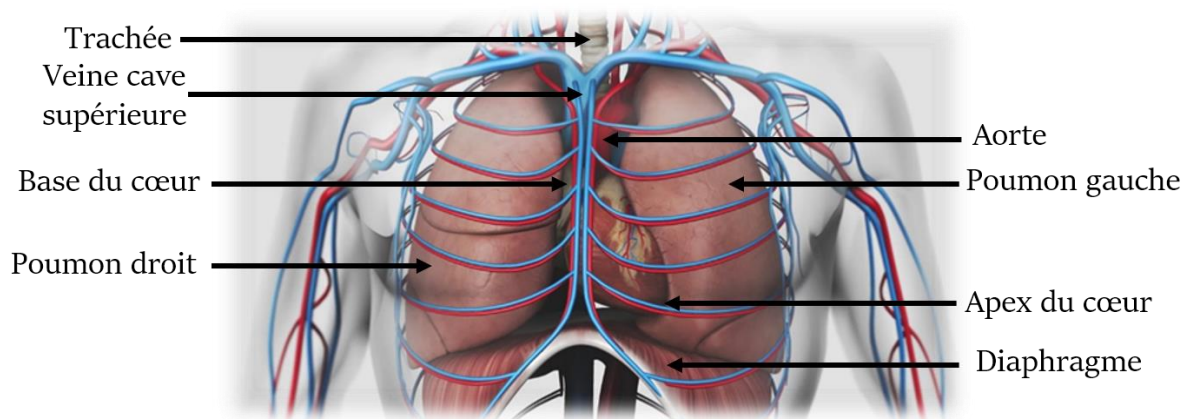


Figure 1 : Localisation du cœur dans le thorax. Placé entre les deux poumons, le cœur est orienté vers la gauche de sorte que l'apex s'appuie sur les lobes du poumon gauche. La base du cœur reçoit les différents vaisseaux des circulations systémiques et pulmonaires. Le sang riche en CO₂ et pauvre en O₂ (en bleu) revenant des organes, et plus directement du foie, arrive au cœur par les veines caves supérieure et inférieure. Le sang oxygéné (en rouge) est expulsé vers les organes par l'aorte. (Source : illustration adaptée d'une vidéo de l'INSERM, [youtube.com/watch?v=tYTbbPSGIHk](https://www.youtube.com/watch?v=tYTbbPSGIHk), consultée le 12 septembre 2018)

Le cœur est anatomiquement constitué de 4 cavités : 2 ventricules et 2 oreillettes/atria (Figure 2). L'oreillette et le ventricule droits constituent le cœur droit responsable de la circulation pulmonaire du sang riche en CO₂ et pauvre en O₂. L'oreillette et le ventricule gauches forment le cœur gauche gérant la circulation systémique du sang riche en O₂ et pauvre en CO₂ nécessaire au fonctionnement des organes. Ces deux parties sont séparées par une cloison musculaire nommée septum. Les veines caves supérieure et inférieure apportent le sang souillé au cœur droit d'où il est expulsé par l'artère pulmonaire. Le sang oxygéné parvient au cœur gauche par les veines pulmonaires puis est adressé aux organes par l'aorte. Les deux compartiments de chacune de ces parties sont séparés par des valves atrio-ventriculaires : la valve tricuspide pour le cœur droit et la valve mitrale pour le cœur gauche. Ces deux éléments sont chacun reliés à des muscles papillaires, appelés les piliers, par des cordages tendineux offrant à ces valves leur fonction anti-reflux au cours de la systole ventriculaire. La contraction ventriculaire permet l'expulsion du sang dans la circulation. Deux valves artérielles sont également présentes au niveau du cœur dont le rôle est d'empêcher le reflux sanguin dans le ventricule pendant la diastole ventriculaire, période suivant la systole ventriculaire et correspondant à la relaxation cardiaque.

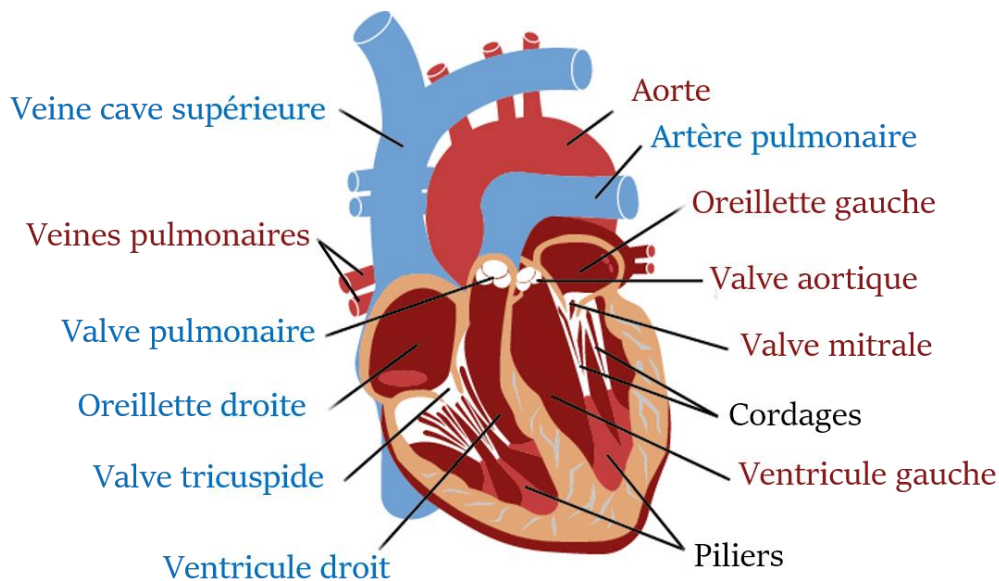


Figure 2 : Cœur droit & cœur gauche. Le sang provenant des organes arrive par les veines caves supérieure et inférieure pour pénétrer dans l'oreillette droite puis dans le ventricule droit en passant par la valve tricuspide avant d'être envoyé dans la circulation pulmonaire par l'artère pulmonaire. Le sang revenant des poumons est amené au cœur par les veines pulmonaires au niveau de l'oreillette gauche, puis passe dans le ventricule gauche via la valve mitrale avant d'être expulsé vers la circulation systémique par l'aorte. (Source : adapté d'une illustration du site internet de la Fédération Française de Cardiologie, fedecardio.org/Je-m-informe/Le-coeur/le-fonctionnement-du-coeur, consultée le 10 octobre 2018)

1.2 Structure du cœur et des vaisseaux sanguins

Les cavités cardiaques sont revêtues par l'endocarde, une couche d'endothélium similaire à celui trouvé dans les vaisseaux sanguins, qui constitue une membrane protectrice interne. L'endocarde est accolé au myocarde correspondant à la structure musculaire de la pompe cardiaque. Entre ces deux tissus se trouve le tissu nodal responsable de la contraction automatique du myocarde et les cellules cardionectrices du réseau de Purkinje (cf. paragraphe 1.3 « Système électrique cardiaque et contraction musculaire »). Le myocarde constitue le tissu musculaire du cœur. C'est grâce à lui que la fonction de pompe cardiaque est possible. Les cellules musculaires qui le composent sont appelées les cardiomyocytes. Ces derniers consomment à eux-seuls 10% de l'oxygène de l'organisme. La membrane protectrice externe du cœur s'appelle le péricarde. Il se compose de deux parties : le péricarde séreux et le péricarde fibreux. Le premier est constitué de différentes couches : au contact du myocarde, l'élément le plus interne est la lame viscérale aussi appelée épicarde. Il accueille la vascularisation cardiaque. L'épicarde est séparé du feuillet pariétal du péricarde séreux par une cavité virtuelle contenant le fluide péricardique qui favorise le glissement des feuillets lors des mouvements cardiaques. La couche la plus externe du tissu cardiaque se compose de tissu conjonctif et porte le nom de péricarde fibreux (Figure 3) (Anderson, Razavi, et Taylor 2004).

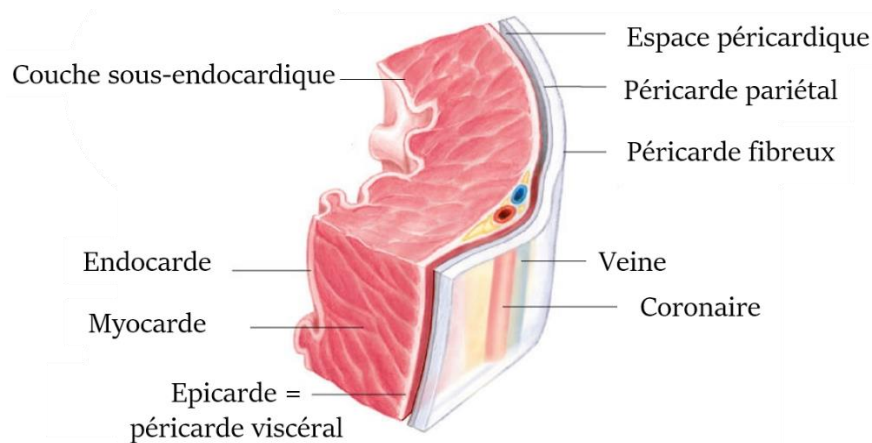


Figure 3 : Structure du cœur. L'endocarde constitue la couche interne du cœur, recouvrant les cavités cardiaques. Le myocarde correspond à la partie musculaire. Le péricarde est composé de l'épicarde, de l'espace péricardique, du péricarde pariétal et du péricarde fibreux. La couche sous-endocardique accueille le tissu nodal impliqué dans la contraction du myocarde. (Source : adapté de naturolistique.fr/le-tissu-du-myocarde/, consultée le 5 octobre 2018)

Au niveau de ce péricarde, plus particulièrement sur la face externe du péricarde viscéral et à l'extérieur du péricarde pariétal, se trouve le tissu adipeux péricardique. Ce dernier est impliqué dans les caractéristiques anatomiques et métaboliques du cœur comme l'augmentation du métabolisme des acides gras, la stimulation de l'inflammation et la modulation de la fonction endothéliale (Iacobellis 2015).

La vascularisation du cœur représente 5 à 10% du débit cardiaque. Elle survient grâce à un réseau très étendu de vaisseaux tout autour du tissu cardiaque appelés les artères coronaires. Elles sont toutes issues de deux coronaires principales qui se développent au niveau de l'aorte : l'artère coronaire droite et l'artère coronaire gauche. Chacune va permettre l'émergence d'un réseau complexe de vaisseaux partant de la base du cœur vers son apex. Le drainage est quant à lui effectué par des veines et des vaisseaux lymphatiques. Les vaisseaux du retour veineux sont satellites des artères coronaires. Toutes les veines se rejoignent dans le sinus coronaire situé dans le sillon atrio-ventriculaire à gauche de la veine cave. Ce sinus déverse ensuite le sang dans l'oreillette droite, au niveau de sa partie inférieure (Yamada et al. 2008). La circulation lymphatique rejoint quant à elle les nœuds trachéo-bronchiques (Figure 4).

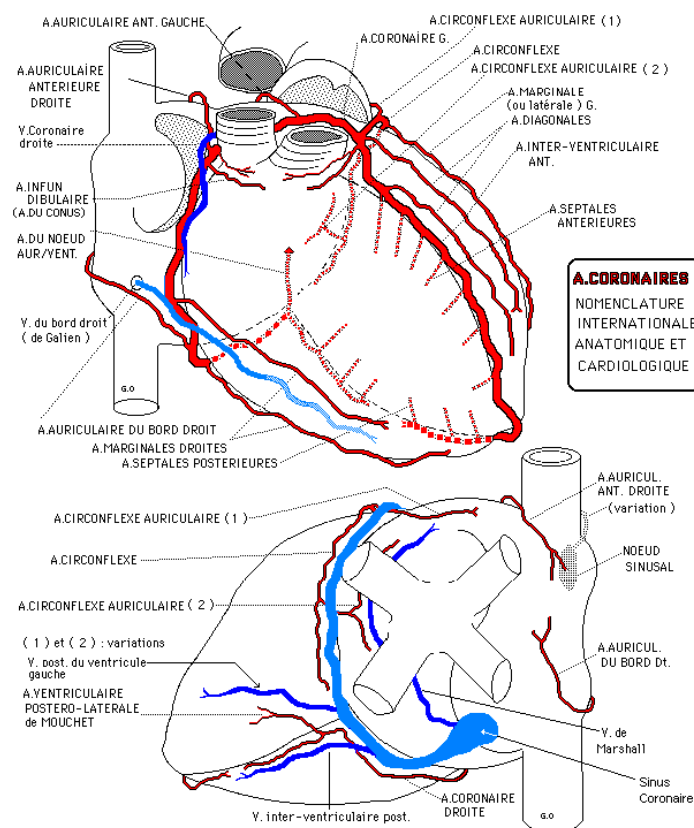


Figure 4 : Vascularisation cardiaque. Les coronaires transportent le sang oxygéné (rouge) et les veines le sang riche en CO₂ (bleu). (Source : anatomie-humaine.com/Vascularisation-du-coeur.html, consultée le 27 septembre 2018)

De manière générale, la vascularisation se compose de 3 grandes familles de vaisseaux : les artères, les veines et les capillaires (Figure 5). A l'exception des artères pulmonaires transportant le sang veineux aux poumons, les artères transportent le sang riche en O₂ du cœur vers les organes. Leur calibre évolue de celui de l'artère, 2,5 cm de diamètre, à celui des artérioles, environ 2 mm de diamètre. La structure de ces vaisseaux est constituée de trois couches différentes : l'intima, la média et l'adventice (Pugsley et Tabrizchi 2000). L'intima forme la couche interne. Elle comporte une membrane basale aussi appelée lamina, composée de collagène favorisant la rigidité tissulaire, et possède un revêtement antiadhésif appelé endothélium permettant au sang et à ses composés de circuler librement dans les vaisseaux. De plus, l'endothélium présente également une fonction sécrétoire. Il produit différents facteurs vasodilatateurs tels que le monoxyde d'azote (NO) ou la prostacycline, mais aussi des facteurs vasoconstricteurs comme l'endothéline-1, le thromboxane ou encore l'angiotensine II. Ces facteurs permettent aux artères de moduler leur diamètre en fonction du besoin en afflux sanguin. L'endothélium sécrète également des facteurs influençant la coagulation sanguine tels que la prostacycline et le plasminogène. La couche intermédiaire des artères se nomme la média. Elle est riche en cellules musculaires lisses et s'adapte à la pression sanguine. En effet, elle présente une capacité d'élasticité et de modification du diamètre en fonction des phénomènes de vasoconstriction et de vasodilatation. Le feuillet le plus externe des artères s'appelle l'adventice. Cette dernière favorise l'arrimage des artères sur les tissus qu'elles traversent.

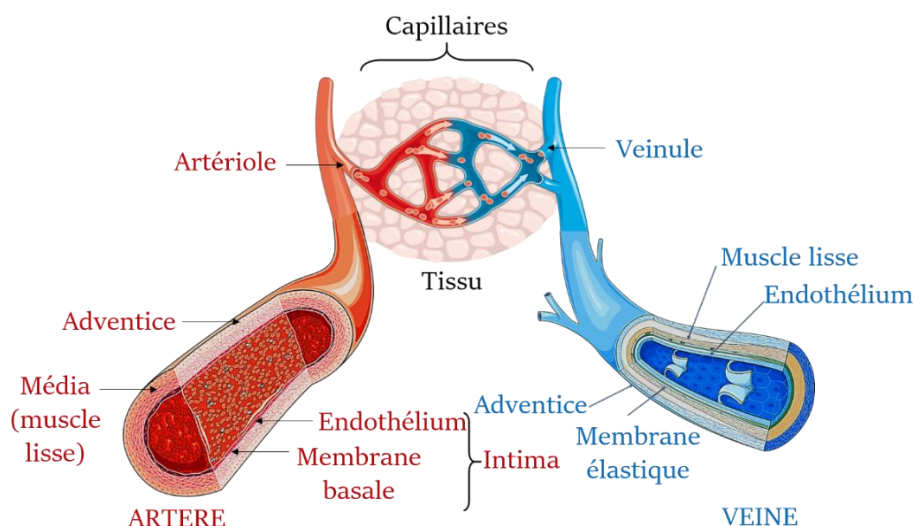


Figure 5 : Structure du réseau vasculaire. Les artères transportent le sang riche en O₂ (rouge) du cœur jusqu'aux organes où le réseau capillaire s'occupe des échanges gazeux. Les veines prennent en charge le sang riche en CO₂ pour sa circulation jusqu'au cœur. (Source : Thibault Leger. Remerciements à Servier Medical Art)

Les veines retournent au cœur le sang riche en CO₂ après les échanges gazeux avec les organes, à l'exception des veines pulmonaires ramenant le sang oxygéné au cœur. A l'image des artères et des artérioles, les veines distales sont appelées des veinules et présentent un diamètre inférieur. Les veines sont également composées d'une intima formée d'un endothélium et d'une mince membrane élastique la séparant d'une fine couche musculaire lisse n'offrant à ces vaisseaux qu'une faible capacité contractile mais un fort potentiel de dilatation. Le tout est gainé par l'adventice. Les grosses veines des membres inférieurs possèdent également des valvules empêchant au sang de refluer vers le bas.

Les capillaires portent leur nom par analogie aux cheveux même s'ils sont en réalité encore plus fins que des cheveux, respectivement de l'ordre de 8-10 µm de diamètre *versus* 40 à 100 µm. Leur rôle consiste à transporter le sang au sein des organes, en réalisant la jonction entre les artérioles et les veinules. Ils sont uniquement composés d'une fine membrane basale entourant l'endothélium, indispensable pour une bonne circulation sanguine.

1.3 Système électrique cardiaque et contraction musculaire

Le cœur est l'unique organe du corps humain à être autonome. En effet, contrairement aux muscles striés squelettiques ou aux cellules musculaires lisses caractérisés respectivement par une contraction volontaire ou involontaire, le muscle cardiaque possède une stimulation électrique indépendante ([Figure 6A](#)). Celle-ci naît au niveau du nœud sinusal, situé à la base de la veine cave supérieure (Csepe et al. 2016). L'onde électrique se disperse alors dans le tissu atrial engendrant la systole des oreillettes. Avec un léger retard, elle stimule également le nœud auriculo-ventriculaire localisé dans la jonction des septa inter-atrial et inter-ventriculaire. L'influx électrique est ensuite conduit le long du faisceau de His dans le septum inter-ventriculaire avant de rejoindre le réseau de Purkinje. Ce dernier initie le début de l'excitation au niveau de l'apex du cœur. Une fois la stimulation électrique étendue à tout le tissu ventriculaire à l'aide du réseau de Purkinje, la systole ventriculaire se déclenche. L'évolution de l'influx électrique peut-être mesurée par électrocardiographie, ce qui permet de repérer des situations pathologiques. L'électrocardiogramme (ECG) illustre les différentes étapes de la stimulation et de la contraction cardiaques ([Figure 6B](#)). L'onde P représente la dépolarisation des oreillettes et leur contraction. L'intervalle PQ correspond à la conduction de l'onde de dépolarisation dans le nœud auriculo-ventriculaire et dans le faisceau de His. La dépolarisation des ventricules jusqu'au début de leur contraction est visible grâce

au complexe QRS. Enfin, l'onde T représente la repolarisation ventriculaire traduisant la relaxation musculaire.

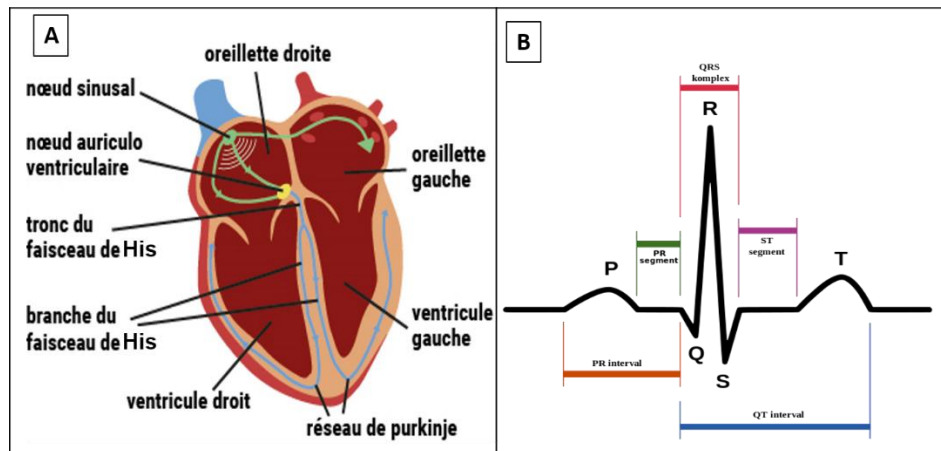


Figure 6 : Stimulation électrique cardiaque et représentation d'un électrocardiogramme. (A) L'influx électrique naît du nœud sinusal, rejoint le nœud auriculo-ventriculaire, suit le faisceau de His puis rejoint le réseau de Purkinje qui disperse la stimulation électrique au tissu ventriculaire. (B) Onde P : contraction des oreillettes ; complexe QRS : contraction des ventricules ; onde T : repolarisation des ventricules. (Sources : (A) d'après Fédération Française de Cardiologie, fedecardio.org/Je-m-informe/Le-coeur/lactivite-electrique-du-coeur, (B) Unisciel, ressources.unisciel.fr/physiologie/co/grain2d3.html, consultées le 10 octobre 2018)

La différence de potentiel électrique de part et d'autre de la membrane plasmique est appelé le potentiel de membrane. Les modifications de cette valeur suite à des échanges ioniques ou à une stimulation électrique déclenchent un potentiel d'action qui dirige les phénomènes de couplage excitation-contraction. Au niveau des cardiomyocytes, ce potentiel d'action est décomposé en 5 phases, de 0 à 4 (Figure 7). Il peut être mis en parallèle avec la courbe obtenue lors de l'ECG. La phase 0 correspond à la dépolarisation rapide qui commence dès que le potentiel de la membrane atteint un seuil d'environ -70 à -60 millivolts (mV), au lieu des -90 mV pour la polarisation basale. Une activation des canaux sodiques provoque un afflux immédiat de sodium (Na^+) dans le cardiomyocyte qui se traduit par une augmentation rapide du potentiel d'action. Suite à la dépolarisation rapide, plusieurs modifications ioniques conduisent à une repolarisation rapide précoce correspondant à la phase 1 : une inactivation du canal Na^+ , une activation subséquente du canal potassique (K^+) et la stimulation de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, qui permute 3 Na^+ contre 1 Ca^{2+} .

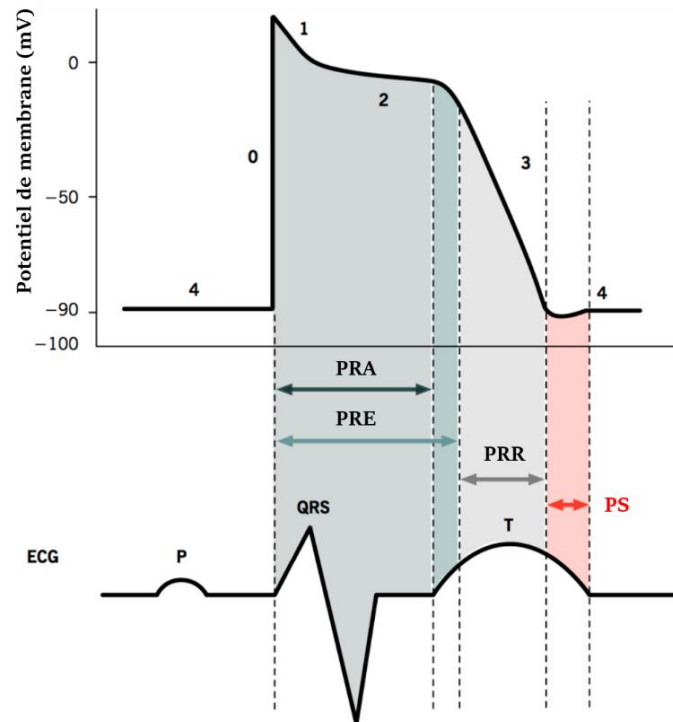


Figure 7 : Phases du potentiel de membrane et parallèle avec un ECG. 0 : dépolarisation ; 1 : repolarisation rapide précoce ; 2 : plateau ; 3 : repolarisation ; 4 : phase de repos ; PRA : période réfractaire absolue ; PRE : période réfractaire effective ; PRR : période réfractaire relative ; PS : période supranormale ; P : contraction des oreillettes ; QRS : contraction des ventricules ; T : repolarisation des ventricules. (Source : adapté de Ikonnikov G. et Wong E., <http://www.pathophys.org/physiology-of-cardiac-conduction-and-contractility>, consulté le 12 septembre 2019)

L'étape 2 est caractérisée par un plateau défini par un potentiel d'action stable suite à un équilibre entre les circulations d'ions à travers la membrane plasmique. Le flux d'ions est le résultat du courant sortant du K^+ . *A contrario*, un mouvement constant de Ca^{2+} dans la cellule à travers les canaux calciques de type L encore ouverts, l'afflux de Na^+ par le canal voltage-dépendant et l'échange de Na^+ contre du Ca^{2+} interne par l'échangeur Na^+/Ca^{2+} sont responsables de l'afflux d'ions (Dedkova et Blatter 2008). La phase 2 est associée à une modification de la conductance du calcium qui est responsable du processus de couplage excitation-contraction. L'entrée de Ca^{2+} dans la cellule entraîne l'activation des récepteurs à la ryanodine (RyR) au niveau du réticulum sarcoplasmique et la libération du Ca^{2+} de cette zone de stockage intracellulaire vers le cytosol. Suite à la hausse de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} , ce dernier se fixe alors au niveau du sarcomère favorisant alors le glissement des filaments de myosine et d'actine, ce qui conduit au phénomène ATP-dépendant de la contraction musculaire (Mladěnka et al. 2018) (Figure 8).

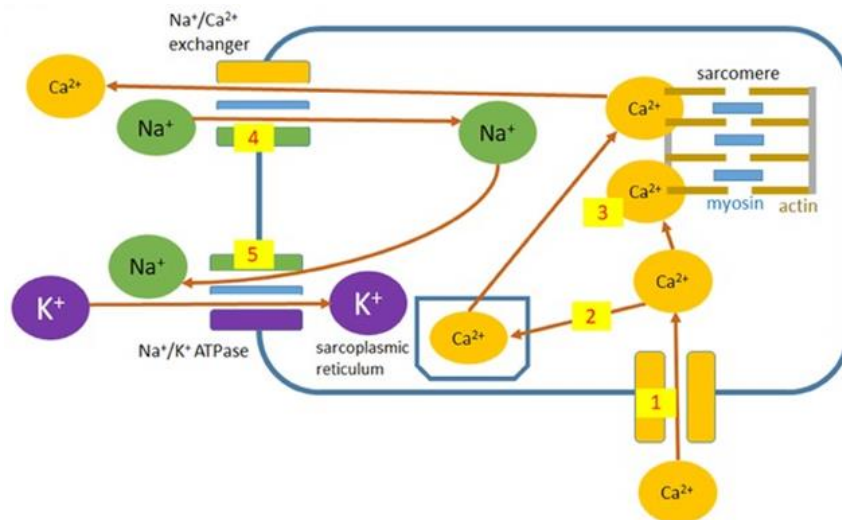


Figure 8 : Mécanisme calcium-dépendant de la contraction musculaire. Le calcium est transporté dans la cellule par des canaux Ca²⁺ (1). Une augmentation des taux intracellulaires de Ca²⁺ déclenche la libération de Ca²⁺ par le réticulum sarcoplasmique (2). Le Ca²⁺ entraîne une contraction musculaire par l'interaction avec l'actine-myosine (3). Il est ensuite re-capté par le réticulum sarcoplasmique par une Ca²⁺ ATPase (non représenté) et renvoyé dans l'espace extracellulaire par l'échangeur Na⁺/ Ca²⁺ (4) et la Ca²⁺ ATPase de la membrane plasmique (non représentée). Par ce transporteur, le Na⁺ est transporté à l'intérieur des cellules et son gradient de part et d'autre du sarcolemme est rétabli grâce à l'activité de l'adénosine-triphosphatase sodium-potassium (Na⁺/K⁺-ATPase, 5). (Source : d'après Mladěnka P. et al., Med Res Rev., 2018)

Ensuite, la phase de repolarisation (phase 3) s'installe. Elle s'accompagne de l'inactivation des canaux Ca²⁺ permettant le retour à un potentiel de repos de -90 mV grâce au débit sortant de K⁺ qui est maintenu. Ceci prépare la cellule à un nouveau cycle de dépolarisation. Des cycles de contraction-relaxation se produisent alors de manière cyclique jusqu'à une repolarisation suffisante de la cellule. Les gradients de concentrations ioniques transmembranaires de repos sont restaurés en renvoyant les ions Na⁺ et Ca²⁺ dans l'environnement extracellulaire et les ions K⁺ à l'intérieur de la cellule. Les pompes concernées comprennent l'échangeur sarcolemmal Na⁺-Ca²⁺, la Ca²⁺-ATPase et la Na⁺-K⁺-ATPase. Une fois le potentiel de -90 mV restauré, le cardiomyocyte se situe en phase 4, correspondant à la phase de repos (Nerbonne et Kass 2005). Le moment entre la phase 0 et la prochaine dépolarisation possible d'un cardiomyocyte est nommée période réfractaire. Elle est décrite par 3 phases en fonction de la possible réaction du cardiomyocyte : les périodes réfractaires absolue (PRA), effective (PRE) et relative (PRR). Pendant la PRA, la cellule est complètement insensible à un nouveau stimulus. La PRE comprend la PRA et un court segment de la phase 3 au cours duquel un stimulus peut entraîner une dépolarisation minimale de la cellule mais n'engendrera aucune propagation du

potentiel d'action et donc une absence de dépolarisation des cellules voisines. La PRR correspond à la phase où un stimulus supérieur à la normale dépolarise la cellule et provoque un potentiel d'action. A la suite de la période réfractaire, la période supranormale (PS) est également observée. Elle correspond à une situation d'hyperexcitabilité de la part de la cellule pendant laquelle un stimulus plus faible que la normale dépolarise les cellules et provoque un potentiel d'action. Les cellules dans cette phase sont particulièrement sensibles aux arythmies lorsqu'elles sont exposées à un stimulus mal synchronisé (Stockbridge 1988).

Avec un rythme de 70 battements par minute, le cœur se contracte environ 100 000 fois par jour ce qui représente 7000 litres de sang pompés quotidiennement (Berne 1981). Cet organe possède un métabolisme dit oxydatif : il consomme de l'oxygène pour produire l'énergie nécessaire à la contraction et à la relaxation. L'adénosine triphosphate (ATP) constitue cette source énergétique. Cette molécule est produite en grande partie par les mitochondries (« The Discovery of Adenosine Triphosphate and the Establishment of Its Structure » 1991).

Partie 2

Les mitochondries

2.1 Brève histoire sur les mitochondries

Les cellules procaryotes et les bactéries ont fonctionné de manière anaérobie et/ou grâce à la photosynthèse depuis leur émergence il y a environ 2,5 milliards d'années jusqu'à l'apparition des cellules eucaryotes environ 1 milliard d'années plus tard (Sagan 1967). La transition procaryotes-eucaryotes aurait été permise grâce à l'apparition de nombreux éléments cytosoliques comme le noyau, le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, le cytosquelette ou encore plus spécialement les mitochondries. Lynn Sagan met en avant son hypothèse selon laquelle la naissance des cellules eucaryotes à partir des cellules procaryotes et des bactéries anaérobies aurait transité par l'apparition de bactéries aérobies dont les protomitochondries auraient découlé.

Bien que controversée pendant les décennies suivantes, cette idée a été appuyée par d'autres scientifiques comme John Archibald dans son livre *One Plus One Equals One: Symbiosis and the Evolution of Complex Life* paru en 2014 (Archibald 2014). En effet, en se basant sur les études obtenues à l'aide des progrès scientifiques et techniques, l'auteur confirme la théorie développée en 1967 en précisant l'existence d'une bactérie endosymbiotique ayant servi de prémices aux mitochondries, désormais indispensables à la vie des mammifères et d'autres espèces cellulaires. Bien que datant de plusieurs milliards d'années, le début exact de cette symbiose ayant mené aux cellules eucaryotes que nous connaissons actuellement reste encore flou. Cependant, les origines et les mécanismes ayant conduit aux mitochondries ont été éclaircis au cours de ces dernières années. En 2017, Roger et coll. (Roger, Muñoz-Gómez, et Kamikawa 2017) publient une revue présentant l'ancêtre des mitochondries : l'alpha-protéobactérie pré-mitochondriale (Figure 9). Les protomitochondries auraient évolué à partir de ce premier endosymbiote. Au jour d'aujourd'hui, et depuis de nombreuses années, les mitochondries sont donc devenues des organites indispensables au fonctionnement et à la survie de l'organisme, à la suite de l'installation d'une symbiose entre deux organismes vivants.

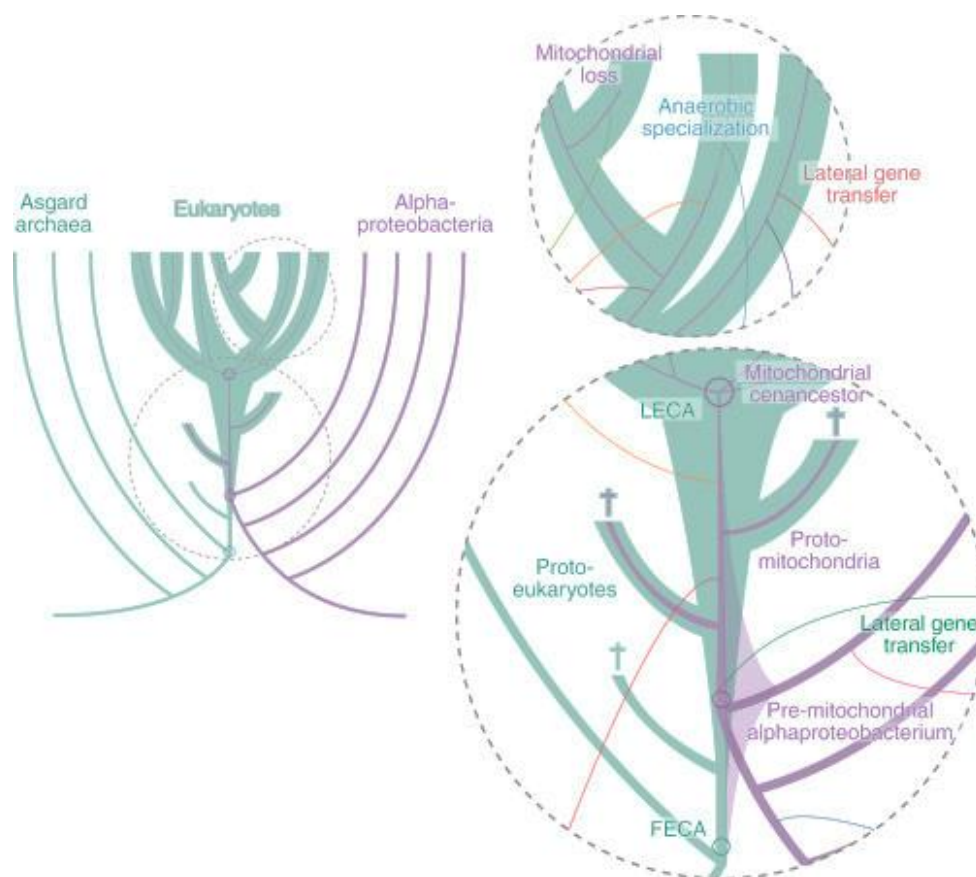


Figure 9 : Origine des mitochondries. Les mitochondries ont évolué à partir d'une alphaprotéobactérie endosymbiotique (violette) au sein d'une cellule hôte d'origine archéale qui était le plus étroitement apparentée à Asgard archaea (verte). L'ancêtre le plus ancien des mitochondries est l'alphaprotéobactérie pré-mitochondriale. FECA : premier ancêtre commun eucaryote (first eukaryote common ancestor) ; LECA : dernier ancêtre commun eucaryote (last eukaryotic common ancestor). (Source : Roger AJ., Curr Biol., 2017)

2.2 Caractéristiques principales des mitochondries

Les mitochondries présentent une forme globalement oblongue et mesurent 1 à 2 μm de long sur 0,5 à 1 μm de large (Figure 10). Ces dimensions sont d'ailleurs assez proches de celles de la bactérie *Escherichia coli*. Une de leurs caractéristiques morphologiques majeures est la présence d'une double membrane lipidique séparant la matrice mitochondriale du cytosol de la cellule. La membrane externe est convexe sur toute la surface de la mitochondrie et présente par endroit des jonctions avec le réticulum endoplasmique (RE) appelées communément des points de contact (MAM pour Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes) qui maintiennent une distance entre la mitochondrie et le RE de 10 à 50 nm (Giacomello et Pellegrini 2016). Ces MAMs sont connues pour favoriser les échanges entre les mitochondries et le réticulum endoplasmique et participent principalement à la

signalisation calcique impliquée dans l'homéostasie mitochondriale (Theurey et al. 2016). Ces MAMs jouent également un rôle dans la synthèse et le transfert des phospholipides (Vance 1990; 1991). La phosphatidylsérine est synthétisée au sein du réticulum endoplasmique puis migre via les MAMs jusqu'à son site de décarboxylation dans les membranes mitochondriales. La phosphatidyléthanolamine ainsi obtenue repasse des mitochondries à son site de méthylation en phosphatidylcholine au niveau du réticulum endoplasmique. La phosphatidylcholine migre alors vers les mitochondries à l'aide des MAMs. Un dysfonctionnement de ce système de synthèse et de transfert des phospholipides conduit à des perturbations métaboliques.

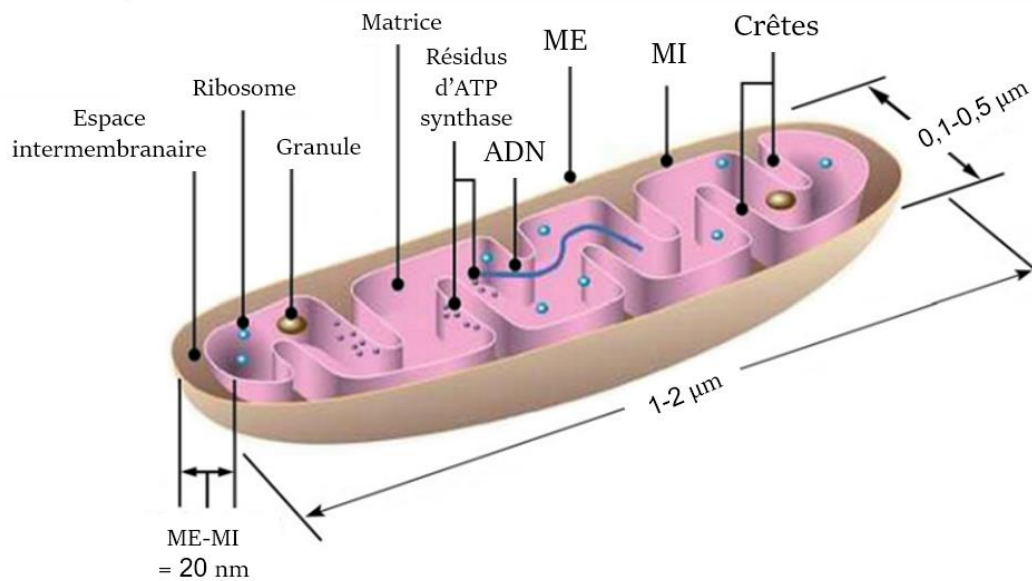


Figure 10 : Structure de la mitochondrie. ME : membrane externe ; MI : membrane interne ; ME-MI : distance entre les 2 membranes de la mitochondrie. (Source : d'après Anupama N., Fundam Clin Pharmacol., 2018)

L'espace intermembranaire sépare la membrane externe de la membrane interne. Cette dernière offre une surface supérieure à la membrane externe suite aux nombreuses invaginations dans la matrice qu'elle présente. Ces reliefs membranaires sont appelés des crêtes et ils supportent les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale. La matrice mitochondriale contient de nombreux éléments : de l'acide désoxyribonucléique (ADN), des ribosomes, des enzymes et encore des accumulations granuleuses d'ions calcium, sodium et potassium. Parmi tous les composants d'une cellule eucaryote, seules les mitochondries possèdent leur propre ADN, résultat de la symbiose historiquement décrite. En effet, 10% de l'ADN total de la cellule existe sous forme d'ADN mitochondrial. La part restante appartient exclusivement à l'ADN présent dans le noyau de la cellule. Le génome mitochondrial humain est circulaire,

mesure 16 569 paires de bases et chaque mitochondrie peut contenir 2 à 10 copies de cette molécule d'ADN (Wiesner, Rüegg, et Morano 1992). Il comporte 37 gènes l'un à la suite de l'autre, séparés par de courtes régions non traduites (Figure 11) (Schon, DiMauro, et Hirano 2012). Comme pour le génome nucléaire, l'ADN mitochondrial permet d'obtenir des acides ribonucléiques (ARN) par le phénomène de transcription. Les gènes mitochondriaux codent pour 2 ARN ribosomiques (ARNr), 22 ARN de transfert (ARNt) et 13 ARN messagers (ARNm) permettant la traduction de protéines incluses dans les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale (Chan 2006).

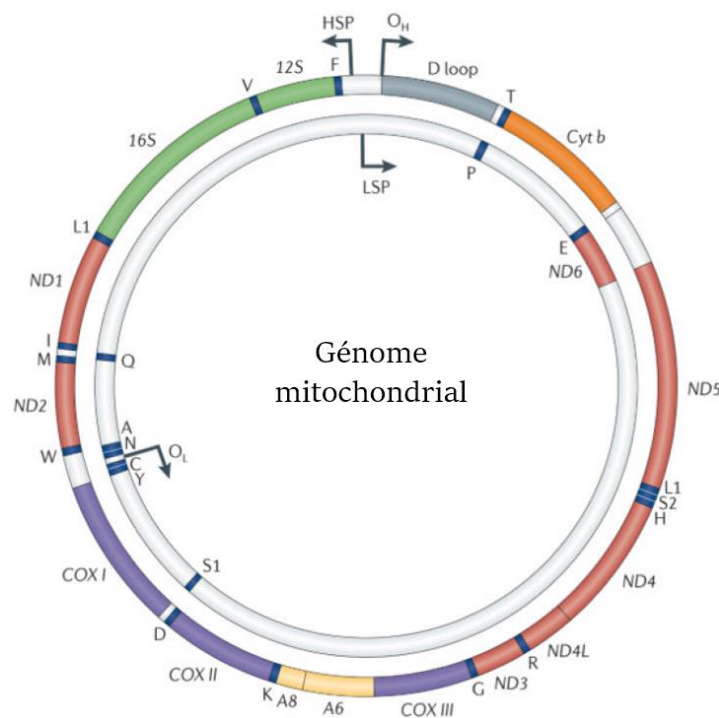


Figure 11 : Génome mitochondrial. Le génome mitochondrial humain. Les 37 gènes codés par l'ADN mitochondrial (ADNmt) comprennent 7 sous-unités du complexe I (ND1, 2, 3, 4, 4L, 5 et 6), une sous-unité du complexe III (cytochrome b (Cyt b)), trois sous-unités du complexe IV (Cytochrome c oxydase (COX) I, II et III), deux sous-unités de la F1-F0 ATP synthase (A6 et A8), deux ARNr (12S et 16S) et 22 ARNt (nommé ici par une seule lettre). Les origines de la réplication du brin lourd (OH) et du brin léger (OL) sont également illustrées. Les promoteurs de transcription du brin lourd (HSP) et du brin léger (LSP). (Source : adapté de Schon EA., Nat Rev Genet., 2012)

2.3 L'oxydation phosphorylante : principale fonction des mitochondries

Les mitochondries contribuent à de nombreuses fonctions telles que la signalisation calcique, le développement embryonnaire, la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS pour reactive oxygen species) ou encore les phénomènes d'apoptose. Outre ceux cités précédemment, leur rôle principal reste la production d'adénosine triphosphate (ATP), véritable « fuel » de l'organisme car elle représente la molécule majeure du métabolisme énergétique (Figure 12) (Dorn II 2015).

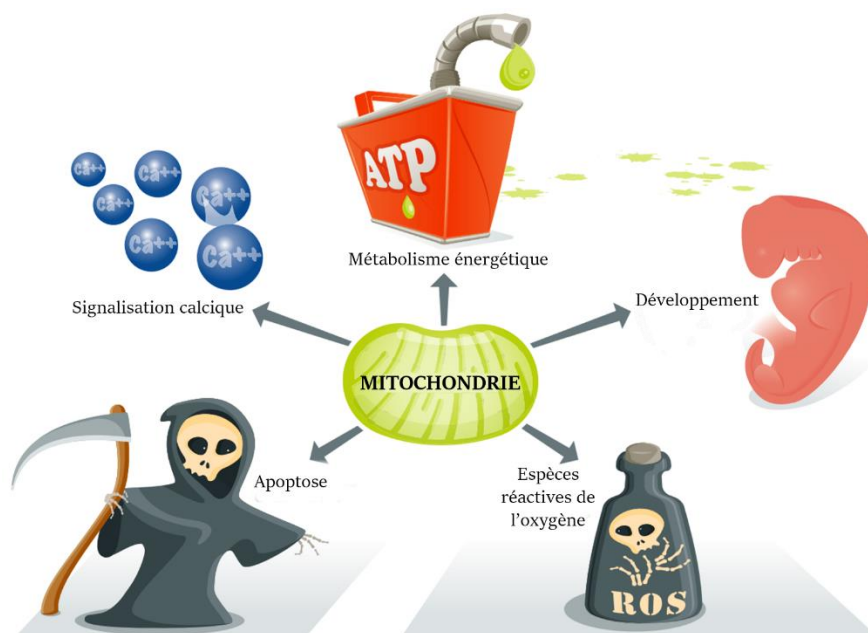


Figure 12 : Principaux rôles des mitochondries. Les mitochondries sont impliquées dans le métabolisme énergétique (ATP), le développement embryonnaire, la signalisation calcique, la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et l'apoptose. (Source : d'après Dorn GW., EMBO Mol Med., 2015)

La réserve cardiaque d'ATP reste faible, seulement 1 gramme, alors qu'environ 30 kg d'ATP sont consommés chaque jour. Plus un tissu est énergie-dépendant, plus les mitochondries sont présentes. De même, plus la production d'énergie demandée aux mitochondries est importante, plus celles-ci présentent une surface de crêtes élevée et une densité conséquente de complexes de la chaîne respiratoire (Leveille et al. 2017). La présence de ces complexes est en effet corrélée aux besoins énergétiques du tissu, qui est elle-même associée à la consommation d'oxygène. Il a d'ailleurs été observé que le cœur est l'organe le plus imposant en terme de consommation en oxygène (Rolfe et Brown 1997). Chez l'Homme,

bien que cet organe ne représente en moyenne que 0,4% du poids corporel total, il consomme à lui seul 11% de l'oxygène utilisé par l'organisme (Tableau 1). Dans une situation aérobie physiologique, plus de 90% de l'ATP produit au quotidien par le cœur provient de l'oxydation phosphorylante au sein de la chaîne respiratoire mitochondriale. Les 10% restants résultent de la glycolyse, anaérobie principalement, ou le cycle de l'acide tricarboxylique connu aussi sous le nom de cycle de Krebs ou cycle de l'acide citrique (Bonora et al. 2012).

Tableau 1 : Relation entre la masse et la consommation d'oxygène des tissus. (Source : d'après Rolfe DFS. et Brown GC., Physiol Rev., 1997)

	Masse de l'organe (% du poids corporel)	Consommation d'oxygène (% de la consommation totale)
Humain		
Cœur	0,4	11
Reins	0,5	6
Poumons	0,9	4
Cerveau	2	20
Foie	2	17
Tractus intestinal	2	10
Muscles squelettiques	42	20
TOTAL	49,8	88
Rat		
Cœur	0,5	3
Reins	0,9	7
Poumons	0,6	1
Cerveau	1,5	3
Foie	5	20
Tractus intestinal	5	5
Muscles squelettiques	42	30
TOTAL	55,5	69

La chaîne respiratoire mitochondriale se situe au niveau de la membrane interne des mitochondries. Elle se compose de quatre complexes protéiques : le complexe I (NADH-ubiquinone réductase), le complexe II (succinate-ubiquinone réductase), le complexe III (ubiquinol-cytochrome c réductase ou complexe bc1) et le complexe IV (cytochrome c oxydase). Parfois nommée à tort complexe V, une enzyme complète le système d'oxydation phosphorylante et permet la production d'énergie pour la cellule. Il s'agit de la F₁F₀-ATP synthase qui permet la synthèse d'ATP par transfert des protons (H⁺) de l'espace inter-membranaire vers la matrice mitochondriale (Green et Tzagoloff 1966). La présence des protons dans l'espace inter-membranaire résulte de l'activité des complexes I, III et IV.

Elle découle du transfert des électrons (e^-) entre les complexes de la membrane interne. Le transfert d'électrons est engendré par l'oxydation de la nicotinamide adénine dinucléotide réduite ($\text{NADH}+\text{H}^+$ ou NADH) et de la flavine adénine dinucléotide réduite (FADH_2) issus du métabolisme intermédiaire, en particulier du cycle de Krebs (Dare et al. 2009). Un troisième point d'entrée des électrons dans la chaîne respiratoire est l'ETF-ubiquinone oxydoréductase (ETFQoR ou ETF-ubiquinone déshydrogénase) qui réduit l'ubiquinone (aussi appelé coenzyme Q, CoQ ou CoQ10) en ubiquinol (QH_2). Le transfert d'électrons favorise l'installation d'un gradient de protons de part et d'autre de la membrane mitochondriale interne qui alimente l'ATP synthase. Le gradient de protons est responsable d'une différence de pH autrement dénommée ΔpH . Il est important de noter que le pH sanguin est égale à 7,4 alors que celui des cardiomyocytes a été évalué à 7,1-7,2 (Swietach et al. 2010). En revanche, une étude du pH sur des cellules endothéliales humaines ECV304 a mis en évidence un pH cytosolique d'environ 7,6 contre un pH de 7,8 dans la matrice mitochondriale (Porcelli et al. 2005). Le pH de l'espace intermembranaire a en revanche été évalué à 6,9. En plus de cette variation de pH, les protons H^+ chargés positivement, les électrons (e^-) issus de la chaîne respiratoire et les différents ions présents dans l'environnement mitochondrial vont entraîner en parallèle un gradient électrique entre l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale. Cette différence électrique est nommée potentiel de membrane ($\Delta\Psi$). L'association du ΔpH et du $\Delta\Psi$ forme le gradient électrochimique. C'est ce dernier qui régule l'activité de l'ATP synthase mitochondriale, la F_1F_0 -ATP synthase (Figure 13).

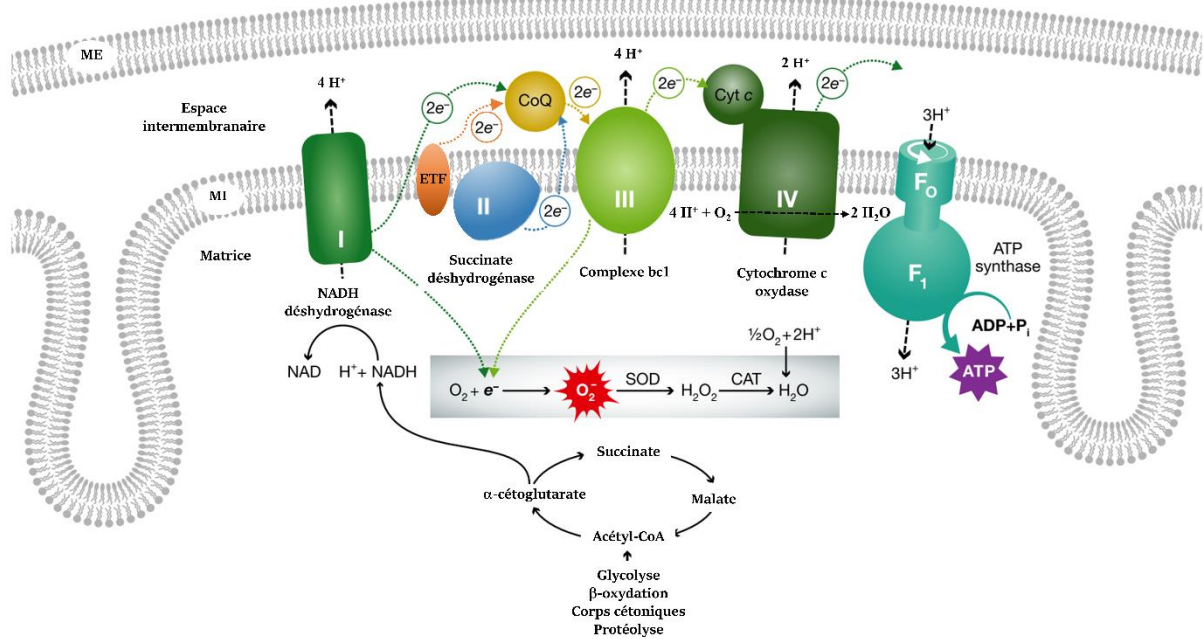


Figure 13 : La chaîne respiratoire mitochondriale. ME : membrane externe ; MI : membrane interne ; CoQ : Coenzyme Q ; Cyt c : cytochrome c ; H^+ : proton ; e^- : électron ; H_2O : eau ; O_2 : dioxygène ; ATP : adénosine triphosphate ; ADP : adénosine diphosphate ; P_i : phosphate inorganique ; SOD : dismutase à superoxydes ; CAT : catalase ; ETF : flavoprotéine de transfert d'électrons (forme l'ETF-ubiquinone oxydoréductase par son association avec le CoQ). (Source : adapté de Dorn GW., EMBO Mol Med., 2015)

2.3.1 Les complexes de la chaîne respiratoire

Le complexe I est constitué de 46 sous-unités représentant environ 1000 kDa. Au niveau de celui-ci, la NADH déshydrogénase transforme le $NADH+H^+$ en nicotinamide adénine dinucléotide oxydée (NAD^+) et transfère $2 e^-$ à une sous-unité du complexe, la flavine mononucléotide (FMN), qui marquera le début du transfert des électrons à travers divers centres fer-soufre (Fe-S). Attirés par des potentiels électrochimiques de moins en moins négatifs, ces électrons poursuivent leur route jusqu'au CoQ situé au niveau de la membrane interne, résultant en la formation de QH_2 . Cette dernière opération nécessite de prélever $2 H^+$ dans la matrice mitochondriale, ce qui participe également au gradient de protons. L'ensemble conduit au rejet de $4 H^+$ dans l'espace intermembranaire (Lenaz et al. 2006).

Le complexe II est le seul appartenant à la fois à la chaîne respiratoire et au cycle de Krebs. En effet, il contient une enzyme appelée la déshydrogénase du succinate qui catalyse l'oxydation du succinate en fumarate plus $2 H^+$. Cette réaction conduit à la transformation du

cofacteur interne au complexe, la flavine adénine dinucléotide réduite FADH_2 en sa forme oxydée FAD (Dourado, Swart, et Carvalho 2018). Elle mène au transfert de $2 e^-$ à travers des centres Fe-S jusqu'au noyau héminique du complexe II. Ensuite, les électrons transitent au niveau du pool des quinones et conduisent à la réduction du CoQ en QH_2 qui nécessite 2H^+ . L'équilibre des protons au niveau de ce complexe ne lui permet pas de participer au gradient de protons (Jang et Javadov 2018). De plus, l'oxydation du FADH_2 libère moins d'énergie que celle du $\text{NADH}+\text{H}^+$. En effet, une molécule de ce dernier conduit à la production de 2,73 molécules d'ATP contre seulement 1,64 molécules pour le FADH_2 (Silverstein 2014; Mookerjee et al. 2017).

Le complexe III est composé de 2 cytochromes b et d'un cytochrome c_1 , auquel viennent s'associer le cytochrome c situé dans l'espace intermembranaire (Kim et al. 2012). Les cytochromes sont des protéines de transfert possédant au moins un noyau héminique dont l'atome de fer oscille entre l'état ferreux Fe^{2+} et l'état ferrique Fe^{3+} lors de la circulation des électrons issus du pool de CoQ . Le complexe bc_1 catalyse l'oxydation d'une molécule d'ubiquinol QH_2 et la réduction de deux molécules de cytochrome c. Contrairement au CoQ qui transporte deux électrons par molécule, le cytochrome c ne transporte qu'un électron par molécule. Ceci conduit à un mécanisme de transfert d'électrons plus sophistiqué que ceux des autres complexes. Il correspond au cycle Q, constitué de 2 étapes (Trumpower 1990). Au cours de chaque phase, 2H^+ sont éjectés dans l'espace intermembranaire, soit 4H^+ au total pour chaque cycle (Schultz et Chan 2001).

Le complexe IV est composé de 13 sous-unités, possède 2 groupes hémiques et renferme des ions métalliques : 3 de cuivre, 1 de zinc et 1 de magnésium (Tsukihara et al. 1996). Il s'associe aux cytochromes c réduits par le complexe III et catalyse leur oxydation. La réaction s'accompagne du transfert de $4 e^-$ vers une molécule d' O_2 permettant la formation de 2 molécules d' H_2O au niveau de la matrice mitochondriale. Cette réaction induit la libération de 4H^+ dans l'espace intermembranaire pour une molécule de dioxygène soit 2H^+ par molécule d'oxygène (Crofts 2004).

La F_1F_0 -ATP synthase est composée de 2 assemblages protéiques (Figure 14). La partie F_0 est située dans la membrane interne. Elle est constituée d'un cœur appelé l'anneau c, composé de plusieurs copies de la même sous-unité, formant un pore à protons. Ce nombre de copies, qui semble conservé entre les espèces, même entre vertébrés et invertébrés, a été évalué à 8

chez le bovin (Watt et al. 2010). Un exemplaire des sous-unités a, b, d, F6 et de la protéine conférant la sensibilité à l'oligomycine (OSCP) sont également associés à ce noyau principal. Les sous-unités b, d, F6 et OSCP forment la tige périphérique qui se trouve à un côté du complexe. Un certain nombre d'autres sous-unités (e, f, g et A6L), qui couvrent toute la membrane, sont associées à F₀. Le domaine F₁ est quant à lui situé dans la matrice mitochondriale et s'associe à l'anneau c de F₀. Il constitue la partie rotative de l'ATP synthase directement responsable de la synthèse d'ATP. Il est composé de trois exemplaires de chacune des sous-unités α et β, plus une de chacune des sous-unités γ, δ et ε. Les sous-unités γ, δ et ε constituent la tige centrale du domaine (Fujikawa et al. 2015).

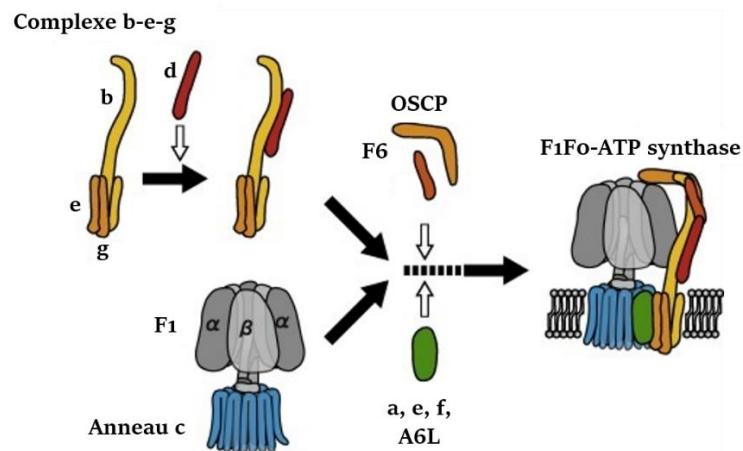


Figure 14 : Structure de la F₁F₀-ATP synthase mitochondriale. Les sous-unités du domaine F₁ sont 3α, 3β, 1γ, 1δ et 1ε. L'élément F₀ se compose de l'anneau c auquel se fixe les sous-unités a, e, f et A6L. Le complexe b-e-g associé aux protéines F6 et OSCP forme la tige latérale de l'enzyme. (Source : adapté de Fujikawa et al., FEBS Lett., 2015)

La F₁F₀-ATP synthase transfère les H⁺ obtenus via la chaîne respiratoire de l'espace intermembranaire vers la matrice suite à la force protomotrice instaurée. Ce déplacement entraîne une rotation de 120° au niveau des sous-unités motrices du domaine F₁. L'action mécanique imposée fournit l'énergie à l'ATP synthase et provoque la formation d'ATP à partir d'adénosine diphosphate (ADP) et d'un phosphate inorganique (P_i). La théorie du fonctionnement de la F₁F₀-ATP synthase grâce au gradient de protons a été découverte par Mitchell, ce qui lui a valu le prix Nobel de Chimie en 1978 (Mitchell 1961). Adachi et coll. a mis en évidence que l'hydrolyse de l'ATP utilise la même voie mais en sens inverse : en cas de forte production d'ATP, l'enzyme perd son affinité pour l'ADP et privilégie au contraire l'utilisation de l'ATP (Adachi et al. 2007). L'oligomycine est un inhibiteur de l'ensemble des ATPases de l'organisme et également de la F₁F₀-ATP synthase mitochondriale suite à la présence de la sous-unité OSCP (Devenish et al. 2000).

Dans certaines situations, il a été observé des associations possibles entre différents complexes de la chaîne respiratoire incluant la F_1F_0 -ATP synthase (Letts et Sazanov 2017). Elles ne concernent pas forcément toujours tous les éléments de la chaîne mais peuvent parfois constituer des structures imposantes. Ces macromolécules sont nommées supercomplexes ou respirasomes (Lenaz et al. 2006). D'après une étude stœchiométrique, ils présenteraient une répartition moyenne des complexes I, II, III, IV et de la F_1F_0 -ATP synthase de 1,1 ; 1,3 ; 3,0 ; 6,7 et 3,5 respectivement (Schägger et Pfeiffer 2001). Des travaux récents ont observés la formation de mégacomplexes de plus de 140 sous-unités (Guo et al. 2017).

L'ATP fraîchement formé est expulsé dans l'espace intermembranaire par la translocase des nucléotides adényliques (ANT) en permettant à l'ADP de pénétrer dans la matrice mitochondriale en parallèle (Kim et al. 2010). Le cœur étant un organe synthétisant et consommant beaucoup d'ATP, il nécessite un renouvellement élevé des taux de cette molécule énergétique tout en permettant son adressage de sa zone de production vers son lieu d'utilisation. Cela nécessite le système de la navette créatine phosphate (Kammermeier 1987). Cette navette est impliquée dans l'homéostasie du ratio phosphocréatine/créatine (Bessman 1987). La synthèse de créatine est réalisée par la glycine amidinotransférase rénale qui, à partir d'arginine et de glycine, forme du guanidinoacétate. Ce dernier composé permet la synthèse de créatine sous l'effet de la N-guanidinoacétate méthyltransférase hépatique. La créatine rejoint alors la circulation sanguine jusqu'à l'organe cible (Figure 15). Elle pénètre dans les cardiomyocytes grâce au transporteur de la créatine situé dans la membrane plasmique. Il existe plusieurs isoformes de la créatine kinase : la créatine kinase myofibrillaire, la créatine kinase mitochondriale et la créatine kinase cytosolique dont les activités représentent 88%, 10% et moins de 2% de l'activité créatine kinase totale dans le myocarde (Nascimben et al. 1996). La créatine kinase mitochondriale est située dans l'espace intermembranaire, accolée à la membrane interne et à l'ANT, ce qui lui procure également un rôle de structure. Sous le contrôle des différentes créatines kinases, l'ATP une fois produite par oxydation phosphorylante est exportée dans l'espace intermembranaire grâce à l'ANT. Ensuite, la créatine kinase mitochondriale récupère un groupement phosphate de l'ATP puis le transfère sur la créatine conduisant à la formation de phosphocréatine, d'ADP et de H^+ . L'ADP rejoint ensuite la matrice mitochondriale où il peut être re-phosphorylé par la F_1F_0 -ATP synthase. En parallèle, la phosphocréatine formée est expulsée dans le cytosol via une porine de la membrane externe des mitochondries où elle joue le rôle d'accumulateur énergétique fortement disponible. En cas de besoin énergétique comme lors de la contraction musculaire,

la créatine kinase myofibrillaire réalise la réaction inverse en formant de l'ATP et de la créatine à partir de la phosphocréatine et de l'ADP obtenu par la contraction des myofibrilles (Zervou et al. 2016). Ce système est extrêmement important car l'affinité de la mitochondrie pour l'ADP se réduit quand l'organite produit de l'ATP. La navette créatine phosphate permet donc de maintenir un rendement énergétique suffisant, surtout pour les organes fortement demandeurs comme le cœur. Il a d'ailleurs été observé que les situations d'hypoxie stimulent l'expression de la créatine kinase, ce qui montre son implication dans des situations anaérobies (Álvarez-Herms et al. 2016). Dans de nombreuses cardiomyopathies, les concentrations des différentes créatines kinases sont réduites, hormis celle de la créatine kinase cytosolique (Ventura-Clapier 1998). Dans le cadre du diabète en revanche, toutes les isoformes sont réduites au niveau cardiaque. Un constat similaire a été observé dans le cas d'une restriction calorique chez le rat (Kirsch et Savabi 1992).

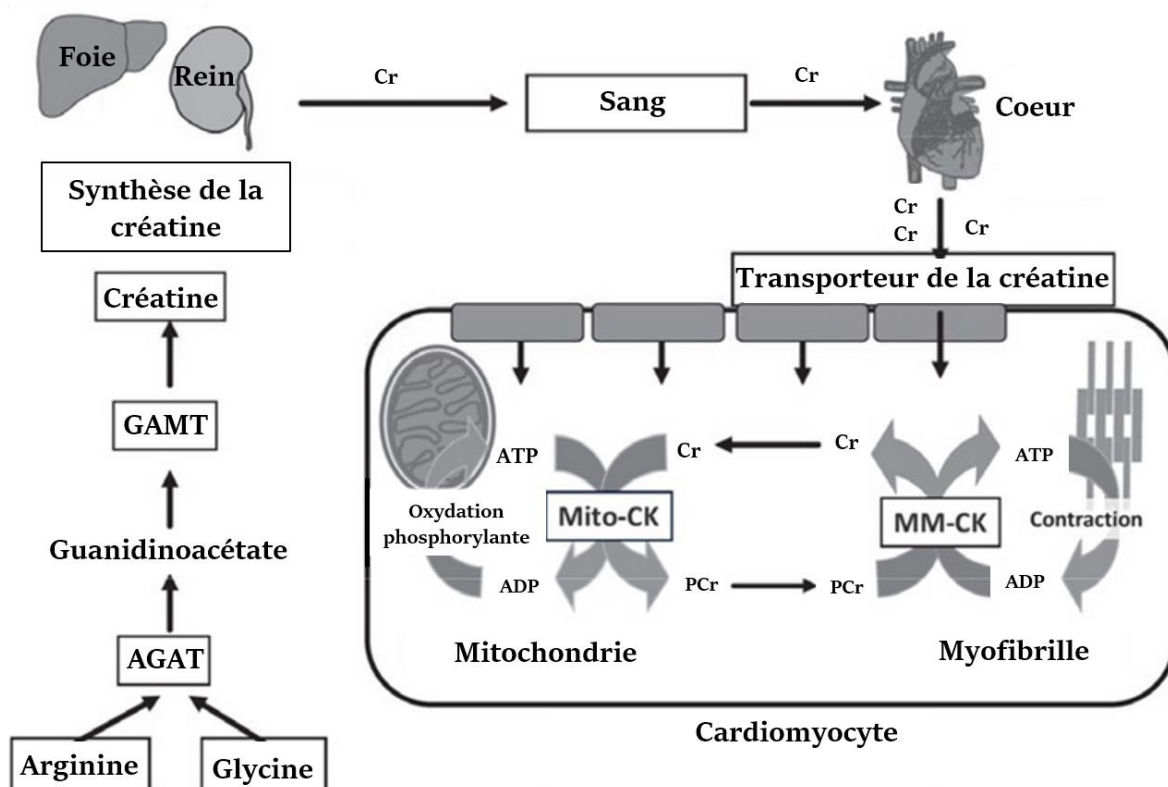


Figure 15 : Synthèse de la créatine et son implication dans le système de la navette créatine phosphate. AGAT : glycine amidinotransférase rénale ; GAMT : N-guanidinoacétate méthyltransférase hépatique ; Cr : créatine ; PCr : phosphocréatine ; Mito-CK : créatine kinase mitochondriale ; MM-CK : créatine kinase myofibrillaire ; ATP : adénosine triphosphate ; ADP : adénosine diphosphate. (Source : d'après Zervou, Mini Rev Med Chem., 2016)

2.3.2 Les principaux substrats de l'oxydation phosphorylante

Avant d'engendrer la production d'ATP, de nombreuses étapes métaboliques sont nécessaires. La chaîne respiratoire mitochondriale doit tout d'abord recevoir des substrats afin d'alimenter son fonctionnement. Au niveau cardiaque, entre 60 à 90% de l'ATP produit par la phosphorylation oxydative tient sa source dans la β -oxydation des acides gras. La part restante est majoritairement occupée par l'oxydation du glucose et du lactate alors que les corps cétoniques et les acides aminés ne représentent qu'une part mineure dans le cœur sain (Wisneski et al. 1985; Gertz et al. 1988; W. C. Stanley, Recchia, et Lopaschuk 2005).

L'utilisation du glucose débute par son entrée dans la cellule. D'une part, le glucose issu des réserves de glycogène est déjà présent dans les cellules cardiaques et il ne nécessite donc pas de passage par la membrane plasmique. D'autre part, le glucose exogène pénètre via une famille de transporteurs spécifiques appelés les GLUT (pour « GLUcose Transporter »). Au niveau cardiaque, GLUT 1 et 4 sont les deux formes les plus représentées. GLUT1 constitue le principal transporteur du glucose dans le cœur du fœtus, période pendant laquelle il contribue à l'absorption constitutive du glucose nécessaire au développement. GLUT4 est l'isoforme prédominante chez l'adulte où il assure la régulation majeure de l'absorption basale du glucose (Abel 2004; Aerni-Flessner et al. 2012, 4). La présence de ce transporteur sur la membrane plasmique est sous la dépendance du signal insulinique. A la suite de son absorption, le glucose subit la glycolyse décomposée en de nombreuses phases mais dont 3 étapes ATP-dépendantes sont irréversibles : la phosphorylation du D-glucose en glucose-6-phosphate par une hexokinase (HK), l'ajout d'un second phosphate sur le fructose 6-phosphate conduisant ainsi au fructose-1,6-biphosphate et l'étape finale d'obtention du pyruvate grâce à l'action de la pyruvate-kinase. La glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) est déterminante dans le contrôle de la glycolyse. Elle catalyse la conversion du 3-phosphate de glycéraldéhyde en 1,3-diphosphoglycérate et produit du $\text{NADH}+\text{H}^+$, facteur limitant de la glycolyse dont l'accumulation inhibe l'activité de l'enzyme. *A contrario*, une concentration intracellulaire importante de NAD^+ stimule l'enzyme (Stanley, Recchia, et Lopaschuk 2005). Le $\text{NADH}+\text{H}^+$ obtenu lors de la glycolyse est localisé dans le cytosol. La membrane mitochondriale est imperméable à ce cofacteur et nécessite donc un mécanisme d'entrée spécifique dans la matrice : la navette malate-aspartate (Haslam et Krebs 1968; Indiveri, Krämer, et Palmieri 1987). Le pyruvate peut aussi être obtenu à partir du lactate par action de

la lactate déshydrogénase (LDH), cette réaction fournissant également du $\text{NADH}+\text{H}^+$. A l'inverse, dans une situation anaérobie, la LDH effectue la transformation du pyruvate en lactate en produisant dans ce cas-ci du NAD^+ (Neill et al. 1969). Le pyruvate est conduit dans la mitochondrie où il peut subir soit une décarboxylation oxydative soit une carboxylation. L'oxydation du pyruvate s'effectue par l'action consécutive de 3 enzymes : la pyruvate déshydrogénase (PDH), la dihydrolipoyl transacétylase permettant d'obtenir de l'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA), principal substrat du cycle de Krebs, et enfin la dihydrolipoyl déshydrogénase permettant d'obtenir du $\text{NADH}+\text{H}^+$. Ce dernier servira de donneur d'électrons au complexe I de la chaîne respiratoire. La PDH peut être inhibée à la suite d'une phosphorylation par la pyruvate déshydrogénase kinase (PDK). Cette enzyme existe sous 4 isoformes (PDK 1, 2, 3 et 4). La PDK4 est la forme majoritaire retrouvée dans le myocarde. La PDK1 joue également un rôle (Sugden et Holness 2003). Le pyruvate peut aussi subir une carboxylation pour former de l'oxaloacétate ou du malate, deux intermédiaires du cycle de Krebs. L'oxaloacétate inhibe également le complexe II de la chaîne respiratoire en s'associant à lui (Stepanova et al. 2016).

Une fois les acides gras non estérifiés présents dans la circulation sanguine, leur utilisation demande au préalable leur entrée dans le cytosol. Ceci se fait grâce à 3 protéines membranaires : la translocase d'acides gras FAT/CD36, la protéine de liaison des acides gras à la membrane plasmique FABPpm et la protéine de transport des acides gras FATP (Glatz, Luiken, et Bonen 2001). Les acides gras à chaîne courte peuvent diffuser directement au travers de la membrane interne des mitochondries où ils sont ensuite transformés en acyl-coenzyme A (acyl-CoA). En revanche, les acides gras à longue chaîne sont tout d'abord transformés en acyl-CoA dans le cytosol grâce à l'isoforme 1 de la synthétase d'acyl CoA. Ils sont ensuite soit estérifiés en triglycérides de stockage par la glycérolphosphate acyltransférase, soit incorporés dans les phospholipides membranaires, soit transformés en acylcarnitine à longue chaîne par le transfert du groupement acyl entre le coenzyme A et la carnitine grâce à la carnitine palmitoyltransférase 1 (CPT1) situé dans la membrane externe des mitochondries (G. D. Lopaschuk et al. 1994; van der Vusse, van Bilsen, et Glatz 2000; Ellis et al. 2011). La CPT1 constitue le principal régulateur de la β -oxydation selon la teneur en malonyl-CoA qui joue le rôle d'inhibiteur endogène de l'absorption des acides gras mitochondriaux. Ce dernier est produit dans la synthèse *de novo* des acides gras par l'acétyl-CoA carboxylase, elle-même inhibée par phosphorylation grâce à la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK). Le malonyl-CoA est dégradé via l'action de la malonyl-CoA décarboxylase. Une augmentation

du malonyl-CoA entraîne l'inhibition de la CPT1 ce qui réduit la β -oxydation. Dans l'ischémie cardiaque, l'activation de l'AMPK diminue le taux de malonyl-CoA conduisant, pour le métabolisme oxydatif du cœur, à une contribution accrue des acides gras dont le taux circulant est augmenté (Dyck et Lopaschuk 2002). Contrairement à l'utilisation stimulée des acides gras, une baisse de l'oxydation du pyruvate est également constatée dans le cadre de l'ischémie. Ces adaptations énergétiques peuvent être toutes les deux limitées en augmentant le taux de malonyl-CoA. Une telle action s'avère bénéfique pour le cœur dans des situations d'altération de la fonction cardiaque telles que l'ischémie ou l'obésité (Lopaschuk et Stanley 2006; Folmes et Lopaschuk 2007). Une augmentation du malonyl-CoA au niveau hypothalamique apparaît même comme un régulateur central de l'appétit en diminuant la prise alimentaire et à l'inhibition de la CPT1. Suite à l'action de la CPT1, l'acylcarnitine transite tout d'abord vers l'espace intermembranaire à l'aide d'une porine puis dans la matrice mitochondriale, en échange d'une molécule de carnitine libre, via une translocase à acylcarnitine située dans la membrane interne (Kerner et Hoppel 2000). Une fois dans la matrice mitochondriale, la carnitine palmitoyltransférase 2 (CPT2) reconvertit l'acylcarnitine en acyl-CoA qui entre alors dans le cycle de la β -oxydation. Cette réaction conduit à la formation d'acétyl-CoA générant via le cycle de Krebs du NADH et du FADH₂, principaux donneurs d'électrons pour le fonctionnement de la chaîne respiratoire. La β -oxydation des acides gras à moyenne et longue chaînes conduit majoritairement à l'obtention de FADH₂ (Schönfeld et al. 2010). Cependant, l'étude de l'oxydation phosphorylante à l'aide du palmitoylcarnitine-malate chez le rat met en évidence qu'un substrat lipidique alimente la chaîne respiratoire mitochondriale grâce à plusieurs voies : i) via les flavoprotéines transférantes d'électrons (ETF) qui transmettent les électrons vers un CoQ, cofacteur de l'ETFQoR, ii) par l'oxydation du NADH+H⁺ au niveau du complexe I, voie similaire à celle d'un substrat glucidique et iii) par l'oxydation du succinate, intermédiaire du cycle de Krebs, qui est oxydé au niveau du complexe II (Perevoshchikova et al. 2013). La voie des ETF est une voie spécifique aux substrats lipidiques. Le premier acteur de la β -oxydation des acides gras, l'acyl-CoA déshydrogénase, est une enzyme à FAD qui est localisée dans la matrice mitochondriale, c'est-à-dire en milieu hydrophile. Le FAD, hydrophobe en revanche, nécessite les ETF FAD-dépendantes pour transmettre les électrons à l'ETFQoR. Ce dernier est très présent au sein du tissu adipeux brun et représente également une part importante des protéines impliquées dans le transfert des électrons au niveau du cœur (Orr et al. 2012). Ceci peut s'expliquer par la forte utilisation des acides gras comme substrat énergétique au niveau cardiaque. En revanche, au niveau des

muscles squelettiques, l'ETQoR représente une part moins importante qu'au niveau du muscle myocardique.

En plus des principaux substrats cités préalablement, les corps cétoniques, les acides aminés et le lactate peuvent pénétrer directement dans les mitochondries pour subir une oxydation. Cependant, ils ne représentent qu'une part minime de l'apport énergétique global au niveau cardiaque en conditions physiologiques en raison de leur faible disponibilité. Leur utilisation est augmentée dans différentes situations, généralement suite à une déficience énergétique due par exemple à un jeûne prolongé, une anaérobiose, des situations cancéreuses, un trouble du métabolisme glucidique ou une β -oxydation insuffisante (Wentz et al. 2010; Cotter, Schugar, et Crawford 2013; Porporato et al. 2016; Chen et al. 2016).

Dans les périodes de besoins énergétiques importants telles qu'une activité physique intense ou un stress sévère, le taux de lactate circulant est accru et ceci conduit à une augmentation de son oxydation par rapport à la β -oxydation et au catabolisme du glucose dans le myocarde (Schönekeß 1997; Gibb et al. 2017; Fulghum et Hill 2018). Cependant, cet effet bénéfique n'est valable qu'avec le L-lactate, isomère majoritaire dans l'organisme : le-D-lactate, au contraire, altère la production énergétique aux niveaux cardiaque et cérébral chez le rat (Ling et al. 2012).

Les corps cétoniques sont issus de la cétogenèse qui s'effectue principalement au niveau hépatique par l'oxydation des acides gras provenant de la circulation sanguine. Parmi eux, le β -hydroxybutyrate et l'acétoacétate sont ré-orientés dans la circulation sanguine afin de rejoindre les organes cibles, principalement le cœur et le cerveau. Le métabolisme des corps cétoniques conduit à l'obtention d'acétyl-CoA qui alimente le cycle de Krebs (Newman et Verdin 2014).

Chez l'Homme, certains acides aminés présentent un potentiel cétogène, c'est-à-dire que leur catabolisme produit des corps cétoniques qui sont métabolisés en entrant dans le cycle de Krebs sous forme d'acétyl-CoA. Ces acides aminés sont : la leucine, la lysine, la phénylalanine, l'isoleucine, la thréonine, le tryptophane et la tyrosine (Nshimiyimana, Liu, et Du 2019). Les deux premiers sont exclusivement cétogènes alors que les autres sont également glucoformateurs.

Le cycle de Krebs ou cycle de l'acide tricarboxylique ou encore cycle de l'acide citrique survient dans les mitochondries et décrit une chaîne de réactions enzymatiques conduisant après plusieurs oxydations à la formation d'oxaloacétate (Figure 16). L'acétyl-CoA produit par la glycolyse, la β -oxydation et l'oxydation du L-lactate interagit avec l'oxaloacétate pour former du citrate, premier constituant du cycle de Krebs (Peuhkurinen 1984). Trois déshydrogénases (isocitrate déshydrogénase, α -cétoglutarate déshydrogénase et malate déshydrogénase) produisent 3 molécules de NADH à chaque tour du cycle. De plus, le succinate hydrosoluble est formé dans le cycle puis il est oxydé au niveau du complexe II de la chaîne respiratoire. Chaque tour de cycle produit donc 3 molécules de NADH, 1 de FADH₂ et 1 de GTP. Son bilan global en terme d'efficacité à synthétiser l'ATP est intermédiaire à ceux du NADH et du FADH₂. Deux enzymes du cycle de Krebs sont très utiles dans l'évaluation du stress oxydant mitochondrial : l'aconitase et la fumarase. L'activité de l'aconitase est réduite par le stress oxydant suite à la réaction d'un ion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) avec le groupement [4Fe-4S]²⁺ de l'enzyme (Vásquez-Vivar, Kalyanaraman, et Kennedy 2000). *A contrario*, l'activité de la fumarase est insensible aux ROS et en particulier à l' $O_2^{\cdot-}$. Expérimentalement, le rapport des activités de l'aconitase et de la fumarase dans le tissu entier est utilisé depuis de nombreuses années comme marqueur du stress oxydant au niveau des mitochondries (Gardner, Nguyen, et White 1994). Par l'inactivation de l'aconitase, les ROS inhibent le cycle de Krebs et la production des équivalents réduits, ce qui bloque alors la respiration mitochondriale. Ces mêmes radicaux libres inhibent également le complexe I de la chaîne respiratoire en dégradant les cardiolipides, phospholipides de la membrane interne localisés dans les microdomaines qui régissent l'activité de nombreuses enzymes mitochondriales (Petrosillo et al. 2009).

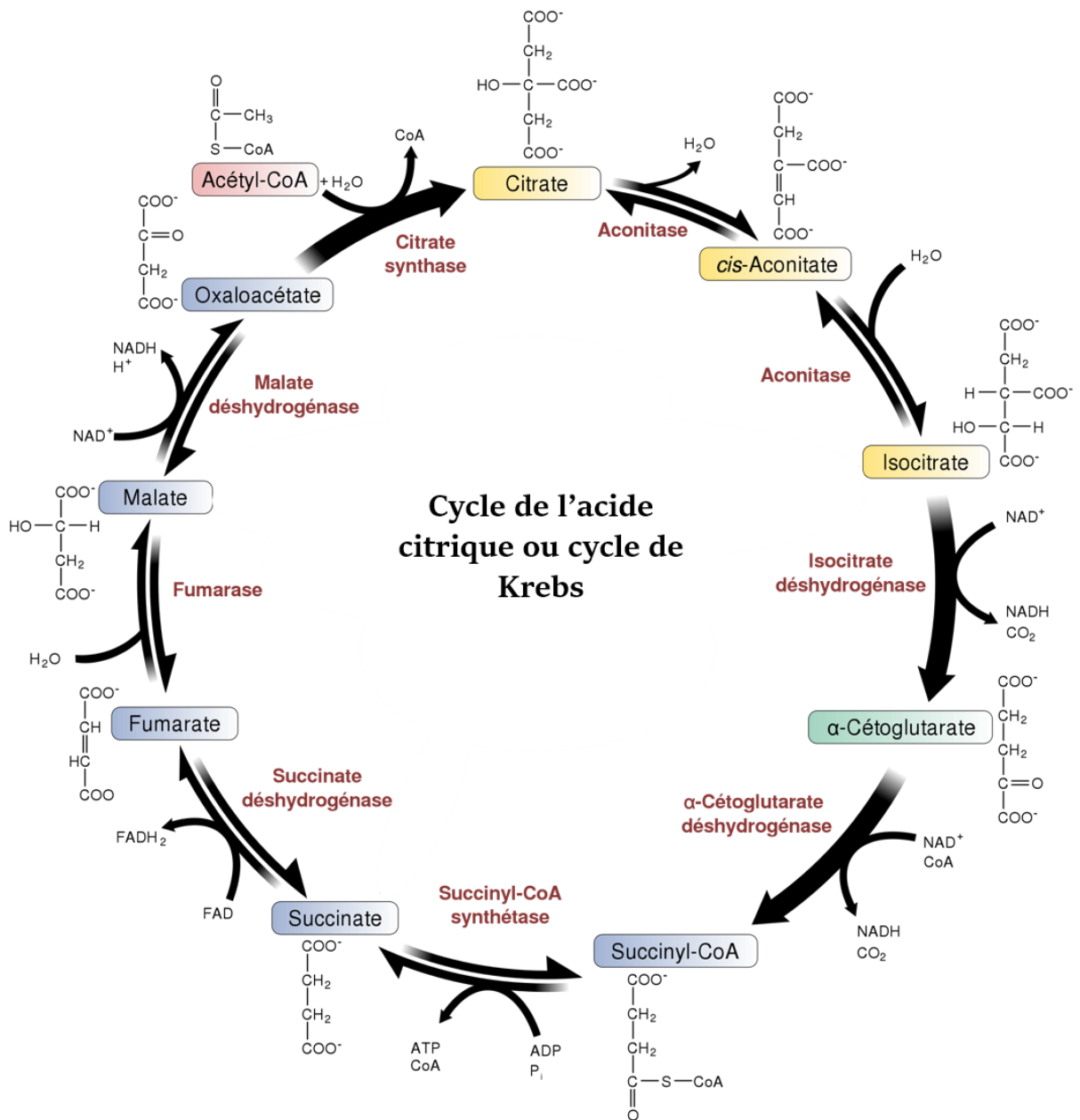


Figure 16 : Le cycle de l'acide tricarboxylique ou cycle de l'acide citrique ou cycle de Krebs. (Source : adapté de https://fr.wikipedia.org/wiki/Cycle_de_Krebs , consulté le 20 août 2019)

Partie 3

Maladies cardiovasculaires et stress oxydant

3.1 Le stress oxydant

3.1.1 Notions sur le stress oxydant

L'oxygène est apparu il y a 2,5 milliards d'années sur Terre. Depuis, il est indispensable à la survie de l'Homme. Pourtant, en 1954, Gershan et coll. mettent en avant le concept d'un effet délétère de l'oxygène qu'il nomme « empoisonnement à l'oxygène » (Gerschman et al. 1954). Ce phénomène est dû à l'apparition de composés dérivés de l'oxygène suite à l'exposition à des radiations. Les composés qu'ils détectent sont des radicaux libres, l'anion superoxyde O_2^- et le radical hydroxyle $HO\cdot$ à partir desquels vont découler d'autres molécules réactives comme l'hydroperoxyde $HO_2\cdot$ et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . En 1956, Harman dévoile sa théorie des radicaux libres et leur impact négatif sur le métabolisme cellulaire dans le vieillissement. Dans son étude, des souris ont vécu 20% plus longtemps grâce à un régime enrichi en antioxydants (Harman 1956). Il met également en avant un mécanisme de défense enzymatique contre ces radicaux libres médié par la dismutase des superoxydes (SOD) qui permet également de limiter l'inflammation en réduisant la mortalité des granulocytes. Les termes de stress oxydant et d'espèces réactives de l'oxygène (ROS pour reactive oxygen species) sont apparus plusieurs années après, dans les années 1970s (Paniker, Srivastava, et Beutler 1970; Weiss, King, et LoBuglio 1977). Fridovich a été le premier à mettre en avant l'impact des radicaux libres sur différentes voies métaboliques de l'organisme (Fridovich 1978). Outre les ROS, les espèces réactives de l'azote (ou RNS pour reactive nitrogen species) ont également été décrites comme impliquées dans le stress oxydant (Darley-Usmar et Halliwell 1996). Le stress oxydant est défini par un déséquilibre du statut oxydant (ou statut rédox). Il est dû à une production excessive de ROS ou de RNS et/ou à une déficience des systèmes antioxydants de l'organisme (Lushchak 2014). Ces anomalies entraînent des dommages aux acides nucléiques, des altérations protéiques suite à des modifications post-traductionnelles, une dégradation lipidique par peroxydation,

favorisent l'apoptose et nuisent à la production énergétique suite à une atteinte mitochondriale (Cooke et al. 2003; Chan et al. 2012; Niki 2008; Navarro-Yepes et al. 2014; Kudryavtseva et al. 2016). Cependant, physiologiquement et en l'absence d'agressions, la production de ROS est faible mais indispensable au bon fonctionnement de l'organisme. En effet, à dose restreinte, elle joue un rôle important dans la croissance, l'angiogenèse, le maintien de certaines voies de signalisation comme l'insuline et aussi dans l'équilibre entre la survie cellulaire et l'apoptose (Geiszt et Leto 2004; H. S. Park et al. 2004; D'Autréaux et Toledano 2007). Il a en particulier été observé que divers facteurs de croissance et cytokines tels que PDGF, EGF, l'insuline, l'angiotensine II et le TNF α induisent la production de l'H₂O₂ dans les cellules cibles en stimulant l'activation de la famille des NADPH oxydases (NOX), protéines reliées à la production de ROS (Geiszt et Leto 2004; Park et al. 2004). De plus, la synthèse de l'hormone thyroïdienne nécessite l'iodation oxydative de résidus spécifiques de tyrosine de la thyroglobuline, ce qui est effectué par une quantité appropriée d'H₂O₂ générée par les NOX (Ohye et Sugawara 2010; Szanto, Pusztaszeri, et Mavromati 2019). Il est également connu qu'en cas d'infection, les ROS peuvent être produits par les macrophages et les neutrophiles afin de stimuler la phagocytose des bactéries (Slauch 2011). Un niveau suffisant de ROS est également nécessaire à certains processus cognitifs comme la mémorisation (Massaad et Klann 2011). De plus, à niveau physiologique, la synthèse des ROS et des RNS active les gènes antioxydants par des mécanismes tels que la voie de signalisation PI3K-Nrf2-ARE. Ce phénomène protège l'organisme en le pré-conditionnant envers une future hausse des facteurs oxydatifs, à l'image d'un vaccin préparant le système immunitaire pour une agression ultérieure (Ray, Huang, et Tsuji 2012; Park et al. 2016). Bien que les ROS et les RNS puissent être bénéfiques et nécessaires à l'organisme, leur production excessive suite à divers stimuli conduit inéluctablement à de nombreuses altérations métaboliques dues au stress oxydant.

3.1.2 Les facteurs du stress oxydant

Les principaux acteurs du stress oxydant sont les ROS et les RNS. Les ROS rassemblent l'anion superoxyde O₂⁻, le radical hydroxyl HO[•], les radicaux peroxydes ROO[•], le radical perhydroxyl HO₂[•], le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ et l'acide hypochloreux HOCl (Apel et Hirt 2004). Il est important de noter que tous les ROS ne sont pas forcément des radicaux libres causant des attaques radicalaires aux divers composants de l'organisme.

Les RNS sont représentés par le monoxyde d'azote ($\cdot\text{NO}$), le dioxyde d'azote (NO_2), le peroxydinitrite ($\text{ONOO}\cdot$) et de nombreux autres composés dérivés de le monoxyde d'azote, y compris l'anion nitroxyde, le cation nitrosonium, les oxydes d'azote supérieurs, les S-nitrosothiols et les complexes dinitrosylferreux (Fubini et Hubbard 2003; Martínez et Andriantsitohaina 2009). D'autres éléments peuvent être impliqués dans le stress oxydant comme le carbone (Bild et al. 2013), le soufre (Jacob 2006) ou les composés halogénés tels que le chlore (« The Negative Health Effects of Chlorine - Hattersley » s. d.).

3.1.2.1 Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Comme évoqué précédemment, en parallèle de l'oxydation phosphorylante, la chaîne respiratoire mitochondriale favorise également la formation de ROS. Les mitochondries sont considérées comme étant la principale source de ces dérivés (Murphy 2009; Zorov, Juhaszova, et Sollott 2014) (Figure 17). Dans les organismes vivants en conditions aérobies, plus de 90% de l'oxygène consommé est réduit directement en eau par la cytochrome oxydase de la chaîne de transport d'électrons située au niveau de la membrane mitochondriale interne. La réduction tétravalente impliquée se résume par la formule : $\text{O}_2 + 4 e^- + 4 \text{H}^+ \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O}$ (Grivennikova et Vinogradov 2013). Les 10% résiduels sont réduits par les oxydoréductases mitochondriales suite à l'interaction avec un seul électron, entraînant la conversion de l'oxygène moléculaire en un radical libre, l'anion superoxyde O_2^- , par la réaction : $\text{O}_2 + 1 e^- \rightarrow \text{O}_2^-$. En conditions physiologiques, le faible pourcentage d'électrons impliqués dans ces réactions est dû à une fuite prématurée au niveau de la chaîne respiratoire. Une étude *in vitro* sur des mitochondries isolées a montré que 1 à 3% de l'oxygène consommé est dirigé vers la production radicalaire. Cependant, *in vivo*, ce pourcentage semble réduit à environ 0,4 à 0,8% (Alberto Boveris et Chance 1973; Brand et al. 2004). Les complexes I et III présentent un rôle majeur dans cette fuite d'électrons (Valko et al. 2007). Une des principales sources d' O_2^- est le cytochrome c qui accepte les électrons issus du complexe III (Han, Williams, et Cadenas 2001). L' O_2^- produit au niveau de ce complexe est libéré dans l'espace intermembranaire d'où il peut rejoindre le cytosol via le canal anionique voltage-dépendant (VDAC) (Muller, Liu, et Van Remmen 2004). L'inhibition des complexes I et III favorise la production d' H_2O_2 et d' O_2^- (Jensen 1966; Forkink et al. 2015) en raison de la localisation du site d'action des inhibiteurs sur les complexes.

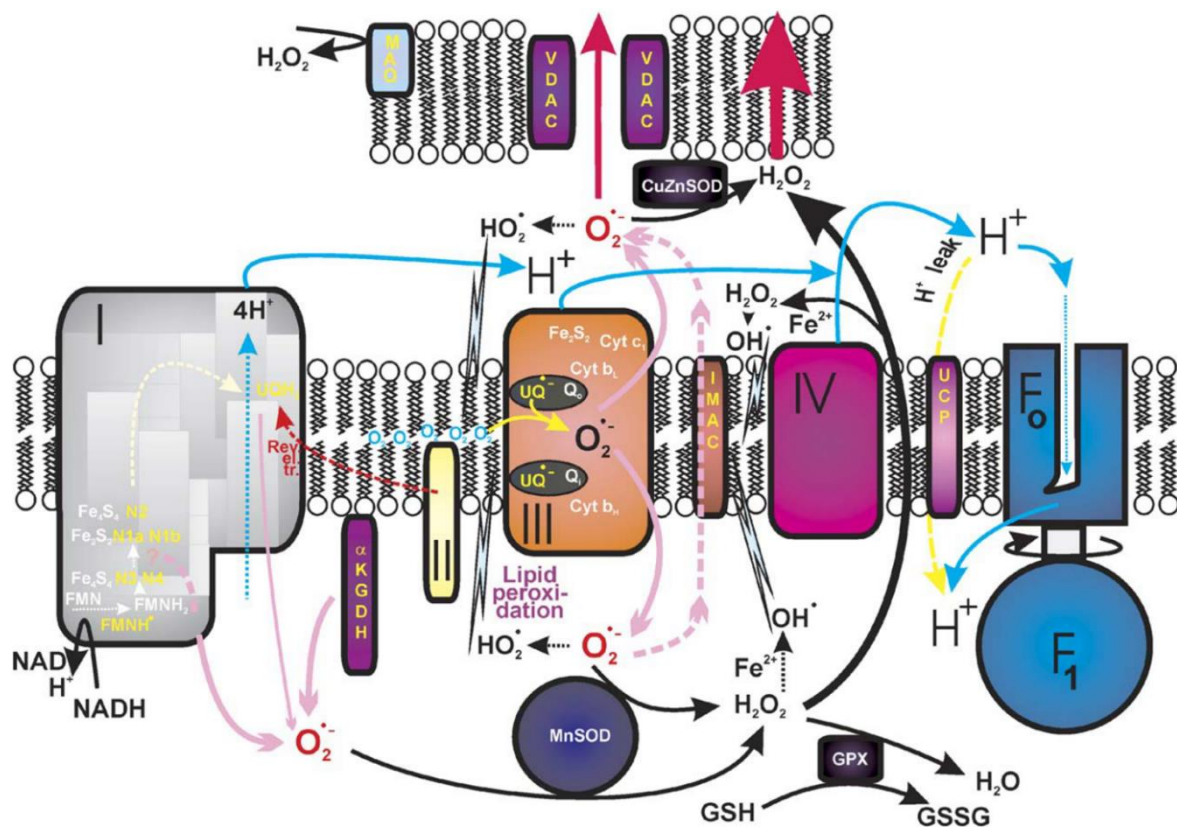


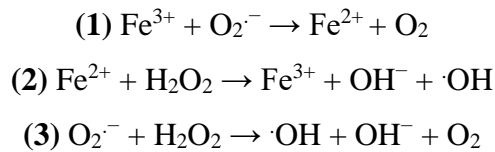
Figure 17: Principales sources et voies de détoxification des ROS au niveau mitochondrial. Dans les mitochondries, le complexe I relargue l' $O_2^{\cdot-}$ dans la matrice tandis que le complexe III libère l' $O_2^{\cdot-}$ des deux côtés de la membrane interne. Le canal anionique de la membrane interne (IMAC) ouvert peut transférer l' $O_2^{\cdot-}$ de la matrice vers l'espace intramembranaire. Environ 1% de l' $O_2^{\cdot-}$ est hydraté en HO_2^{\cdot} . Le reste est dismuté en H_2O_2 par la Mn-SOD dans la matrice ou la CuZn-SOD dans l'espace intermembranaire. Une quantité infime d' H_2O_2 est convertie en radical hydroxyle ($\cdot OH$, notamment par la réaction de Fenton catalysée par le Fe^{2+}). Les deux radicaux les plus hautement réactifs, HO_2^{\cdot} et $\cdot OH$, en plus de réagir avec les protéines et avec l'ADN mitochondrial, initient la peroxydation lipidique. La principale contribution mitochondriale aux ROS cytosoliques est apportée par l' H_2O_2 qui échappe à la détoxification par la GPx matricielle et par l' $O_2^{\cdot-}$ résiduel qui peut pénétrer dans le cytosol par la porine (VDAC). La monoaminoxydase fournit également une source supplémentaire importante de ROS en fonction des substrats disponibles. (Source : d'après Jezek et Hlavatá, Int J Biochem Cell Biol., 2005)

D'autres acteurs mitochondriaux sont également impliqués dans la production d' $O_2^{\cdot-}$ et de H_2O_2 : la glycérol-3-phosphate déshydrogénase, le système ETFQoR, la pyruvate-déshydrogénase et la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (Brand 2010). L' $O_2^{\cdot-}$ est aussi synthétisé par la famille des NOX situées au niveau des cellules vasculaires endothéliales (Griendling, Sorescu, et Ushio-Fukai 2000; Geiszt et Leto 2004; H. S. Park et al. 2004). D'autres voies de production de l' $O_2^{\cdot-}$ existent suite à une auto-oxydation de l'oxygène en présence de neuromédiateurs (adrénaline, noradrénaline dopamine), de groupements thiols, de

coenzymes réduits comme la flavine mononucléotide FMN_{H2}, de la FADH₂, ou encore de la détoxification de xénobiotiques via les cytochromes P450 situées au niveau du réticulum endoplasmique (Halliwell 2012; Grivennikova et Vinogradov 2013). Une concentration trop importante d'O₂⁻ est responsable de dysfonctionnements mitochondriaux résultant de la dégradation de l'ADN matriciel, de la peroxydation lipidique, de l'inhibition de l'aconitase ou de l'altération de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire (Richter et al. 1995; Jezek et Hlavatá 2005). Une autre des conséquences majeures de l'excès de ROS au niveau mitochondrial est l'ouverture du pore de transition de perméabilité (PTPm) qui entraîne une fuite du contenu matriciel et donc une baisse de l'oxydation phosphorylante. L'ouverture de ce pore favorise également le transfert de calcium de part et d'autre de la membrane mitochondriale interne, en fonction du gradient de concentration du cation. Le calcium matriciel est également un élément impactant le PTPm et la fonction mitochondriale en général (Bernardi et al. 2015; Briston et al. 2017). Par dismutation spontanée ou par détoxification grâce à la SOD, l'O₂⁻ est réduit par réaction avec 1 e⁻ et 2 H⁺, ce qui conduit à la formation d'H₂O₂ (Murphy 2009).

L'H₂O₂ matriciel participe à l'homéostasie calcique de la cellule. En effet, il provoque l'oxydation des nucléotides pyridiniques mitochondriaux et stimule ainsi spécifiquement la libération de Ca²⁺ hors des mitochondries intactes. En revanche, un taux plus élevé d'H₂O₂ conduit à la libération puis au re-captage excessive de Ca²⁺, favorisant alors la mort cellulaire (Richter et al. 1995). Contrairement à l'O₂⁻ qui est hydrophile et donc incapable de diffuser à travers les membranes lipidiques, l'H₂O₂ est lipophile ce qui lui permet de s'extruder hors de la matrice mitochondriale afin de se retrouver dans le cytosol où il peut participer au stress oxydant cellulaire en cas d'excès (Kajiyama et al. 2001). Au niveau de la cellule, les peroxisomes représentent également une source importante d'H₂O₂. Le dysfonctionnement de ces organites peut accroître la libération d'H₂O₂ dans le cytosol et participer au stress oxydant (Boveris, Oshino, et Chance 1972). La lipooxygénase et les myéloperoxydase sont de même des sources de ROS impactant la santé cardiovasculaire (Sugamura et Keaney 2011). La xanthine oxydase, une enzyme impliquée dans la formation de l'acide urique, constitue également une source d'O₂⁻ et d'H₂O₂ et représente une autre cible dans le traitement des maladies cardiovasculaires (Lastra et al. 2017; Schuchardt et al. 2017). Les macrophages sont également une source d'O₂⁻ au niveau de l'organisme (Pabst et Johnston 1980). La toxicité principale de l'H₂O₂ provient de sa capacité à générer le radical hydroxyle HO[•] par réaction avec des cations métalliques comme l'ion cuivre Cu⁺ ou l'ion ferreux Fe²⁺. Ce processus est appelé la réaction de Fenton :

$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{HO}\cdot + \text{Fe}^{3+} + \text{HO}^-$ (Griendling, Sorescu, et Ushio-Fukai 2000). La combinaison de l' H_2O_2 et de l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ peut également conduire à la formation de $\text{HO}\cdot$ à la suite de la réaction d'Haber-Weiss se déroulant en 3 étapes, dont la seconde est la réaction de Fenton :



Environ 0,3% de l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ cellulaire peut conduire à un radical peroxyde par protonation : l' $\text{HOO}\cdot$. Ce radical est impliqué dans la peroxydation lipidique (Aikens et Dix 1991). Parmi les ROS, HOCl est un agent du stress oxydant un peu particulier car il présente des effets bénéfiques. En effet, bien que connu pour ses propriétés pro-inflammatoires, il présente également selon les situations une capacité anti-inflammatoire en stimulant les monocytes et en favorisant la lutte contre les bactéries à Gram-négatif (Sam et Lu 2009; Gray, Wholey, et Jakob 2013; Chun-Ju Chen, Chen, et Ding 2016).

3.1.2.2 Les espèces réactives de l'azote (RNS)

Outre les ROS, les RNS jouent également un rôle important dans le stress oxydant (Figure 18). En tête de file, le $\cdot\text{NO}$ constitue un radical réactif abondant qui agit en tant que molécule oxydante de signalisation dans une grande variété de processus physiologiques comme la neurotransmission, la régulation de la tension artérielle, les mécanismes de défense, la relaxation musculaire lisse calcium-dépendante et la régulation immunitaire (Bergendi et al. 1999). Le monoxyde d'azote a une grande affinité pour les ions métalliques, ce qui explique son rôle de co-facteur de diverses enzymes. Beaucoup de ses effets physiologiques résultent de sa liaison initiale avec le Fe^{2+} présent dans l'enzyme guanylate cyclase soluble, comme l'ont démontré chez le rat White et coll. en 1976 (White et al. 1976). Le NO, principalement produit par la eNOS, stimule également la biogenèse mitochondriale grâce à l'induction du co-activateur 1α du récepteur γ activé par le proliférateur du peroxisome (PPAR γ) (PGC- 1α) (Nisoli et al. 2003).

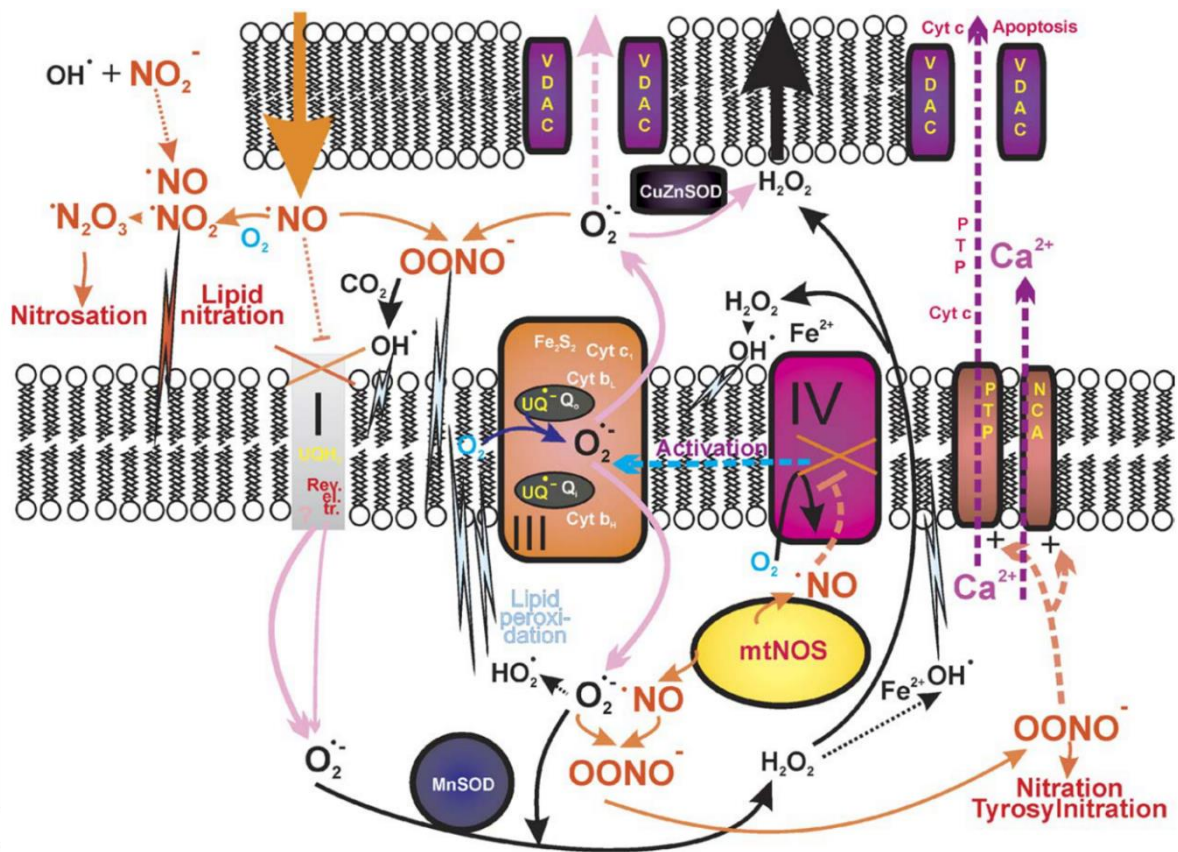


Figure 18 : Principales sources et destinées des RNS au niveau mitochondrial. Le $\cdot\text{NO}$ formé par les trois isoformes de synthase à monoxyde d'azote (NOS) diffuse facilement dans les mitochondries (flèche orange). Le $\cdot\text{NO}$ issu de la NOS mitochondriale peut inhiber directement, réversiblement et de façon compétitive la cytochrome c oxydase mitochondriale (complexe IV). Ce faisant, la production d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ dans la chaîne respiratoire est accrue en raison d'une modification de l'état redox de l'enzyme. Le $\cdot\text{NO}$ peut également inhiber le complexe I. Il peut réagir avec l'oxygène et induire une cascade de réactions. En se combinant avec l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ lors d'un processus contrôlé par diffusion, il produit du peroxynitrite (OONO^-) en équilibre avec OONO^\cdot , pKa 6,8, demi-vie 0,9 s) qui peut réagir avec le CO_2 , les lipides ou autres composés pour produire un radical hydroxyle $\cdot\text{OH}$. Le peroxynitrite lui-même initie la peroxydation des lipides, inhibe les complexes I, II et IV, l'ATP synthase, l'aconitase, la créatine kinase et même la MnSOD. Lorsque les formations de $\cdot\text{NO}$ et d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ sont accrues, les peroxynitrites libérés modifient les mécanismes de phosphorylation oxydative et l'homéostasie calcique, induisant notamment un efflux de Ca^{2+} hors des mitochondries via le pore de transition perméabilité (PTP). Le phénomène provoque alors une libération de cytochrome c et d'autres facteurs apoptotiques dans le cytosol, ce qui conduit à la mort programmée des cellules. Alternativement, le peroxynitrite peut induire un flux de Ca^{2+} issu de la matrice mitochondriale via l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. (Source : d'après Jezek et Hlavatá, Int J Biochem Cell Biol., 2005)

En réagissant avec l' O_2^- , le $\cdot NO$ conduit à la formation de peroxynitrite $ONOO^-$. Ce dernier et l'acide peroxynitrique ($ONOOH$) peuvent participer directement aux réactions d'oxydation qui sont fortement dépendantes du pH (Pryor et Squadrito 1995; Santiano et Francisco 2004). Les peroxynitrites peuvent favoriser l'oxydation de cofacteurs par des mécanismes directs ou dépendants des radicaux libres. La synthase à monoxyde d'azote (NOS) existe sous différentes formes dans l'organisme : neuronale (nNOS), endothéliale (eNOS) et inducible (iNOS). Malgré son nom, la première constitue la forme la plus abondante dans le cœur et les muscles squelettiques (Xuan et al. 2000; Förstermann et Sessa 2012; Simon et al. 2014). L' $ONOO^-$ favorise l'oxydation de la tétrahydrobioptérine, cofacteur essentiel de la NOS, en quinonoïde 5,6-dihydrobioptérine (puis en 7,8-dihydrobioptérine) entraînant alors le découplage de la NOS. Il a été proposé que de faibles niveaux de tétrahydrobioptérine peuvent ensuite favoriser la destruction de l'enzyme parallèlement à la formation d' $ONOO^-$ (Milstien et Katusic 1999). Ce mécanisme pourrait contribuer au dysfonctionnement endothélial vasculaire induit par le stress oxydant dans diverses pathologies. L' $ONOO^-$ conduit également à de nombreuses altérations suite à la nitrotyrosination des protéines impliquées dans les différentes fonctions de l'organisme. La mesure des résidus tyrosines nitrosylés constituent d'ailleurs une méthode d'évaluation du degré de dommages induits par le stress oxydant lié aux RNS (Yang, Zhang, et Pöschl 2010).

3.1.3 Les systèmes antioxydants endogènes

Afin de maintenir l'homéostasie cellulaire et de lutter contre le stress oxydant en situations d'agressions, l'organisme possède divers systèmes antioxydants (Figure 19). La majorité sont des enzymes représentés par la SOD, la peroxydase à glutathion (GPx ou GPX) et la catalase. Il existe un autre acteur non-enzymatique important : le glutathion.

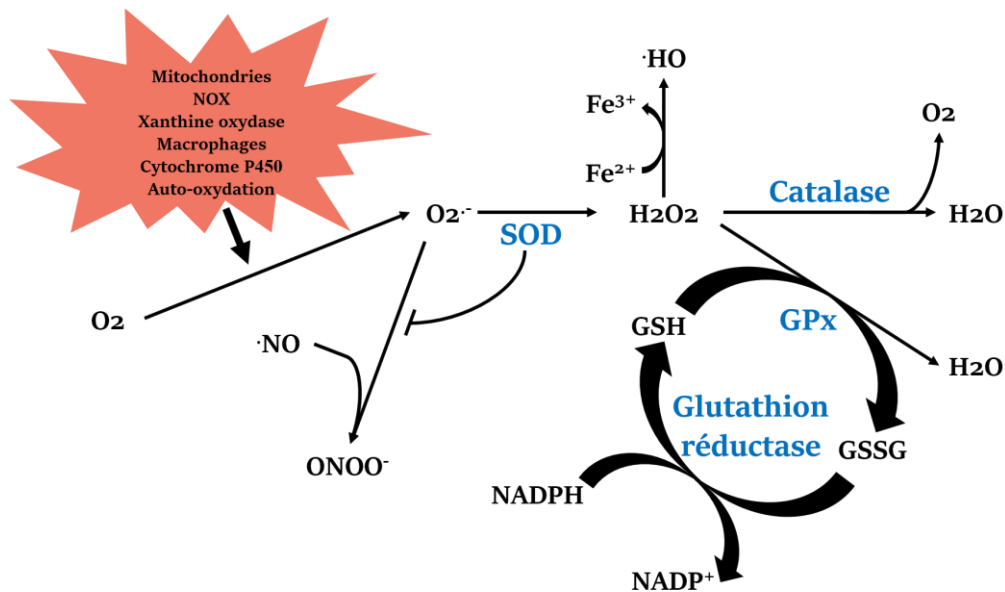
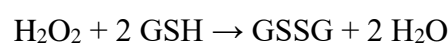


Figure 19 : Schéma simplifié non exhaustif des systèmes endogènes de lutte contre le stress oxydant. NOX : NADPH oxydase ; O₂ : dioxygène ; O₂^{•-} : anion superoxyde ; NO : radical monoxyde d'azote ; ONOO⁻ : peroxydinitrite ; H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène ; HO[•] : radical hydroxyle ; Fe³⁺ : ion ferrique ; Fe²⁺ : ion ferreux ; H₂O : eau ; GSH : glutathion réduit ; GSSG : glutathion oxydé ; GPx : peroxydase à glutathion ; NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit ; NADP⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydé , SOD : dismutase des superoxydes. (Source : Thibault Leger)

La SOD (EC 1.15.1.1) est le principal mécanisme de détoxification de l'O₂^{•-} et de l'ONOO⁻. Elle catalyse la réaction suivante : $O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2 H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$. La famille des SOD présente 3 membres chez les mammifères : les SOD 1, 2 et 3 (McCord et Fridovich 1969; Fukai et Ushio-Fukai 2011). La SOD1 est aussi appelée Cu-Zn-SOD car elle possède 2 noyaux cuivre (Cu²⁺) au niveau de son centre catalytique et 2 ions zinc (Zn²⁺) favorisant la stabilité de son homodimérisation. En effet, la SOD1 est active sous forme d'homodimère de 32 kDa. Elle est localisée majoritairement dans le cytosol de la cellule mais également au niveau de l'espace inter-membranaire de la mitochondrie ou encore dans le noyau de la cellule, les lysosomes ou les peroxysomes. La SOD2, ou Mn-SOD, présente à l'image de sa sœur un cofacteur métallique au niveau de sa zone catalytique correspondant à un ion manganèse (Mn³⁺). Sa forme active est un homotétramère formant un complexe de 96 kDa. Cette enzyme est localisée uniquement au niveau de la matrice mitochondriale où elle présente un rôle majeur dans la protection des mitochondries en transformant l'O₂^{•-} hydrophile en H₂O₂ lipophile pouvant s'exporter vers le cytosol. Cette réaction procure un avantage majeur aux mitochondries en limitant les dégâts dans ces organites grâce à l'élimination de l'O₂^{•-}. De plus, ce mécanisme restreint la possibilité de formation de ONOO⁻. Une fois dans le cytosol, les H₂O₂

en excès peuvent inactiver la SOD1 (Hink et al. 2002). La SOD3 est aussi nommée EC-SOD du fait de sa localisation au niveau extracellulaire : dans les matrices, les fluides et à la surface des cellules. Sa forme active est formée par un homotétramère de 135 kDa. Elle possède les mêmes noyaux métalliques que la SOD1 qui jouent chacun les rôles identiques. Bien que la fonction des SOD soit relativement similaire, seuls les gènes des SOD 1 et 2 présentent un élément de régulation de la transcription du facteur nucléaire kappa B (NF-κB) chez l'Homme et chez la souris (Zelko, Mariani, et Folz 2002). La stimulation de l'expression de ces enzymes anti-oxydantes dans une situation inflammatoire survient suite à l'activation de la voie NF-κB et à la libération de cytokines pro-inflammatoires, en particulier du facteur de nécrose tumorale alpha (TNFα) (Maehara, Hasegawa, et Isobe 2000; Morgan et Liu 2011).

La GPx (EC 1.11.1.9 et EC 1.11.1.12) est le nom global d'une famille de sélénoprotéines enzymatiques dont l'activité dépend de la disponibilité en sélénium (Kipp 2017). Elles catalysent la réduction de l'H₂O₂ ou d'hydroperoxydes organiques avec du glutathion réduit (GSH) comme donneur d'électron afin d'obtenir l'eau ou l'alcool correspondant et du glutathion sous forme oxydée (GSSG). La réaction est la suivante :



Dans les tissus des mammifères, il existe quatre isozymes GPx majeures dépendantes du sélénium : la GPx classique (GPx1) localisée dans les globules rouges, le foie, les poumons et les reins ; la GPx gastro-intestinale (GPx2) ; la GPx plasmatique (GPx3) présente dans différents organes comme les reins, les poumons, l'épididyme, le canal déférent, le placenta, les vésicules séminales, le cœur et le muscle ; et la dernière, la GPx des phospholipides hydroperoxydés (GPx4 ou PHGPx4), est également largement distribuée dans différents tissus (Margis et al. 2008). Les GPx1, 2 et 3 sont actives sous la forme d'homotétramères, tandis que la GPx4 est fonctionnelle en tant que monomère. Les GPx présentent des localisations subcellulaires diverses : GPx1 a été identifiée dans le cytosol, le noyau et les mitochondries ; GPx2 s'accumule dans le cytosol et le noyau ; GPx3 est une protéine sécrétée également présente dans le cytosol, tandis que GPx4 est présente dans le noyau, le cytosol, les mitochondries et aussi liée aux membranes. Deux autres isozymes ont été identifiées chez les mammifères qui apparaissent étroitement liées à la GPx3 : la GPx5 et la GPx6. La GPx5 sécrétée dans l'épididyme ne présente pas de sélénocystéine au niveau de son site actif. La GPx6 identifiée chez l'Homme et le porc représente une GPx sélénium-dépendante présente dans l'épithélium olfactif.

La catalase (EC 1.11.1.6) est une autre enzyme permettant l'élimination de l' H_2O_2 au niveau de la cellule où elle existe dans différents compartiments. Elle peut être retrouvée au niveau mitochondrial (mCAT), dans les peroxysomes (pCAT) et à l'intérieur du noyau (nCAT) (Dai et al. 2017). Cette enzyme est active sous forme d'un tétramère dont la masse moléculaire globale est d'environ 240 kDa. Il est constitué de quatre sous-unités identiques de 60 kDa ne contenant qu'un seul groupe ferriprotoporphyrine par sous-unité (Matés, Pérez-Gómez, et Núñez de Castro 1999). La catalase permet la transformation d' H_2O_2 en molécules d'eau et de dioxygène selon la réaction suivante : $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$. Chez les mammifères, l'altération de cette enzyme conduit non seulement à une détoxification moindre des ROS mais favorise aussi la production de ces formes radicalaires (Kirkman et Gaetani 2007).

Outre ces enzymes, le glutathion ou la γ -L-Glutamyl-L-cystéinyglycine (GSH sous sa forme réduite) joue également un rôle majeur dans l'homéostasie oxydative de l'organisme. Il s'agit de l'antioxydant thiol le plus abondant de la cellule. Le GSH est retrouvé au niveau de la cellule, des mitochondries et du noyau (Masella et al. 2005). Il est impliqué dans différentes voies biologiques comme l'élimination des composés électrophiles et des métaux potentiellement toxiques (protection vis-à-vis des produits toxiques de l'oxygène), la régulation de l'expression de gènes, les mécanismes de l'apoptose ou le transport membranaire (Anderson 1998; Hammond, Lee, et Ballatori 2001). L'un des rôles majeurs du GSH est de participer à la détoxification de l' H_2O_2 cellulaire via l'action de la GPx, ce qui conduit à la formation de sa forme oxydée (GSSG ou disulfure de glutathion). L'accumulation de GSSG dans la cellule provoque des altérations importantes par oxydation ce qui est constaté dans de nombreuses situations pathologiques telles que les maladies neurodégénératives, le diabète sucré, l'athérosclérose, l'inflammation, l'ischémie et les maladies rénales et hépatiques (Zeeshan et al. 2016). La mesure du rapport GSH/GSSG est un bon marqueur du niveau de stress oxydant cellulaire (Owen et Butterfield 2010). Un autre rôle du GSH est la régénération des molécules anti-oxydantes ingérées car non synthétisées par l'organisme. En effet, de nombreux antioxydants exogènes comme les tocophérols et les tocotriénols (également appelés vitamine E), l'acide ascorbique (ou vitamine C), les caroténoïdes réagissent avec les ROS. Après leur oxydation, ces micronutriments doivent être régénérés dans le milieu biologique. Cela nécessite des systèmes réducteurs non radicalaires comme les couples GSH/GSSG, dihydrolipoate/lipoate, NADPH/NADP⁺ et NADH/NAD⁺ (Sies, Stahl, et Sundquist 1992). Le NADPH sert aussi de cofacteur à la GSH

réductase dont le rôle est de réduire la GSSG en GSH (Huet et al. 2011). Il est également impliqué dans le système thiorédoxine composé du NADPH, de la thiorédoxine réductase (TrxR) et de la thiorédoxine (Trx) (Lu et Holmgren 2014). Ce système disulfure réductase peut fournir des électrons à diverses enzymes et s'avère important dans la synthèse d'ADN, la défense contre le stress oxydant et l'équilibre dithiol/disulfure. Il fournit les électrons aux peroxyrédoxines (Prx), des peroxydases thiol-dépendantes, pour éliminer les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote avec une vitesse de réaction rapide (Karlenius et Tonissen 2010). Son rôle dans la réparation de l'ADN et des protéines consiste à inhiber la ribonucléotide réductase et la méthionine sulfoxyde réductase mais aussi à réguler l'activité de nombreux facteurs de transcription sensibles au statut oxydant. De plus, le système Trx est fortement impliqué dans la réponse immunitaire, l'infection virale et la mort cellulaire. Dans les cellules de mammifères, il existe de manière ubiquitaire aux niveaux cytosolique (Trx1 et TrxR1) et mitochondrial (Trx2 et TrxR2). Le système glutathione-glutarédoxine composé de NADPH, de glutathion réductase, de GSH et de glutaredoxine contribue également à l'homéostasie du statut oxydant cellulaire (Lu et Holmgren 2014; Zhang et al. 2017). Récemment, les systèmes de thiorédoxine et de glutathion des mammifères se sont révélés capables de se fournir mutuellement des électrons et de servir ainsi de système de secours les uns vis-à-vis des autres (Figure 20). Une étude a mis en évidence que la TrxR2 permet de maintenir un faible flux d'H₂O₂ dans des mitochondries cardiaques isolées de cobayes (Stanley et al. 2011). En effet, le blocage de l'activité de cette enzyme par un de ses inhibiteurs comme l'auranofine favorise la production de ROS et notamment d'H₂O₂.

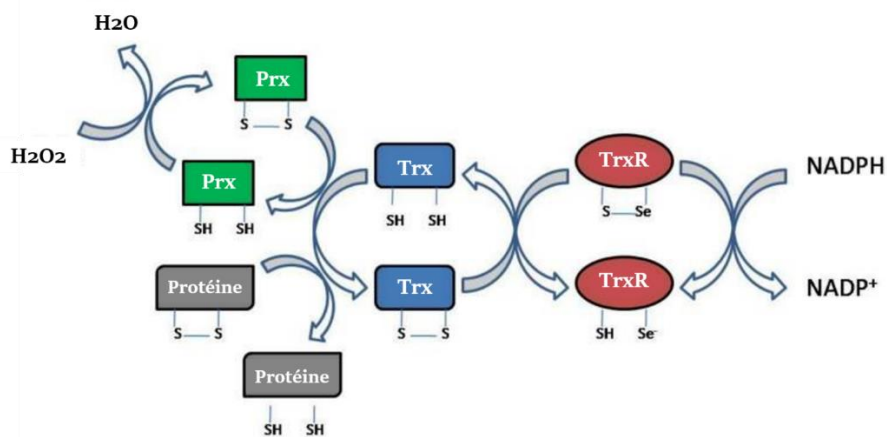


Figure 20 : Schéma simplifié non exhaustif du système thiorédoxine et son implication dans la lutte contre le stress oxydant. H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène ; H₂O : eau ; Prx : peroxyrédoxine ; Trx : thiorédoxine ; TrxR : thiorédoxine réductase ; NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit ; NADP⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydé ; S-S : groupement disulfure ; SH : groupement thiol, Se : sélénium. (Source : d'après Karlenius et Tonissen, Cancers, 2010)

3.2 Maladies cardiovasculaires et relations avec le stress oxydant

Depuis maintenant plusieurs décennies, Harman a démontré que le stress oxydant s'installe au cours du vieillissement (Harman 1956). Cependant, de nombreuses autres situations physiopathologiques sont associées à ce phénomène telles que le cancer (Chikara et al. 2018), des situations infectieuses comme le sepsis ou l'endocardite aiguë (Prauchner 2017), des atteintes au niveau cérébral (McGinnis 2004; Zhang et Butterfield 2017), l'obésité, le diabète et les maladies cardiovasculaires (Karam et al. 2017; Cervantes, Llanas-Cornejo, et Husi 2017). La catalase est une enzyme clé dans le métabolisme de l' H_2O_2 et des RNS. Or, l'expression et la localisation de ses isoformes sont sensiblement modifiées dans les situations cancéreuses, influant alors sur la prolifération cellulaire (Glorieux et Calderon 2017). Des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation, l'acétylation, la nitration, la glycation ou la glutathionylation peuvent toucher les SOD conduisant majoritairement à l'inhibition de leur activité (Yamakura et Kawasaki 2010). Cela peut même favoriser l'émergence de conséquences délétères, comme le maintien d'un fort stress oxydant ou l'induction de l'apoptose dans de nombreuses situations pathologiques dont les maladies cardiovasculaires (Batinic-Haberle et al. 2014; Banks et Andersen 2019). Dans des conditions inflammatoires, il a été constaté que l'hyper acétylation de la SOD2 sur les lysines en positions 68 et 122 (K68 et K122) inhibe son activité. Ce phénomène peut être anihilé par l'action de la sirtuine 3 (Sirt3) au niveau mitochondrial (Dikalova et al. 2017). L'étude de Dikalova montre également qu'un déficit en Sirt3 efficiente favorise la surproduction d' O_2^- et le stress oxydant au niveau endothélial.

La Sirt3 appartient à une famille de déacétylases NAD^+ -dépendantes dont 7 isoformes sont connues chez l'Homme à l'heure actuelle : les sirtuines (Sirt) (Singh et al. 2018). Les Sirt 1, 2, 6 et 7 sont retrouvées au niveau du cytosol alors que les Sirt 3, 4 et 5 sont localisées dans les mitochondries. Historiquement, ces enzymes ont été découvertes en tant qu'histones déacétylases (HDAC), mais il a été constaté ultérieurement qu'elles ciblaient également d'autres protéines de l'organisme (Imai et al. 2000). Elles participent activement à l'équilibre oxydatif de l'organisme et présentent donc un intérêt majeur dans les maladies cardiovasculaires. Les Sirt 1 à 7 modulent le niveau de ROS et le stress oxydant cellulaire, l'activité des enzymes anti-oxydantes, la réparation de l'ADN, les dysfonctionnements mitochondriaux et le métabolisme énergétique grâce à des facteurs de transcription clés

tels que NRF2, p53, NF-κB, FOXO, le cytochrome c et la PGC-1α (Figure 21). Les Sirt1 et 2 sont connues pour déacétyler FOXO3a induisant alors des effets antioxydants en modulant l'activité de la SOD2 et de la catalase (Brunet et al. 2004; Wang et al. 2007). La Sirt2 impacte les enzymes de la glycolyse en agissant sur la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) et la phosphoglycérate mutase (PGAM2). La Sirt1 module également le métabolisme énergétique en activant par déacétylation le PGC-1α, facteur favorisant la β-oxydation, réduisant la glycolyse et stimulant la biogenèse mitochondriale. PGC-1α est d'ailleurs connu pour son implication dans la physiopathologie cardiovasculaire (Finck et Kelly 2007). Il est cependant nécessaire de noter que la Sirt4 favorise la présence des ROS dans les mitochondries en inhibant la SOD2 dans le cas de l'hypertrophie cardiaque angiotensine II-dépendant (Luo et al. 2017).

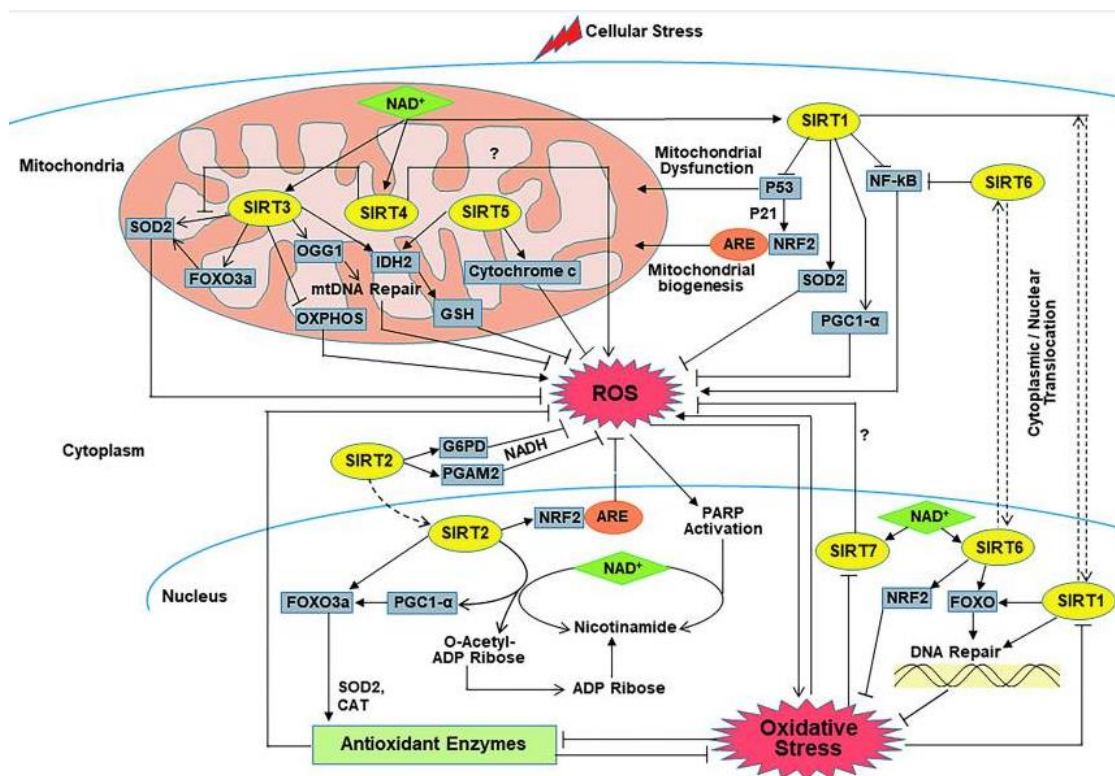


Figure 21 : Illustration de l'implication des sirtuines dans l'équilibre oxydatif de la cellule.

Les points d'interrogation (?) indiquent que le mécanisme exact est inconnu. Lorsque les cellules sont stressées, la production de ROS augmente et la coenzyme NAD⁺ (diamant vert) active diverses sirtuines (ovales jaunes). De plus, les sirtuines régulent l'activité des éléments de réponse anti-oxydante (ARE) (ovales oranges) qui à leur tour modulent la transcription des gènes pro- et antioxydants pour maintenir les cascades de signalisations oxydatives. ADP : adénosine diphosphate ; CAT : catalase ; FOXO : classe O des facteurs de transcription des boîtes de tête de fourche ; G6PD : glucose 6-phosphate déshydrogénase ; NAD : nicotinamide adénine dinucléotide ; NF-κB : facteur nucléaire kappa B ; PARP1 : poly (ADP-ribose) polymérase 1 ; PGAM2 : phosphoglycérate mutase ; SIRT : sirtuine. (Source : Singh, Antioxid Redox Signal, 2018)

Au niveau mitochondrial, le phénomène d'acétylation peut s'avérer fortement délétère. En effet, il a été constaté que les souris KO pour le gène *Ndufs4* exprimant une protéine indispensable à la structure du complexe I présentent une respiration mitochondriale amoindrie et une insuffisance cardiaque (Karamanlidis et al. 2013). L'atteinte du complexe I s'accompagne également d'une baisse du rapport NAD^+/NADH inhibant l'activité de la Sirt3 : ceci conduit à l'hyperacétylation protéique au niveau des résidus lysine et favorise l'ouverture du PTPm. Ces effets sont en revanche compensés par une supplémentation en NAD^+ , cofacteur de la Sirt3. Une autre étude sur l'homologue de la Sirt3 des mammifères chez la drosophile, la dSirt2, a démontré une régulation de l'activité de l'ATP synthase par l'acétylation de sa sous-unité catalytique β (Rahman et al. 2014) : les mutants dSirt2 présentent un taux élevé d'acétylation des résidus lysine de la sous-unité β et une chute de l'activité de l'enzyme productrice d'ATP. En revanche, la surexpression de la déacétylase provoque l'effet inverse. Une étude récente sur des fibroblastes humains suggère qu'une déficience en complexe IV de la chaîne respiratoire s'accompagne d'une sous-expression des protéines Sirt 1, 3 et 4 associée à une concentration moindre en NAD^+ intracellulaire (Potthast et al. 2017). En revanche, l'action d'activateurs pharmacologiques des sirtuines comme le SRT1720 permet de retrouver un taux normal de ces enzymes. Ces études montrent l'importance des sirtuines sur le fonctionnement mitochondrial et la santé cardiovasculaire en lien avec le stress oxydant.

La réaction de l'organisme suite au stress oxydant induit par les maladies cardiovasculaires est à analyser au cas par cas. En effet, en fonction du niveau de stress oxydant observé, les conséquences sur le métabolisme diffèrent (Lushchak 2014). En situation de stress oxydant de faible intensité, l'organisme active la voie NRF2-Keap1, normalement inopérante dans les conditions physiologiques. L'activation de cette voie conduit à la fixation du facteur NRF2 au niveau des gènes comprenant l'élément de réponse antioxydant (ARE), ce qui favorise l'expression de facteurs antioxydants permettant une réponse adaptée de la part de l'organisme (Zhuang et al. 2014). Un stress oxydant d'intensité modérée stimule également l'inflammation par l'activation de la voie NF- κ B et des MAP kinases (MAPK). Il active aussi le facteur de transcription des protéines du stress (HSF) et favorise donc l'expression des protéines du stress (Hsp). Malgré cette réponse adaptative encore présente, des dommages cellulaires commencent à apparaître. En cas de stress oxydant sévère, les voies biologiques s'orientent vers une mort cellulaire par apoptose ou par nécrose en fonction de l'intensité du stress oxydant et de la disponibilité en ATP. L'un des principaux phénomènes impliqués

est l'ouverture exagérée du PTPm, conduisant à un déversement du contenu matriciel dans le cytosol et à la déficience énergétique mitochondriale. Ceci a été observé dans des cœurs post-ischémiques déficitaires en dystrophine comme dans la maladie de Duchenne ou encore chez des rats Zucker présentant un diabète de type II (Correa, Soto, et Zazueta 2007; Ascah et al. 2011; Riojas-Hernández et al. 2015).

3.2.1 L'implication de l'obésité et du diabète dans les maladies cardiovasculaires

La prévalence de l'obésité dans le monde occidental a considérablement augmenté au cours des deux dernières décennies (Flegal et al. 2012). Le critère principal pour définir l'obésité est l'indice de masse corporelle (IMC) calculé en divisant le poids corporel en kilogrammes par le carré de la taille en mètres (Arroyo-Johnson et Mincey 2016). L'IMC s'exprime donc en kg/m^2 . Une personne de poids normal présente un IMC compris entre 18,5 et 24,99 kg/m^2 . Un IMC inférieur classe le patient en insuffisance pondérale. Un IMC supérieur ou égal à 25 kg/m^2 caractérise les individus en surpoids. A partir d'un IMC égal à 30 kg/m^2 , les personnes sont classées dans une situation d'obésité qui peut être répartie en 3 sous-catégories : classe I ou modérée ($30 \text{ kg/m}^2 \leq \text{IMC} < 35 \text{ kg/m}^2$), classe II ou sévère ($35 \text{ kg/m}^2 \leq \text{IMC} < 40 \text{ kg/m}^2$) et classe III ou morbide ($\text{IMC} \geq 40 \text{ kg/m}^2$). Une classification de l'obésité par phénotype a également été définie par De Lorenzo pour la chirurgie bariatrique en fonction de critères complémentaires comme le pourcentage de masse grasse et divers paramètres sanguins : lipides circulants, insulinémie, glycémie et protéine C réactive qui est un marqueur de l'inflammation (De Lorenzo et al. 2016) (Figure 22). Un autre indicateur important de l'obésité et de la survenue de maladies cardiovasculaires est le rapport tour de taille/tour de hanche (Murray 2006).

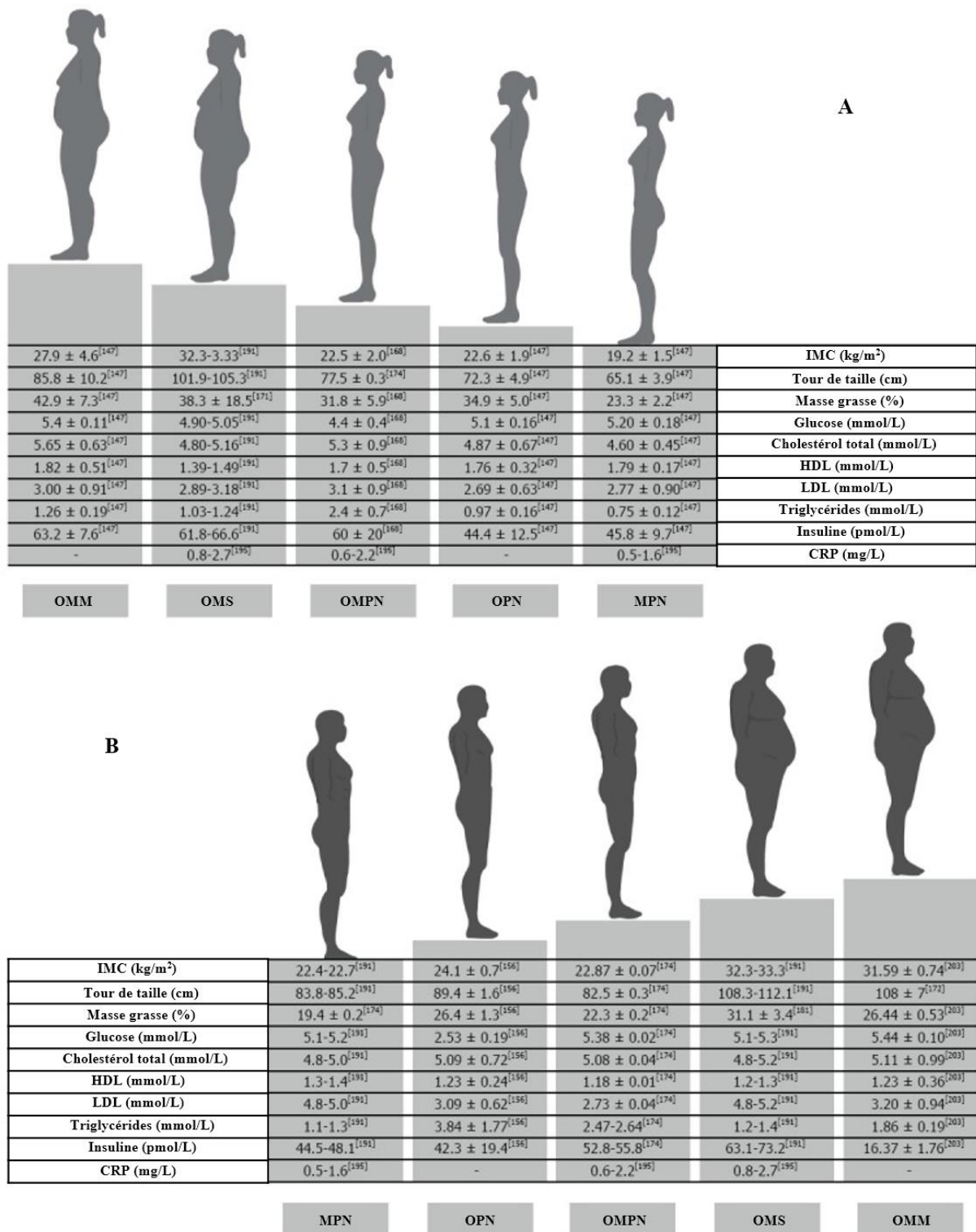


Figure 22 : Caractéristiques de 4 phénotypes de l'obésité chez la femme (A) et l'homme (B). MPN : mince de poids normal ; OPN : obèse de poids normal ; OMPN : obèse métabolique de poids normal ; OMS : obèse métaboliquement sain ; OMM : obèse métaboliquement malsain ; IMC : indice de masse corporelle ; HDL : lipoprotéine de haute densité ; LDL : lipoprotéine de basse densité ; CRP : protéine C réactive. (Source : d'après De Lorenzo, World J Gastroenterol., 2016)

L'obésité, en particulier l'obésité centrale ou abdominale, est fortement associée à l'apparition du syndrome métabolique et du diabète sucré de type 2 qui augmentent le risque de développer une maladie cardiovasculaire.

Le diabète est l'une des principales causes de mortalité dans le monde, avec un décès toutes les six secondes selon la Fédération Internationale du Diabète (FID). Le 8ème Atlas du diabète de la FID suggère que le diabète sucré concerne environ 425 millions de personnes dans le monde, soit 1 adulte sur 11, et ce nombre devrait atteindre près de 700 millions en 2045 (« IDF Diabetes Atlas - 2017 Atlas » s. d.). L'Organisation Mondiale de la Santé rapporte que le coût annuel international du diabète s'élève à plus de 827 milliards de dollars US. Il existe différents types de diabète, dont le diabète sucré est le principal. Il se présente sous deux formes majeures : le type 1 caractérisé par une déficience en insuline et le type 2 associé à un dysfonctionnement des voies liées à l'insuline. Le premier représente 6% des personnes diabétiques alors que le second concerne 92%. Le type 1 apparaît généralement tôt dans la vie des patients alors que le diabète de type 2 se développe plutôt tardivement. D'autres formes de diabète sont caractérisées par des cas plus spécifiques tels que le diabète gestationnel, le diabète néonatal, le diabète de maturité des jeunes ou le diabète auto-immun latent des adultes. Un nombre important de personnes atteintes de diabète ne sont toujours pas diagnostiquées, comme plus de 90% des cas de diabète monogénique (Thomas et Philipson 2015). La FID estime qu'un peu plus de 210 millions de personnes dans le monde souffrent de diabète non diagnostiqué ("IDF Diabetes Atlas - 2017 Atlas" n.d.). La Fédération Française des Diabétiques précise que plus de 4,2 millions de français étaient diabétiques en 2015 dont 700 000 non-diagnostiqués (« Les chiffres du diabète en France » s. d.). Le diabète augmente d'un facteur 2 à 4 le risque de cardiopathie. L'insuffisance cardiaque est associée à la mortalité de 65% des patients diabétiques et 16% des décès surviennent par arrêt cardiaque (« Cardiovascular Disease and Diabetes » s. d.).

3.2.1.1 L'obésité, sa transition vers un diabète de type 2 et la santé cardiovasculaire

L'obésité affecte la fonction cardiaque, entraînant une insuffisance cardiaque à long terme. La phase précoce accroît l'activité mécanique du myocarde, entraîne un enrichissement en ARA des phospholipides membranaires et une augmentation de la capacité vasodilatatrice

des micro-vaisseaux coronariens (Mourmoura et al. 2014). Cette stimulation de l'activité cardiaque s'accompagne d'une augmentation de la fonction mitochondriale. Cependant, ce statut est transitoire en cas d'augmentation du niveau de l'obésité voire de la transition vers un diabète de type 2. L'état pré-diabétique est caractérisé par une perturbation du métabolisme glucidique, l'installation d'une insulino-résistance et l'apparition de complications macro-vasculaires (Wang et al. 2016; Jia, DeMarco, et Sowers 2016) (Figure 23). Ces modifications s'accompagnent d'une hyperglycémie postprandiale.

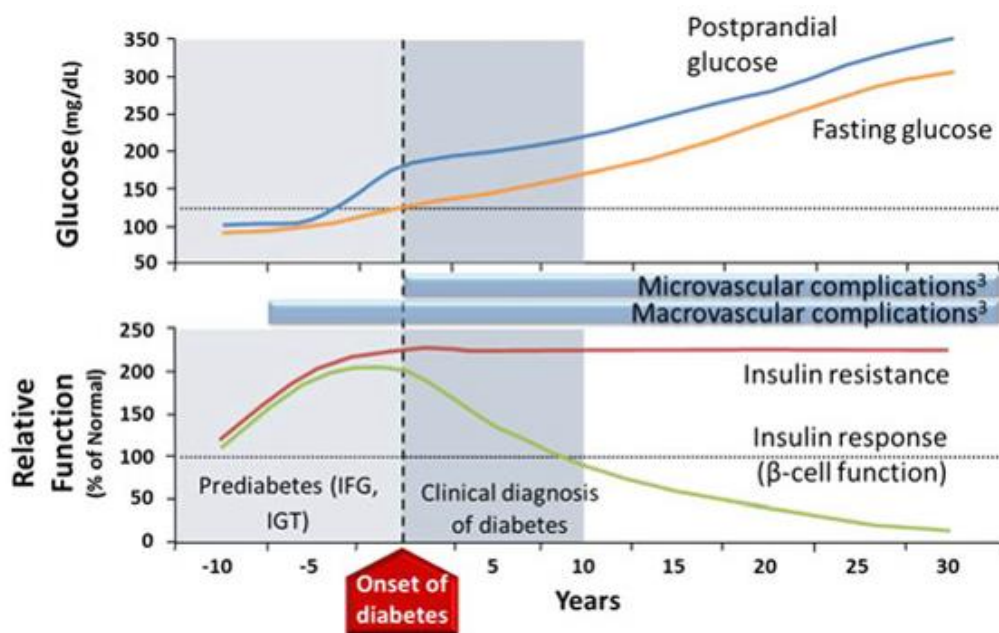


Figure 23 : Evolution du diabète. IFG : glycémie à jeun altérée (impaired fasting glucose) ; IGT : intolérance au glucose (impaired glucose tolerance). (Source : Wang, J Diabetes., 2016)

L'obésité est également caractérisée par une biodisponibilité insuffisante en NO suite à une atteinte de la eNOS et de sa neutralisation en réagissant avec les ROS et principalement l' O_2^- (Sansbury et Hill 2014). De plus, l'obésité s'accompagne de l'installation d'une inflammation suite à la hausse des acides gras non estérifiés (AGNE) et de cytokines pro-inflammatoires comme le $TNF-\alpha$ résultant de l'activation de la voie $NF-\kappa B$ au niveau des macrophages (Ouchi et al. 2012). La libération des cytokines pro-inflammatoires, suite à la stimulation de la voie $NF-\kappa B$ et la présence des acides gras libres dans la circulation, favorise une forte activation de l'enzyme JNK-1, caractéristique de l'obésité (Hirosumi et al. 2002). Sa présence augmente l'adiposité, le taux d'AGNE et favorise le développement d'une insulino-résistance. L'augmentation des acides gras libres circulants entraîne des phénomènes de lipotoxicité au niveau musculaire et hépatique. En plus d'entretenir l'inflammation, une altération du signal

insulinique s'installe alors conduisant à une surproduction d'insuline par les cellules β pancréatiques suite à l'insulino-résistance musculaire (Ye 2013). Une dysfonction des cellules β pancréatiques suite à la lipotoxicité, l'apparition de complications micro-vasculaires et l'insulino-résistance hépatique conduisent vers une hyperglycémie à jeun caractéristique de l'apparition du diabète de type 2. *A contrario*, le diabète de type 1 induit une diminution d'emblée du taux d'insuline qui justifie un état hyperglycémique responsable des complications (Boles, Kandimalla, et Reddy 2017).

3.2.1.2 L'hypoxie dans l'obésité

Une autre complication de l'obésité contribue au développement d'un diabète de type 2 : un état hypoxique chronique associé à une biodisponibilité réduite du monoxyde d'azote (Norouzirad, González-Muniesa, et Ghasemi 2017). Une surproduction de ROS active la sous-unité alpha du facteur induit par l'hypoxie (HIF-1 α) suite à une stimulation de la voie NF-kB en situation hypoxique (Bonello et al. 2007; Jung et al. 2008). En conditions normoxiques, HIF-1 α est situé dans le cytosol où il subit une dégradation protéasome-dépendante. En situation d'hypoxie, il se fixe à la sous-unité bêta du facteur induit par l'hypoxie (HIF-1 β) formant ainsi le facteur induit par l'hypoxie (HIF-1). Ce dernier est alors adressé dans le noyau où il active ses gènes cibles impliqués dans le métabolisme du glucose, l'inflammation et l'insulino-résistance (Warbrick et Rabkin 2019). L'obésité et le syndrome métabolique sont caractérisées par une augmentation de la graisse épigardique stimulant l'expression de HIF-1 α . HIF-1 α stimule la différenciation des macrophages en des macrophages M1 pro-inflammatoires. Ce phénomène est par exemple rencontré dans une situation d'insuffisance cardiaque avec fraction d'éjection préservée associée à l'obésité et au syndrome métabolique. Les macrophages M1 libèrent alors l'interleukine 6 (IL-6), la protéine chimio-attractante 1 des monocytes (MCP-1), le TNF- α et l'interleukine 1 β (IL-1 β) avec une expression accrue de thrombospondine, du pro-collagène α 2, du facteur de croissance transformateur β , de la NADPH oxydase et du facteur de croissance des tissus connectifs CTGF (Warbrick et Rabkin 2019). Ces facteurs favorisent la fibrose tissulaire et l'altération de la fonction cardiaque : la présence des macrophages M1 pro-inflammatoires entraîne en effet un accroissement de la demande métabolique dans le tissu adipeux, caractérisé par une hausse du métabolisme glycolytique, et une inflammation au niveau vasculaire provoquant une hypoxie tissulaire (Boutens et al. 2018). L'inhibition de l'expression de HIF-1 α par la

metformine dans le tissu adipeux chez le rongeur nourri avec un régime riche en graisses supprime la fibrose et réduit l'inflammation du tissu adipeux (Li et al. 2016). Outre la modification du métabolisme énergétique dans les macrophages suite à l'hypoxie et à l'induction de HIF-1 α , il a également été constaté qu'une hypoxie infligée à des rats Wistar induit une augmentation de l'oxydation du pyruvate et une baisse de la β -oxydation, ce qui traduit par une expression ralentie de la pyruvate déshydrogénase kinase 4 (PDK4) et de la CPT1 (Essop et al. 2004). Dans cette étude, l'hypoxie s'accompagne d'une baisse de l'expression de la protéine découplante 3 (UCP3) des mitochondries qui est associée à une baisse de la respiration mitochondriale et de la production d'ATP sans découplage énergétique apparent.

Le découplage mitochondrial correspond à la fuite de H⁺ de l'espace intermembranaire vers la matrice mitochondriale. Il ne conduit pas à une synthèse d'ATP mais à une production de chaleur. Physiologiquement, ce phénomène existe et il permet d'éviter l'accumulation de H⁺ dans l'espace intermembranaire qui engendrerait une surproduction des ROS par la chaîne respiratoire. Dans des situations de stress ou d'altérations de l'ATP synthase, les H⁺ s'accumulent ce qui accroît fortement le gradient électrochimique ($\Delta\Psi + \Delta\text{pH}$) stimulant alors la production de ROS et les altérations mitochondriales. Les protéines découplantes (UCP) permettent de prévenir ce phénomène en réintégrant ces protons dans la matrice mitochondriale (Akhmedov, Rybin, et Marín-García 2015). L'UCP1 a été la première découverte et se situe dans le tissu adipeux. Au niveau cardiaque, les isoformes présentes sont l'UCP2 et l'UCP3. La délétion génétique d'UCP3 favorise le dysfonctionnement mitochondrial, augmente la production de ROS et induit l'apoptose des cardiomyocytes dans l'hypoxie *in vitro* et le cœur ischémique (Perrino et al. 2013). Une surexpression d'UCP2 favorise la mitophagie et protège les cardiomyocytes dans l'ischémie/reperfusion (Wu et al. 2019). Les UCP semblent donc impliqués dans la santé cardiovasculaire.

3.2.1.3 Le diabète sucré, le stress oxydant et le système cardiovasculaire

En 1993, le Diabetes Control and Complications Trial Research Group a observé que la prévention de l'hyperglycémie dans le diabète sucré limite le développement de ses complications (Diabetes Control and Complications Trial Research Group et al. 1993).

Des glycémies élevées chez les patients après chirurgie et placés en soins intensifs contribuent à la lésion de plusieurs organes comme les reins ou le cœur (Van den Berghe 2004; Ouattara et al. 2005). L'hyperglycémie chronique augmente l'hémoglobine glyquée (HbA1c) et favorise le développement d'une insuffisance cardiaque chez plus de 30% des patients (Jia, Whaley-Connell, et Sowers 2018). La résistance à l'insuline et l'hyperglycémie qui est induite sont associées au stress oxydant et à l'inflammation (Bagi 2009) qui affectent les vaisseaux et provoquent l'athérosclérose (Hashimoto et al. 1998; Kapiotis et al. 2006). L'hyperglycémie chronique est l'une des causes principales du développement et de l'entretien du stress oxydant qui est à son tour responsable des complications notamment cardio-vasculaires chez les diabétiques (Giacco et Brownlee 2010).

L'insuffisance cardiaque chez le patient diabétique survient inexorablement en raison du développement progressif de l'insulino-résistance, de l'hyperglycémie et du stress oxydant (Habbout et al. 2013). On sait que l'inflammation favorise l'installation d'un stress oxydant tissulaire et vice versa. Ainsi, ces 2 paramètres impliqués dans de nombreuses complications physiopathologiques s'auto-alimentent (Biswas 2016). Une des principales atteintes protéiques produites en situation de stress oxydant consiste en la carbonylation des protéines. Ce phénomène a été prouvé comme délétère au niveau cardiaque dans le cadre d'un diabète de type I (Dennis et al. 2013). Dans le diabète sucré en général, l'inflammation suite à l'activation de la voie NF- κ B est impliquée dans de nombreuses maladies cardiovasculaires (Aragno et al. 2006; Gordon, Shaw, et Kirshenbaum 2011). Il est également connu que la déshydratation induite par l'hyperglycémie dans le cadre du diabète peut favoriser la glycation et l'apparition des produits de fin de glycation conduisant à des altérations aux niveaux cardiaque, vasculaire et rénal (Guillet 2010; Dali-Youcef 2010). Les patients diabétiques développent souvent des perturbations électrolytiques comme l'acidocétose diabétique ou le syndrome hyperosmolaire hyperglycémique non cétosique qui entraînent des variations des ions sodium, potassium, magnésium, phosphate et calcium (Ahn, Kang, et Jeung 2017). Dans le diabète de type 1, les cellules β pancréatiques diminuent et subissent également un appauvrissement en Ca^{2+} dans le réticulum endoplasmique. Dans le diabète de type 2, la concentration calcique intra-réticulaire est également appauvrie favorisant l'apparition d'un stress. Dans une étude récente sur des cœurs de rats rendus diabétiques par la streptozotocine, l'épuisement du calcium réduit l'expression des canaux calciques comme l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ NCX1 (Zhang et al. 2019). La relation entre NCX1 et NHE1 dans le métabolisme calcique a été mise en évidence au niveau cardiaque (Karmazyn, Sostaric, et Gan

2001). Or, un modèle de diabète induit par injection de streptozotocine altère le fonctionnement des micro-vaisseaux coronaires, réduit la perfusion myocardique et diminue la fonction mécanique du cœur en jouant sur l'échangeur Na^+/H^+ (Vial et al. 2008). Malgré une augmentation du stress oxydant et une atteinte de la fonction mécanique cardiaque, des rats Zucker souffrant d'un diabète sucré précoce présentent une préservation de la dilatation endothéliale-dépendante de la micro-vascularisation coronaire étudiée *ex vivo* (Mourmoura et al. 2013). Dans un stade plus avancé du diabète, le cœur montre une accumulation de collagène, une fibrose et un dysfonctionnement de la microcirculation coronaire (Adameova et Dhalla 2014; Gao et al. 2016). Ces altérations traduisent une atteinte de la structure et de la fonction cardiaque engendrée par la mort des cardiomyocytes.

3.2.1.4 L'impact du diabète sur les mitochondries cardiaques

Outre l'altération des voies liées à l'insuline, la lipotoxicité dans le tissu myocardique et la hausse des AGNE, des altérations mitochondriales apparaissent au stade précoce du diabète sucré dans le cœur (Jia, DeMarco, et Sowers 2016; Adeghate et Singh 2014). L'activation de l'inflammation via NF- κ B induit également un stress oxydant chez les diabétiques et augmente les altérations mitochondriales (Mariappan et al. 2010). Dans un premier temps, le diabète nuit à la fonction des mitochondries cardiaques sans induire l'hypertrophie de l'organe ni modifier les performances mécaniques. Ceci suggère que la dysfonction mitochondriale survient avant l'insuffisance cardiaque (Bombicino et al. 2016). La dysfonction mitochondriale est impliquée dans l'augmentation continue du stress oxydant dans le diabète sucré et ses complications ultérieures. L'obésité dans son stade pré-diabétique et le diabète sucré sont responsables d'une surproduction des ROS mitochondriaux résultant de l'hyperglycémie (Brownlee 2001). Une oxydation incomplète des acides gras induit par un stress oxydant peut entraîner le transfert d'acylcarnitines des mitochondries vers le cytosol, puis dans la circulation. Ces acylcarnitines sont impliquées dans la physiopathologie de l'insulino-résistance (Koves et al. 2008). L'hyperglycémie joue aussi un rôle sur la fonction mitochondriale en favorisant l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire et en activant les protéines kinases ERK 1 et 2 impliquées dans la prolifération cellulaire (Yu, Jhun, et Yoon 2011). Ces facteurs régulent l'homéostasie mitochondriale et la survie cellulaire. En effet, l'inhibition de la voie ERK/MAPK augmente la production mitochondriale des ROS et favorise l'apoptose

suite à l'activation de la voie des caspases (Monick et al. 2008). La production de ROS induite par une hyperglycémie peut également être régulée par des facteurs de la dynamique mitochondriale. Une délétion de la GTPase DLP1 (dynamin-like protein 1), aussi appelée DRP1 (pour dynamin-related protein 1) ou Dnm1L (dynamin 1-like), qui stimule les phénomènes de fission permet de réduire la fragmentation mitochondriale et la production de ROS induites par l'hyperglycémie. En revanche, une surexpression de la mitofusine-2 (MNF2), qui est impliquée dans le mécanisme de fusion des membranes externes mitochondriales, permet de limiter la production de ROS induite par l'hyperglycémie (Yu, Robotham, et Yoon 2006). Donc, en situation d'hyperglycémie, la fusion des mitochondries limite le stress oxydant alors que la fragmentation mitochondriale par les mécanismes de fission stimule la production de ROS dans les cellules cardiaques. La mutation ou la délétion de MNF2 est également impliqué dans le diabète de type 2 (Liesa, Palacín, et Zorzano 2009). De plus, une autre protéine qui intervient dans les phénomènes de fusion mitochondriale appelée la protéine OPA1 (pour optic atrophy protein 1, aussi appelée mitochondrial dynamin-like GTPase) joue également un rôle dans la viabilité mitochondriale et le stress oxydant au niveau cardiaque. En effet, des souris OPA1^{+/-} sont caractérisées par une augmentation de la production de ROS associée à une dysfonction mitochondriale et au développement d'une cardiomyopathie au 12^{ème} mois (Chen et al. 2012). Des souris possédant la même mutation et soumises à une constriction aortique transversale durant 6 semaines présentent une baisse de la fraction d'éjection et une hypertrophie cardiaque 2 fois supérieures à celles de souris OPA^{+/+} ayant subi la même opération (Piquereau et al. 2012). La dynamique mitochondriale joue donc un rôle important dans la viabilité mitochondriale, le stress oxydant et la santé cardiaque.

3.2.2 Pathologies infectieuses et cardiopathies : cas du sepsis

Le sepsis correspond à une infection microbienne généralisée de l'organisme. Il se développe suite à un syndrome de réponse inflammatoire systémique en condition infectieuse. En fonction de la gravité et de l'étendu de la contamination, le sepsis évolue vers un sepsis sévère pouvant conduire au choc septique. Le choc septique est une cause majeure de morbidité et de mortalité au niveau mondial, principalement dans les unités de soins intensifs (Fleischmann et al. 2016). Le sepsis évoluant en sepsis sévère est caractérisé

par le déclenchement d'un stress oxydant relié à des réactions inflammatoires, à l'activation de systèmes de coagulation pouvant conduire à une hypoperfusion généralisée et à une défaillance de plusieurs organes (Rhodes et al. 2017). Ces phénomènes peuvent même conduire à la mort par insuffisance cardiaque en cas de choc septique. Le sepsis précoce est associé à une phase hyperdynamique caractérisée par une stimulation de la fonction cardiaque. Suite à l'hypoperfusion, le sepsis évolue vers une phase hypodynamique traduisant l'insuffisance cardiaque (Flynn, Chokkalingam Mani, et Mather 2010). D'importantes altérations au niveau cardiovasculaire découlent de ce phénomène infectieux.

3.2.2.1 Altérations cardiaques en cas de sepsis

Lors du sepsis, une détérioration de la morphologie des ventricules cardiaques et de leur contractilité apparaît, entraînant une réduction du volume de sang éjecté par le ventricule gauche (J. D. Hunter et Doddi 2010). Quand le sepsis s'aggrave ou lorsque le choc septique se déclenche, une modification structurale importante est constatée au niveau du cœur. Une altération aiguë du ventricule gauche cardiaque est habituelle et plus de 50% des patients atteints de sepsis manifestent une dilatation ventriculaire ou une altération de la fonction systolique. Selon la gravité du sepsis, l'atteinte cardiaque touche des zones différentes. L'altération cardiaque se caractérise d'abord par une dégradation diastolique. Ce n'est qu'en cas d'une aggravation sévère qu'une atteinte systolique peut être induite. L'échocardiographie est un outil précieux pour estimer le degré d'altération du ventricule gauche et pour déterminer la cause la plus probable de ce dysfonctionnement (Hochstadt, Meroz, et Landesberg 2011). Toutefois, ces constatations ont été réalisées dans le cadre de la recherche. En situation clinique quotidienne, la détermination des altérations morphologiques est plus difficile. L'emploi d'imagerie par résonance magnétique (IRM) cardiaque permet également d'évaluer l'état morphologique du cœur en mesurant, par exemple, la masse du ventricule gauche. Elle permet aussi de renseigner sur la fonction cardiaque en fournissant des informations telles que la fraction d'éjection systolique ou, encore mieux, le rendement cardiaque (volume de sang éjecté par unité de temps). Cependant, cette méthode n'est utilisable en clinique que pour l'estimation de la fraction d'éjection systolique, le temps d'acquisition nécessaire pour déterminer le rendement cardiaque étant trop long pour le patient ou pour être utilisé en routine par le personnel de santé. En effet, la prise en charge des patients atteints de sepsis doit être rapide et commence par l'administration d'antibiotiques à large spectre,

puis par une antibiothérapie ciblée une fois effectuée l'identification des bactéries en cause (Rhodes et al. 2017).

En cas de sepsis, la microcirculation sanguine est altérée, ce qui est néfaste pour l'organisme (den Uil et al. 2008). L'endothélium micro-vasculaire devient perméable aux fluides et une quantité importante de liquide quitte le milieu sanguin pour provoquer un œdème cellulaire, une baisse du volume sanguin et une hypotension (Micek et al. 2013). De nombreux paramètres favorisent également le déclenchement de cette hypotension dont la surproduction de NO par l'activation de la iNOS et celle de la prostacycline (Gamcrilidze et al. 2015). L'hypotension demeure un aspect majeur dans le dysfonctionnement cardiaque en cas de sepsis. La stabilisation au niveau hémodynamique est un objectif important afin de contrer au mieux cette altération. Différentes interventions sont utilisées dans cet objectif : la restauration du volume des fluides, l'administration d'agents vasoconstricteurs ainsi que celle de médicaments inotropes tels que la dobutamine ou la milrinone (Francis, Bartos, et Adaya 2014). Le remplissage vasculaire par perfusion d'une solution colloïde ou cristalloïde constitue d'ailleurs une priorité majeure comme thérapie directe en cas de sepsis, car il permet de réduire la mortalité chez les patients admis en unité de soins intensifs (Citerio et al. 2015; Rochweg et al. 2014).

3.2.2.2 Acteurs de l'atteinte cardiaque dans le sepsis

Les causes responsables de la dépression myocardique sont multiples : l'excès d'endothéline-1 et de NO, l'altération du fonctionnement mitochondrial, l'activation des récepteurs de type Toll (TLR pour Toll-like receptor), la synthèse de cytokines inflammatoires et une perturbation des canaux calciques (Figure 24) (Rudiger et Singer 2013; Antonucci et al. 2014).

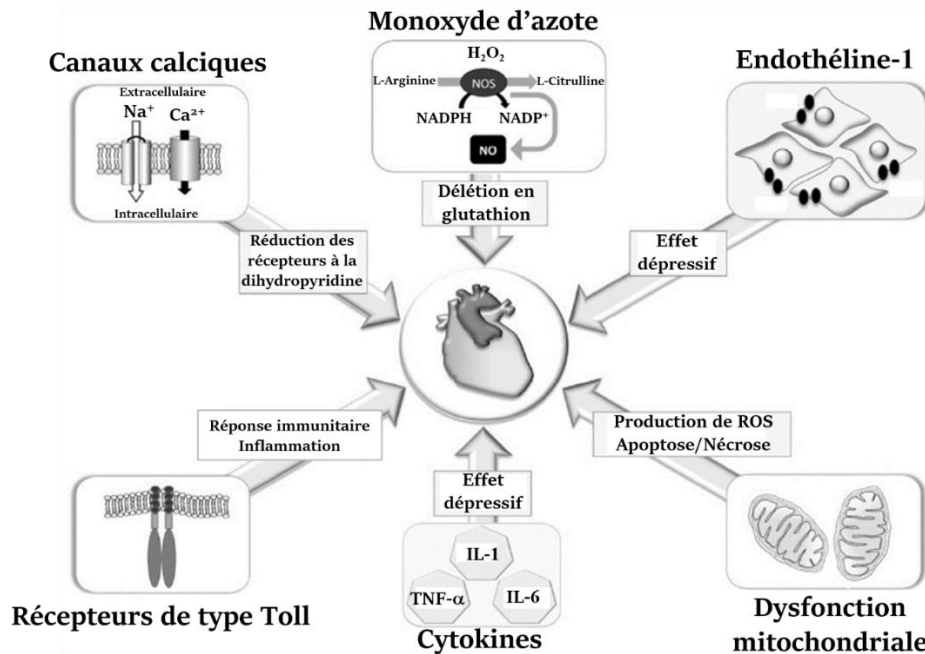


Figure 24 : Les différentes causes possibles d'atteintes cardiaques en cas de sepsis. L'altération cardiaque dans cette condition d'infection grave peut être due à l'influence de six éléments différents : le monoxyde d'azote, les canaux calciques, l'endothéline-1, les récepteurs toll-like, les cytokines pro-inflammatoires et une dysfonction mitochondriale. Na⁺ : ion sodium ; Ca²⁺ : ion calcium ; NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme réduite ; NADP⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme oxydée ; NOS : synthase de l'oxyde nitrique ; NO : oxyde nitrique ; H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène ; ET-1 : endothéline-1 ; TNF- α : tumoral necrosis factor alpha ; IL-1 et IL-6 : interleukines 1 et 6. TNF- α , IL-1 et IL-6 : cytokines pro-inflammatoires (Source : d'après Antonucci, J Crit Care., 2014).

L'endothéline-1 est un puissant agent sécrété par les cellules endothéliales pouvant provoquer des phénomènes d'ischémie locale. Le blocage des récepteurs à l'endothéline-1 pourrait constituer une voie préventive vis-à-vis des altérations cellulaires en cas de sepsis et d'inflammation (Rudiger et Singer 2013; Kowalczyk et al. 2015). Ce neuropeptide présente également un rôle pro-inflammatoire en activant l'expression de diverses cytokines (TNF- α , IL-1 et IL-6) et du facteur de transcription NF- κ B. La fixation d'endothéline-1 sur ses récepteurs cellulaires de type A est également connue pour favoriser l'augmentation du Ca²⁺ intracellulaire. Ce mécanisme passe par l'activation des canaux calciques de la membrane plasmique et par la stimulation de la phospholipase C. Cette dernière conduit à la synthèse d'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) et de diacylglycérol (DAG) qui entraînent le relargage de Ca²⁺ du réticulum sarcoplasmique vers le cytosol (Khalil 2011; Kowalczyk et al. 2015). Cette hausse du Ca²⁺ intracellulaire favorise la contraction des cellules musculaires lisses vasculaires.

La voie NF- κ B peut aussi être stimulée par d'autres sources telles que les cytokines inflammatoires ou le stress oxydant. Cette activation module diverses voies métaboliques, altère certains paramètres comme la coagulation sanguine et la contractilité myocardique et conduit même à l'apoptose au niveau des tissus cibles (Figure 25).

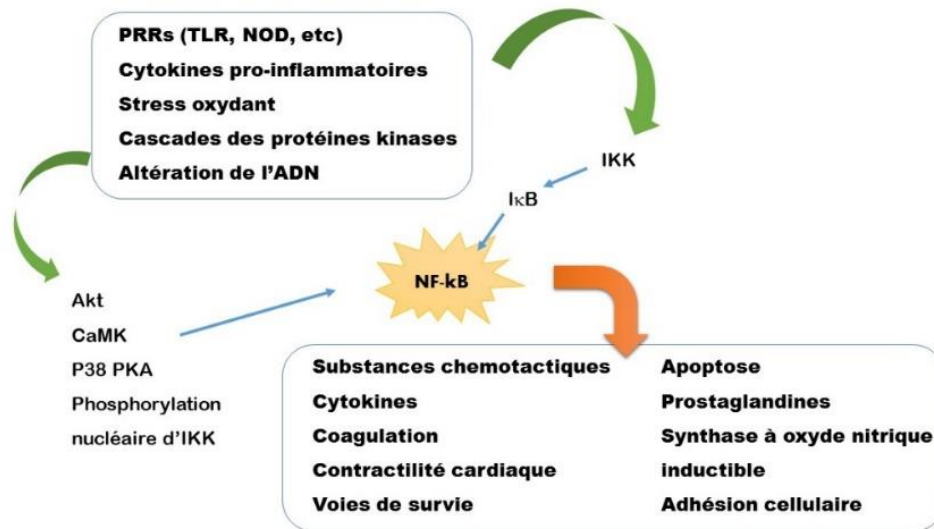


Figure 25 : Effets de la voie de signalisation du NF- κ B dans le sepsis. L'activité de NF- κ B intègre des signaux à partir d'un ensemble diversifié de récepteurs, de protéines et des cascades de signalisation (flèches bleues) en réponse à des stimuli spécifiques (flèches vertes). Elle régule de multiples fonctions cellulaires qui influent sur la physiologie cardiovasculaire et la physiopathologie au cours du sepsis. En plus de son implication dans les phénomènes inflammatoires et du stress oxydant, l'activation de NF- κ B induit l'expression de gènes impliqués dans la mort cellulaire, dans la fonction cardiaque, dans la coagulation et dans les réactions inflammatoires (flèche orange). La stimulation de cette voie favorise la dysfonction cardiaque pouvant conduire au décès. (Source : d'après Brown, Front Biosci., 2004)

Les TLR jouent également un rôle primordial dans le déclenchement de la réponse immunitaire primaire. Parmi la famille des TLR connus chez les mammifères, trois sont principalement retrouvés au niveau cardiaque : TLR2, TLR4 et TLR9. En cas de choc septique, TLR4 est impliqué dans l'initiation de l'inflammation et le dysfonctionnement des cardiomyocytes (Avlas et al. 2011). L'utilisation d'anticorps anti-TLR4 limiterait le taux de mortalité, même si le traitement est effectué 13h après le début du choc endotoxémique. Quatre semaines après l'induction d'un infarctus du myocarde chez le rat, elle limite la production de cytokines pro-inflammatoires (Liu et al. 2015). Les lipopolysaccharides (LPS) bactériens peuvent se fixer sur TLR4, ce qui favorise l'autophosphorylation de deux kinases associées au récepteur d'IL-1, IRAK-1 et IRAK-4. Ceci entraîne alors l'activation d'I κ B libérant le facteur de transcription NF- κ B. Ce dernier migre ensuite dans le noyau de la cellule

où il induit l'expression de nombreuses cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β et le TNF- α . En parallèle, l'activation de TLR4 conduit à la production de ROS et à la libération de NO en excès (Frantz, Ertl, et Bauersachs 2007).

La NOS inductible (iNOS) contribue à la physiopathologie inflammatoire en cas de choc septique. Elle est stimulée par IL-1 β et TNF- α . Le dysfonctionnement cardiaque dans le sepsis serait provoqué par une activité excessive de la iNOS. L'excès de NO produit inhibe en effet l'oxydation phosphorylante mitochondriale. La eNOS-calcium dépendante, quant à elle, joue un rôle dans la vasodilatation, le contrôle de la pression sanguine et la vaso-protection. La eNOS serait impliquée dans l'hypotension liée au sepsis. De nombreux facteurs de risque cardiovasculaire conduisent au découplage de la eNOS et donc au stress oxydant. Ils sont donc responsables des dysfonctionnements endothéliaux et vasculaires (Förstermann et Sessa 2012; Zambrano et al. 2019). Une baisse de la biodisponibilité en NO favorise la dysfonction vasculaire. Ce déficit peut apparaître suite à un découplage de la eNOS induit par une disponibilité réduite en tétrahydrobioptérine BH₄, le cofacteur de la eNOS, ou par une déplétion en L-arginine (Alp et Channon 2004; Alkatis et Crabtree 2012). En cas de découplage, la production de NO par la NOS est limitée ce qui conduit à la place à une libération d'O₂⁻ qui réagit alors avec le NO disponible et forme des peroxy-nitrites ONOO⁻. Ces derniers vont d'ailleurs entretenir le découplage de la NOS. Ce découplage est donc impliqué dans le développement de dysfonctions cardiaques et vasculaires induites par le stress oxydant.

En cas de sepsis, le stress oxydant prend une place importante dans les altérations métaboliques. Il constitue donc une cible importante dans le traitement de ce syndrome (Huet et al. 2011). En cas d'agression aiguë tel que le sepsis, une défaillance de la synthèse énergétique est constatée. Dans des modèles animaux de sepsis, l'activité des complexes I et III diminue en favorisant la production de ROS et de peroxy-nitrites (Levy 2007; Vanasco et al. 2012). La libération de ROS est directement liée à l'état métabolique et surtout à la force protomotrice : quand la respiration mitochondriale est altérée et faible, la force protomotrice est élevée et la production de ROS est importante. Inversement, quand la respiration est intense, la production de ROS est faible, car la force protomotrice est faible. C'est également le cas en présence d'agents découplants comme le phénol encombré SF6847 et le salicylanilide hydrophobe pour des essais *in vitro* ou physiologiquement avec les protéines découplantes (UCP pour uncoupling proteins) (Terada 1990; Grivennikova et Vinogradov 2013; Cadenas 2018). Au niveau mitochondrial, l'une des conséquences majeures de l'excès de ROS

est l'ouverture du PTPm entraînant une fuite du contenu matriciel et donc une baisse de l'oxydation phosphorylante. L'ouverture de ce pore favorise également le transfert de calcium de part et d'autre de la membrane mitochondriale interne, selon le gradient de concentration du cation. Or, le calcium intra-mitochondrial est également un élément impactant le PTPm et la fonction mitochondriale en général (Bernardi et al. 2015; Briston et al. 2017). Dans les conditions physiologiques, l'augmentation du calcium mitochondrial stimule la production d'énergie en activant plusieurs déshydrogénases du cycle de Krebs. En revanche, dans les conditions pathologiques, telles que l'ischémie/reperfusion ou le sepsis, la concentration en calcium de la matrice mitochondriale augmente de manière trop importante et ceci favorise la production de ROS et l'ouverture du PTPm. Le phénomène peut même conduire à la mort cellulaire par apoptose ATP-dépendante dans le cadre d'un stress modéré ou par oncose en cas d'agression aiguë accompagnée d'une déficience en ATP (Figure 26) (Brookes et al. 2004; Correa, Soto, et Zazueta 2007). Le taux d'ADP matriciel peut réguler l'ouverture du PTPm en le désensibilisant à la concentration calcique mitochondriale (Sokolova et al. 2013). La mort cellulaire due à une atteinte mitochondriale est grandement liée à l'ouverture du PTPm sous l'influence d'un taux élevé de calcium et/ou d'une libération importante de ROS. En effet, le PTPm ouvert découple les mitochondries et entraîne une baisse de la production d'ATP par dissipation de la force protomotrice. L'énergie disponible devient insuffisante pour les besoins de la cellule et de ses fonctions métaboliques (Morin et al. 2016).

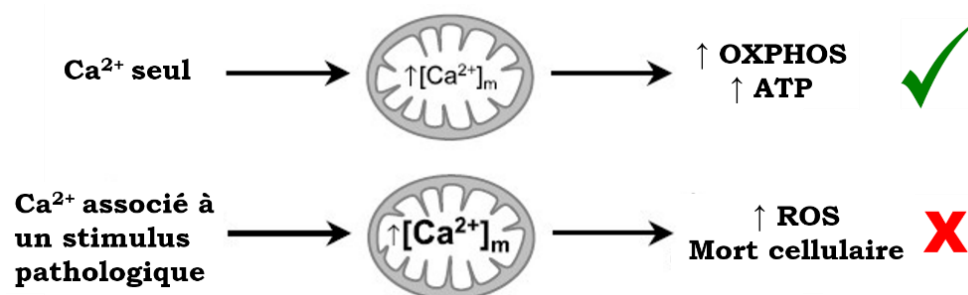


Figure 26 : Relation entre la fonction mitochondriale et la concentration matricielle en calcium. Dans un état basal, le taux de calcium pénétrant dans la mitochondrie va stimuler la production d'énergie en favorisant l'oxydation phosphorylante (OXPHOS). Lors de l'association à un état pathologique, l'augmentation de la concentration calcique dans la mitochondrie est plus importante et stimule alors la production de ROS, l'ouverture du PTPm et la mort cellulaire. ATP : adénosine triphosphate ; [Ca²⁺]_m : concentration calcique de la matrice mitochondriale ; ROS : espèces réactives de l'oxygène (Source : d'après Brookes, Am J Physiol Cell Physiol., 2004).

Chez des animaux rendus septiques par perforation et ligature cœcales, une induction importante de l'activité de la caspase 3, protéine de la classe des protéases à cystéine jouant un rôle majeur dans la voie apoptotique, a été observée (Watts et al. 2004). Sous l'impact de l'excès de ROS et/ou de calcium dans la mitochondrie, le sepsis induit donc une défaillance énergétique et oriente la cellule vers un phénomène de mort cellulaire programmée (Figure 27). La mort cellulaire peut même survenir par oncose si la teneur intracellulaire en ATP est faible. De plus, la morphologie même des mitochondries peut également être altérée en situation d'endotoxémie. Si le sepsis est peu sévère, la biogénèse mitochondriale par la stimulation de l'expression de PGC-1 α et du facteur de transcription mitochondrial A (TFAM) permet une normalisation partielle de la structure mitochondriale. Cependant, elle n'est pas accompagnée d'une récupération de la fonction comme le montre l'étude de Vanasco et coll. sur un modèle de rat injecté aux LPS (Vanasco et al. 2014).

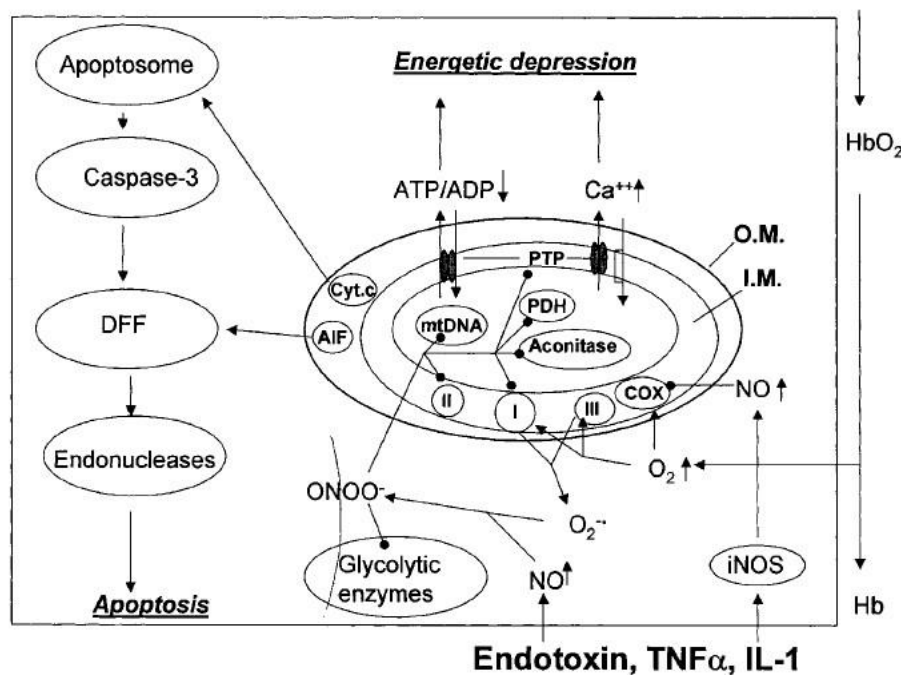


Figure 27 : Schéma décrivant l'implication des mitochondries dans les déficiences septiques. L'endotoxine, le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α) et l'interleukine-1 (IL-1) stimule l'activité de la synthèse à oxyde nitrique inducible (iNOS). L'augmentation de l'oxyde nitrique (NO) inhibe la cytochrome-c-oxydase (COX). La concentration en oxygène (O₂) augmente. L'oxygène peut ensuite être réduit au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire entraînant la formation d'ion superoxyde (O₂⁻). Ce dernier forme le peroxyde d'azote (ONOO⁻) en réagissant avec le NO. Le stress oxydatif affecte les enzymes glycolytiques, la pyruvate déshydrogénase (PDH), les complexes I et II, l'ADN mitochondrial et contribue à l'ouverture du pore de transition de perméabilité (PTP) rendant la membrane interne (I.M.) perméable. La libération de cytochrome c (Cyt.c) et du facteur induisant l'apoptose (AIF) à travers la membrane mitochondriale externe (O.M.) favorise l'activation de l'apoptose (Source : Gellerich, Biosci Rep., 2002).

De façon générale, il a donc été constaté que des perturbations métaboliques ou qu'une situation infectieuse s'accompagnent d'un stress oxydant. L'augmentation de l'intensité de ce phénomène est liée à l'aggravation de l'état pathologique et plus particulièrement de l'apparition d'une insuffisance cardiaque. La protection du myocarde face à cette altération du statut oxydant constitue donc une priorité dans la prévention et le traitement des maladies cardiovasculaires.

Partie 4

Nutriments et maladies cardiovasculaires

4.1 Les acides gras polyinsaturés n-3 (AGPI n-3 ou oméga 3 ou ω 3)

4.1.1 Rappels sur les oméga 3

Les acides gras sont classifiés en 3 grandes familles en fonction du nombre d'insaturations (ou double liaison carbone-carbone, C=C) au niveau de leur chaîne carbonée : les acides gras saturés (AGS), les acides gras monoinsaturés (AGMI) et les acides gras polyinsaturés (AGPI). Les AGS ne présentent aucune double liaison, les AGMI une seule et les AGPI possèdent au moins 2 insaturations. La structure de leur chaîne carbonée présente un groupement méthyle CH₃ à une extrémité (position n ou ω) et un groupement carboxyle COOH à l'autre (position 1 ou α). La nomenclature la plus utilisée se présente sous la forme « CX : Y n-Z » ou « CX : Y ω Z » où X égale le nombre total d'atomes de carbone de la chaîne de l'acide gras, Y caractérise le nombre d'insaturations et Z traduit la position de la 1^{ère} insaturation à partir de l'extrémité CH₃ terminal. Les AGPI sont répartis en 2 grands ensembles en fonction de la position du premier carbone impliqué dans une double liaison à partir de ce CH₃ terminal : les AGPI n-6 (ou ω 6) et les AGPI n-3 (ou ω 3). Les différentes familles d'acides gras, leur nom et leur formule respective sont indiqués dans le [Tableau 2](#).

Tableau 2 : Glossaire des acides gras.

<u>Acides gras saturés (AGS)</u>	<u>Acides gras polyinsaturés (AGPI)</u>
Acide myristique (C14 : 0)	AGPI n-6 ou ω6
Acide pentadécylique (C15 : 0)	Acide linoléique (LA, C18 : 2 n-6)
Acide palmitique (C16 : 0)	Acide γ -linoléique (C18 : 3 n-6)
Acide margarique (C17 : 0)	Acide eicosadiénoïque (C20 : 2 n-6)
Acide stéarique (C18 : 0)	Acide dihomo- γ -linoléique (DGLA, C20 : 3 n-6)
Acide arachidique (C20 : 0)	Acide arachidonique (ARA, C20 : 4 n-6)
Acide béhénique (C22 : 0)	Acide docosatétraénoïque (C22 : 4 n-6)
Acide lignocérique (C24 : 0)	Acide docosapentaénoïque (C22 : 5 n-6)

Tableau 2 : Glossaire des acides gras (suite).

Acides gras monoinsaturés (AGMI)	AGPI n-3 ou ω 3
Acide palmitoléique cis-9 (C16 : 1 n-9)	Acide α -linoléique (ALA, C18 : 3 n-3)
Acide palmitoléique (C16 : 1 n-7)	Acide stéaridonique (C18 : 4 n-3)
Acide oléique (C18 : 1 n-9)	Acide eicosatétraénoïque (C20 : 4 n-3)
Acide vaccénique (C18 : 1 n-7)	Acide eicosapentaénoïque (EPA, C20 : 5 n-3)
Acide élaïdique (C18 : 1 trans)	Acide docosapentaénoïque (DPA, C22 : 5 n-3)
Acide erucique (C22 : 1 n-9)	Acide docosahexaénoïque (DHA, C22 : 6 n-3)
Acide nervonique (C24 : 1 n-9)	(Source : Thibault Leger)

Au niveau de l'alimentation, les AGS sont principalement retrouvés dans les produits d'origine animale (viande, produits laitiers), l'huile de coco ou l'huile de palme. La principale source alimentaire d'AGMI est l'huile d'olive mais ces acides gras sont également présents dans l'avocat et les arachides. Le précurseur des ω 6 l'acide γ -linoléique (LA ou C18 : 2 ω 6) est très présent dans l'huile de tournesol, de noix ou de maïs. L'acide arachidonique (ARA ou C20 : 4 ω 6) est quant à lui principalement retrouvé dans les œufs, le cœur de poulet et de porc, ou encore le foie de morue. L'acide α -linoléique (ALA ou C18 : 3 ω 3), chef de file des ω 3, est principalement retrouvé dans les graines et huiles de colza, de sauge, de lin, de chanvre, de soja ou les noix. Les AGPI ω 3 à longue chaîne (ω 3-LC) comme l'acide éicosapentaénoïque (EPA ou C20 : 5 ω 3), l'acide docosapentaénoïque (DPA ou C22 : 5 ω 3) ou l'acide docosahexaénoïque (DHA ou C22 : 6 ω 3) sont majoritairement présents dans les produits d'origine marines comme les poissons gras (sardines, saumon, thon, maquereaux) ou les moules (Tableau 3) (Massaro et al. 2008). En effet, suite à la photosynthèse, le phytoplancton synthétise ces ω 3-LC. Il sert ensuite de nourriture à de nombreuses espèces aquatiques qu'il enrichit alors en ω 3-LC. A l'image du C18 : 2 ω 6, l'ALA est qualifié d'acide gras « essentiel » pour l'Homme car il n'est pas synthétisé dans l'organisme. Il est produit à partir de l'acide linoléique suite à l'action d'une Δ 15-désaturase. Cette enzyme n'existe pas chez les mammifères mais uniquement chez les eucaryotes inférieurs, le ver nématode *Caenorhabditis elegans* et les plantes (Lee et al. 2016). C'est d'ailleurs pourquoi de nombreux végétaux produisent des aliments riches en C18 : 3 ω 3.

Tableau 3 : Teneurs en EPA et DHA dans divers aliments.

Aliment	EPA (g/100 g)	DHA (g/100 g)
Sardines en conserve	0,89	0,10
Maquereau	0,71	0,12
Hareng	0,51	0,11
Saumon	0,50	0,40
Crabe en conserve	0,47	0,08
Moules	0,41	0,02
Truite	0,23	0,09
Carrelet	0,16	0,04
Morue	0,08	0,01
Crevettes	0,06	< 0,01
Eglefin fumé	0,05	0,01
Venaison	0,04	0,09
Rôti d'agneau	0,03	0,04
Rôti de bœuf	0,02	0,02
Rôti de porc	0,01	0,02
Poulet	0,01	0,02

(Source : d'après Massaro, Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids., 2008)

A partir de chaque précurseur des $\omega 6$ et des $\omega 3$, des réactions de désaturation et d'élongation se réalisent au niveau du réticulum endoplasmique hépatique principalement afin de synthétiser les autres acides gras de ces familles (Figure 28) (Jump, Depner, et Tripathy 2012; Calder 2015). L'étape de désaturation consiste en l'insertion d'une insaturation supplémentaire alors que l'élongation permet l'ajout de 2 atomes de carbone à l'extrémité carboxyle. Il est important de préciser que les $\omega 6$ et les $\omega 3$ sont en compétition pour l'utilisation de ces enzymes et que la répartition peut être modulée en fonction des situations physiopathologiques. L'étape finale de la synthèse des $\omega 3$ consiste en la formation du DHA et, bien qu'elle se déroule au niveau des peroxysomes, elle nécessite l'intervention d'autres organites cellulaires que sont les mitochondries et le réticulum endoplasmique (Wanders, Waterham, et Ferdinandusse 2016). Le DHA peut également être reconverti en EPA (Jump, Depner, et Tripathy 2012). Cela nécessite en premier lieu la réduction d'une insaturation afin de permettre ensuite la β -oxydation.

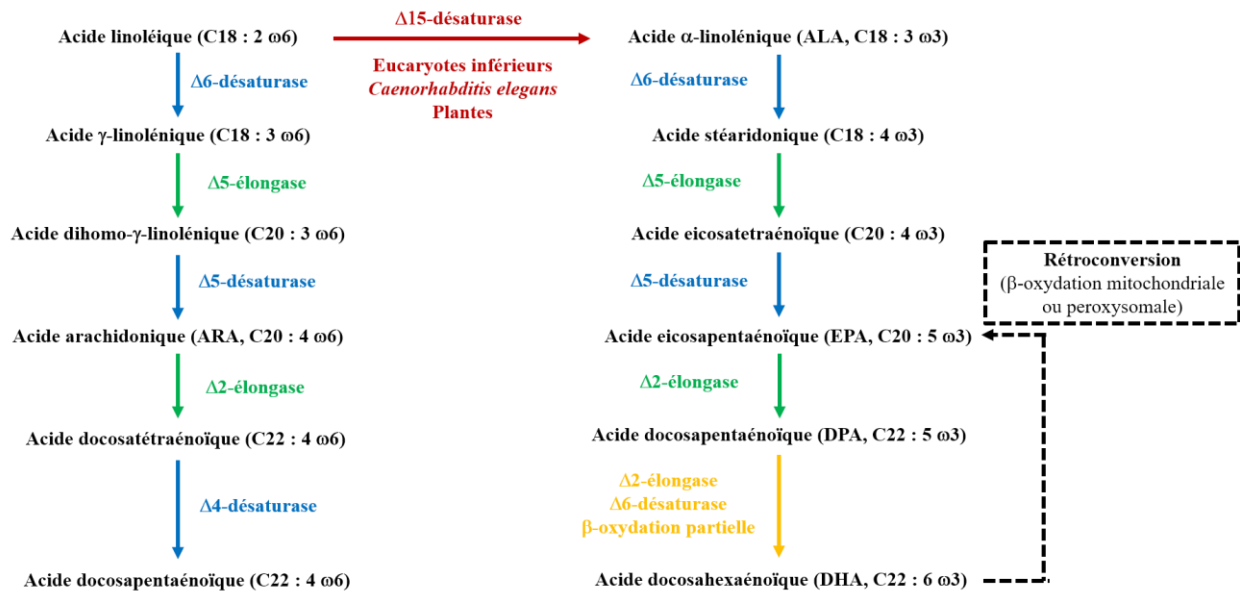


Figure 28 : Synthèse et conversions des $\omega 6$ et des $\omega 3$. (Source : d'après Calder, Biochim Biophys Acta., 2015 et Jump, Depner et Tripathy, J Lipid Res., 2012)

En 2007, Plourde et Cunnane ont mis en avant le résultat de plusieurs travaux montrant que la conversion de l'acide α -linoléique en EPA ou DHA est très limitée chez l'Homme. En effet, seulement 5% du précurseur des $\omega 3$ conduirait à la formation d'EPA et ce pourcentage chuterait à moins de 0,5% pour le DHA (Plourde et Cunnane 2007). Ceci confirme l'importance d'un apport régulier et suffisant en $\omega 3$ -LC d'origine marine. Une fois ingérés, l'EPA et le DHA sont préférentiellement intégrés aux phospholipides membranaires au lieu de subir la β -oxydation (Sprecher 2000). Au niveau des cardiomyocytes et des cellules endothéliales vasculaires, le DHA représente la part majoritaire des $\omega 3$ -LC dans les conditions physiologiques et l'EPA semble moins présent (Jump, Depner, et Tripathy 2012). D'après une étude utilisant ces acides gras enrichis en carbone 13, la rétroconversion du DHA en EPA au niveau plasmatique serait 15 fois supérieure chez le rat par rapport à l'Homme (Brossard et al. 1996). L'étude du DHA dans ce modèle animal représente donc un enjeu complexe. De plus, l'EPA apparait plus efficace par rapport à l'ALA ou au DHA dans le traitement de la dépression, le maintien de l'homéostasie glucidique en situation obésogène ou encore la prévention de la fibrose et de l'insuffisance cardiaque (Martins 2009; Eclov et al. 2015; Pinel et al. 2016). Une corrélation majeure existe chez l'Homme entre la dose d'EPA administrée et le rapport EPA/ARA dans la composition des acides gras des phospholipides membranaires : plus la dose d'EPA est élevée, plus la proportion d'EPA est importante, au détriment de l'ARA (Rees et al. 2006). Dans un essai en double aveugle chez des patients en surpoids avec un IMC moyen de 31,5 kg/m², Legrand et coll. compare un régime d'intérêt enrichi en ALA avec un

rapport $\omega 6/\omega 3$ estimé de 2,3 par rapport à un régime contrôle riche en AGS avec un rapport $\omega 6/\omega 3$ égal à 22,9. Le régime d'intérêt réduit le rapport $\omega 6/\omega 3$ de 13% au niveau des érythrocytes après 90 jours de régime alors que le régime contrôle augmente ce rapport de 29% sur la même période (Legrand et al. 2010). De plus, 150 jours après la fin du régime, le groupe contrôle présente un gain de poids important mais pas le groupe d'intérêt. Le rapport $\omega 6/\omega 3$ dans les apports alimentaires est donc primordial à la santé.

4.1.2 Métabolites issus des AGPI

Quand les $\omega 6$ et les $\omega 3$ sont intégrés dans les phospholipides membranaires, ils donnent naissance à de nombreux métabolites issus de l'oxydation de l'ARA et de ses dérivés pour les $\omega 6$ et de l'EPA, du DPA et du DHA pour les $\omega 3$ (Calder 2015, 20) (Figure 29). Ces acides gras sont libérés sous l'action d'une phospholipase. Les eicosanoïdes sont alors obtenus par voie enzymatique suite à l'action de cytochromes P450 (CYTP450), de cyclooxygénases (COX) et de lipooxygénases (LOX). L'ARA est transformé en : i) prostaglandines de série 2 dont PGE_2 et PGI_2 présentant des propriétés pro-arythmiques, ii) en thromboxanes de série 2 tels que l'activateur des plaquettes TXA_2 ou l'agent vasoconstricteur TXB_2 , iii) en leucotriènes de série 4 dont le LTB_4 pro-inflammatoire, iv) des lipoxines comme la LPX_4 issue de PGE_2 connue pour être anti-inflammatoire, ou encore v) des composés impliqués dans l'inflammation comme le 11,12-EET. Les $\omega 3$ -LC permettent la synthèse : i) des prostaglandines de série 3 comme les anti-arythmiques PGE_3 et PGI_3 , ii) des thromboxanes de série 3 tels que l'inhibiteur plaquettaire TXA_3 et l'agent vasodilatateur TXB_3 , iii) des leucotriènes de série 5 en particulier le LTB_5 anti-inflammatoire. Outre ces eicosanoïdes, l'EPA et le DHA génèrent aussi des médiateurs lipidiques impliqués dans la résolution de l'inflammation. Ils sont divisés en 3 familles : les résolvines, les protectines et les marésines (Schmitz et Ecker 2008; Ott, Hiesgen, et Mayer 2011). A l'image des élongases et des désaturases impliquées dans la synthèse des $\omega 6$ et des $\omega 3$, les enzymes formant les eicosanoïdes sont en compétition pour synthétiser les différents métabolites oxygénés issus de ces deux familles d'AGPI. Les récepteurs aux eicosanoïdes présentent une affinité beaucoup plus élevée pour ceux provenant de l'ARA plutôt que pour ceux issus de l'EPA (Wada et al. 2007). Alors que la COX1 est présente de façon physiologique, la COX2 est induite par l'inflammation. De même que l'EPA réduit le niveau d'ARA dans les phospholipides, il est aussi connu pour inhiber le métabolisme de l'ARA

mais aussi pour réduire l'expression de la COX2. De même, plusieurs semaines de régime enrichi en EPA ou en DHA abaissent le taux de prostaglandines de série 2 et de leucotriènes de série 4 (Chapkin, Akoh, et Miller 1991; Meydani et al. 1991; Trebble et al. 2003). Ces effets ont été constatés principalement en cas d'administration de plusieurs grammes par jour de ces acides gras. L'effet anti-inflammatoire de l'EPA a majoritairement été démontré chez l'Homme avec des doses comprises entre 1,35 et 2,7 g d'EPA par jour (Rees et al. 2006).

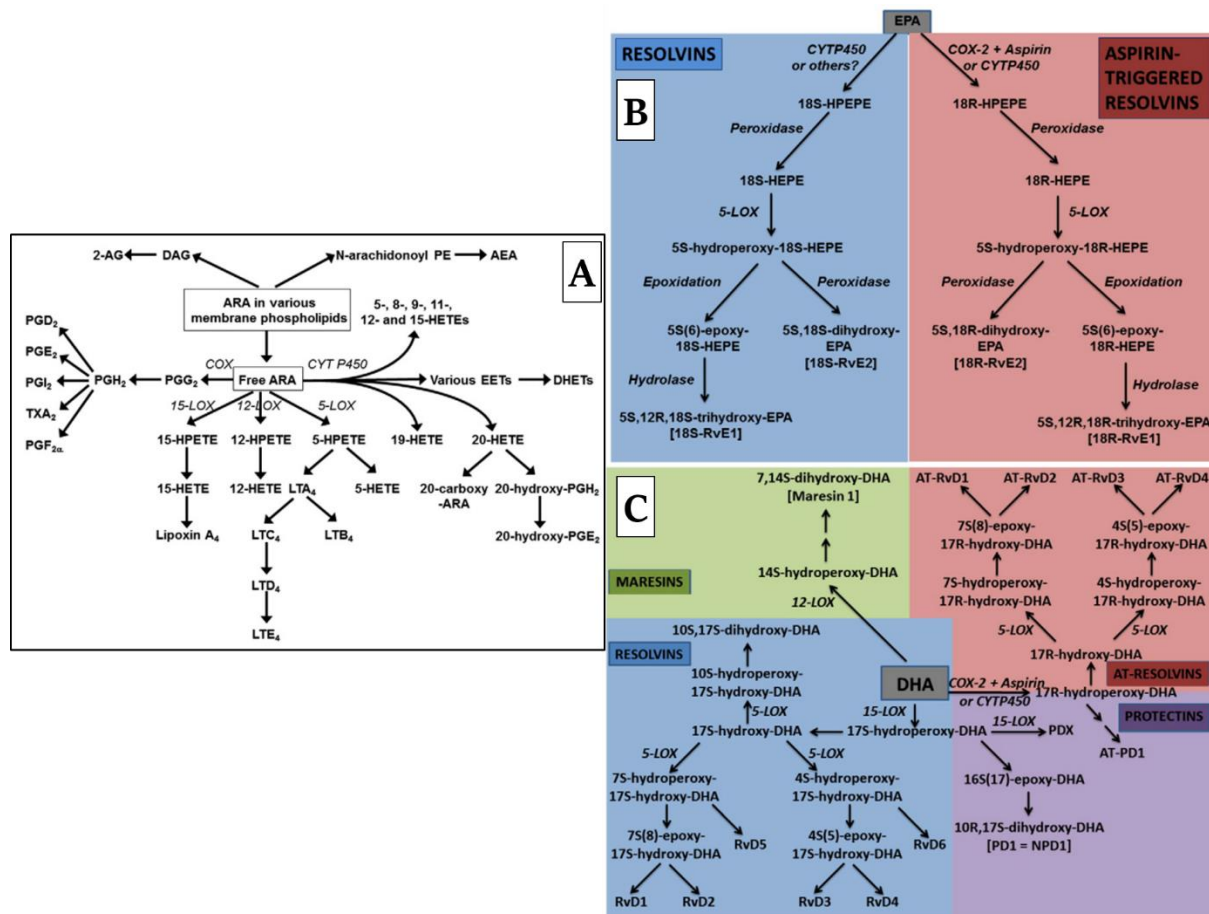


Figure 29 : Vue d'ensemble des métabolites issus des acides gras polyinsaturés ω6 et ω3.

(A) Voies de synthèse des eicosanoïdes à partir de l'acide arachidonique (ARA) ; (B) Voies de biosynthèse des résolvines et des résolvines déclenchée par l'aspirine à partir de l'acide eicosapentaénoïque (EPA) ; (C) Voies de biosynthèse des résolvines, des protectines et des résolvines et protectines déclenchées par l'aspirine (AT-Rv et AT-P) et des marésines à partir de l'acide docosahexaénoïque (DHA). 2-AG : 2-arachidonoyl glycérol ; AEA : arachidonoyl éthanolamine (anandamide) ; COX : cyclooxygénase ; CYTP450 : enzymes cytochromes P450 ; DAG : diacylglycérol ; DHET : acide dihydroxyeicosatriénoïque ; EET : acide époxyeicosatriénoïque ; HEPE : acide hydroxyeicosapentaénoïque ; HETE : acide hydroxyeicosatétraénoïque ; HPETE : acide hydroperoxyeicosatétraénoïque ; LOX : lipoxygénase ; LT : leucotriène ; NP : neuroprotectine ; P : protectine ; PDX : protectine DX (10S,17S-dihydroxy-DHA) ; PE : phosphatidyléthanolamine ; PG : prostaglandine ; Rv, résolvine ; TX : thromboxane. La représentation des intermédiaires, des métabolites et des enzymes n'est pas exhaustive. (Source : d'après Calder, Biochim Biophys Acta., 2015)

Les AGPI sont également connus pour être à l'origine des endocannabinoïdes ou cannabinoïdes endogènes (McDougle et al. 2017). Issus de l'EPA ou du DHA, ces molécules présentent des effets bénéfiques dans les maladies cardiovasculaires (Kris-Etherton et al. 2002) et des propriétés anti-inflammatoires (Duda et al. 2009). Ils agissent de façon locale et transitoire car ils ne semblent sécrétés qu'en cas de nécessité (Fezza et al. 2014).

Les AGPI sont aussi à l'origine de métabolites oxygénés obtenus par une voie non-enzymatique : la peroxydation lipidique. Ce phénomène apparaît dans des conditions pathologiques suite à une hausse des ROS et des RNS ou en cas d'exposition aux xénobiotiques et aux polluants environnementaux (Ramana, Srivastava, et Singhal 2017). La peroxydation lipidique peut altérer la structure et la fonction des protéines membranaires voire entraîner un dysfonctionnement cellulaire et des lésions tissulaires étendues. Elle conduit à la formation de divers composés comme le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxy-2-nonéanal (4-HNE) couramment utilisés comme marqueurs de la peroxydation lipidique suite à un stress oxydant (Ayala, Muñoz, et Argüelles 2014). L'accumulation de ces composés induit progressivement des phénomènes d'autophagie, d'arrêt du cycle cellulaire, d'apoptose ATP-dépendante et enfin de nécrose cellulaire en cas de dommages irréversibles. D'autres métabolites issus de l'oxydation des AGPI peuvent également être retrouvés par ce phénomène de peroxydation lipidique. L'ARA peut entraîner la synthèse d'isoprostanes. Les principaux sont les isoprostanes F₂ qui sont utilisés comme biomarqueurs des dommages oxydatifs dans les maladies neurodégénératives et cardiovasculaires (Durand et al. 2011). L'EPA et le DHA sont à l'origine des neuroprostanes retrouvés au niveau cérébral et aussi d'isoprostanes. Ces molécules présentent des effets anti-inflammatoires en particulier en inhibant les voies NF-κB et NRF2 (Gao et al. 2007; Brooks et al. 2011). L'ALA est le précurseur des phytoprostanes dont les effets ont principalement été étudiés chez les plantes (Galano et al. 2015). Ils ont démontré de puissantes propriétés de régulation, illustrées par l'inhibition de la production de NO par les macrophages de souris stimulées aux LPS grâce au blocage de la voie NF-κB (Karg et al. 2007).

4.1.3 Oméga 3, maladies cardiovasculaires et stress oxydant

Différents traitements à visée préventive ou curative permettent d'améliorer la fonction cardiaque : le facteur d'activation plaquettaire, la cyclosporine A, la glutamine, la caféine, la simvastatine, les inhibiteurs des caspases ou la dobutamine (Smeding et al. 2012; Tham et al. 2015; Chin et al. 2016). L'utilisation d'antibiotiques chez certains patients atteints d'une septicémie peut cependant s'avérer inadéquate. Des alternatives restent donc à découvrir (Flaherty et al. 2014). En cas de choc septique, une diminution des phospholipides plasmatiques est observée, associée à une hypocholestérolémie et à une hypertriglycéridémie. La diminution des teneurs plasmatiques en phospholipides est associée à une hausse des acides gras insaturés et mono-insaturés et une réduction globale des AGPI, que ce soit ceux de la famille $\omega 6$ ou ceux de la série $\omega 3$ (Rival et al. 2013). Les AGPI $\omega 3$ sont connus pour leurs effets cardio-protecteurs et leur impact positif au niveau cardiovasculaire. Ceci est particulièrement important dans le cadre des sociétés occidentales. En effet, dans nos pays, les individus ne consomment pas suffisamment d'AGPI $\omega 3$ et ils ingèrent trop d'AGPI $\omega 6$ qui présentent majoritairement une action pro-inflammatoire (Calder 2003; Micha et al. 2014). Les AGPI $\omega 3$ d'intérêt vis-à-vis de la santé sont l'EPA et le DHA. Une alimentation enrichie en AGPI $\omega 3$, avec un rapport AGPI $\omega 6/\omega 3$ adéquat (idéalement de 4-5), permet notamment une diminution des phénomènes inflammatoires par rapport à un régime trop riche en AGPI $\omega 6$.

4.1.3.1 Posologie des oméga 3

La littérature suggère que la plupart des effets bénéfiques des AGPI $\omega 3$ sur la santé surviennent pour de fortes doses ingérées, supérieures à une simple consommation de poissons. Dans un supplément typique en huile de poisson, l'EPA et le DHA représentent ensemble environ 30% des acides gras totaux, de sorte qu'une capsule d'huile de poisson de 1 g fournit environ 0,3 g d'EPA + DHA. Des huiles plus concentrées sont également disponibles. Dans le poisson et dans les suppléments traditionnels d'huile de poisson, la plupart des acides gras sont présents sous forme de composants des triacylglycérols. Les acides gras $\omega 3$ marins sont également disponibles sous d'autres formes telles que l'huile de krill, qui fournit de l'EPA et du DHA principalement sous forme de phospholipides ou encore sous forme d'esters

éthyliques dans les préparations hautement concentrées de qualité pharmaceutique (Calder 2015). Les effets apportés par une supplémentation en huile de poisson sont principalement :

- i) une action favorable sur les paramètres sanguins (hypocholestérolémie, hypotriglycéridémie, baisse de l'agrégation plaquettaire, activités anti-thrombotique et fibrinolytique, diminution de la viscosité sanguine et activité anti-inflammatoire) ;
- ii) une réduction des dommages cellulaires cardiaques induits par l'ischémie/reperfusion, probablement due à l'action de l'EPA au niveau des phospholipides membranaires ;
- iii) une modulation des troubles du rythme cardiaque au moment de la reperfusion post-ischémique ;
- iv) une protection cellulaire dans le cas d'une hypertrophie cardiaque ;
- v) des effets athéro-protecteurs et
- vi) de manière plus générale, une réduction du temps d'hospitalisation en cas de cardiomyopathies (Demaison et al. 1994; Robinson et Stone 2006; Peltier et al. 2006; Adkins et Kelley 2010; Barbosa et al. 2010; McLennan et al. 2012; Lu et al. 2017).

A faibles doses, certains effets persistent, essentiellement dans les études comparant un groupe contrôle dont le régime est dénué d'AGPI $\omega 3$ et où les AGPI $\omega 6$ sont la seule et unique source d'AGPI. Malgré des taux peu élevés en AGPI $\omega 3$, un effet protecteur vis-à-vis des maladies coronariennes est constaté (Demaison et Moreau 2002). En résumé, les doses nécessaires à la survenue d'effets favorables au niveau cardiovasculaire d'un régime enrichi en AGPI $\omega 3$ sont variables selon les situations. Les cas où une forte dose d'EPA+DHA (> 3 g/jour) est nécessaire sont principalement les situations où l'action survient au travers des mécanismes extrinsèques tels que les lipides plasmatiques ou les fonctions vasculaire et endothéliale. Les effets bénéfiques des doses plus faibles (< 1 g/jour) suffisent pour modifier la composition en acides gras des phospholipides membranaires du myocarde, l'excitabilité des cardiomyocytes et la fonction du myocarde : ce sont des mécanismes de type intrinsèque (McLennan 2014). Parmi les études cliniques majeures concernant l'efficacité des AGPI $\omega 3$ sur la viabilité et l'efficacité cardiovasculaire, trois d'entre elles sont à mettre en avant : la Diet and Reinfarction Trial (DART), la prévention et l'essai Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI) et enfin l'étude Japan EPA Lipid Intervention Study (JELIS) (Burr et al. 1989; Stone 2000; Saito et al. 2008). La première étude montre qu'une consommation régulière d'EPA+DHA (900 mg/jour) réduit la mortalité et la récurrence de l'infarctus du myocarde. La seconde étude met en évidence une réduction du temps d'hospitalisation pour des causes cardiovasculaires avec un régime composé d'EPA et DHA (850 mg/jour). Les cinq années de l'étude JELIS indiquent que l'association d'EPA (1,8 g/jour) et de statines réduit fortement (-53%) le risque relatif de survenue de problèmes cardiovasculaires chez des patients hyperlipidémiques

dans le cadre d'une prévention primaire. Des recommandations quant à la consommation d'EPA et de DHA ont alors pu être préconisées. Pour la prévention primaire, la dose quotidienne conseillée est de 300-600 mg/jour. En revanche, pour la prévention secondaire, la dose recommandée est de 900-1200 mg/jour. Pour réduire la triglycéridémie, la supplémentation journalière d'EPA et DHA doit se situer au niveau de 3000-4000 mg/jour (Jain, Aggarwal, et Zhang 2015). Si beaucoup de travaux démontrent l'effet cardio-protecteur des ω 3, l'étude DART-2 (pour Diet and Angina Randomized Trial) composée de patients atteints d'angine de poitrine stable et suivis pendant 3 à 9 ans suggère en revanche une augmentation significative de la mort subite suite à un problème cardiaque dans le groupe ingérant des capsules d'huile de poisson (Burr 2007). Outre la production de prostaglandine E2, les réponses immunitaires innées chez les jeunes sujets ne sont pas affectées par un apport d'EPA inférieur ou égal à 4,05 g/j. Les sujets âgés sont plus sensibles aux effets immunologiques de l'EPA et l'explosion oxydative des neutrophiles est plus faible aux doses d'EPA plus élevées, limitant ainsi la production d' O_2^- .

4.1.3.2 Oméga 3 et cœur

L'impact bénéfique des ω 3 est démontré dans plusieurs situations physiopathologiques qui ont été de plus en plus décrites au cours des dernières années, notamment l'ischémie/reperfusion (L. Demaison et Moreau 2002), l'hypertrophie myocardique (McLennan et al. 2012) et les arythmies cardiaques (Charnock et al. 1991). Leurs effets cardio-protecteurs apparaissent de manière générale pour réduire la durée d'hospitalisation dans le cadre des maladies cardiovasculaires (Barbosa et al. 2010; Kazemian et al. 2012). Les ω 3-LC d'origine marine, en particulier l'EPA, se distinguent par leurs effets bénéfiques (Eclov et al. 2015). Une étude de cohorte prospective a constaté chez des patients atteints d'hémodialyse à long terme, qu'une supplémentation de 4 mois (2 gélules par jour) avec une combinaison d'EPA (900 mg) et de DHA (250 mg) permet de réduire la tension artérielle (Vernaglione, Cristofano, et Chimienti 2008). La majorité des propriétés cardioprotectrices des ω 3-LC sont dues à leurs effets anti-inflammatoires, contrairement aux ω 6 connus pour leur potentiel pro-inflammatoire en général (Calder 2017). Les ω 3-LC sont également connus pour favoriser l'intégrité des membranes mitochondriales (Sergiel et al. 1998). Dans l'alimentation occidentale, le rapport ω 6/ ω 3 des AGPI alimentaires s'élève à 15 mais il est recommandé d'avoir un rapport ne dépassant pas 4-5 (Calder 2015).

La baisse de ce rapport dans l'alimentation réduit le rapport des AGPI $\omega 6/\omega 3$ composant les phospholipides cardiaques, ce qui améliore ainsi l'activité de l'organe (Demaison et al. 1994). L'EPA associé au DHA modifie la composition en acides gras des phospholipides de la membrane mitochondriale dans les cœurs de rats sains autant que dans ceux de rats ayant subi un infarctus (O'Shea et al. 2009). Dans une revue parue récemment, Zehr et Walker mettent en avant que les AGPI $\omega 3$ améliorent la fonction endothéliale chez les humains à risque d'athérosclérose (Zehr et Walker 2018). Un régime enrichi en $\omega 3$ permet une prévention des troubles du rythme, un ralentissement du rythme cardiaque, une amélioration de la fonction contractile et de la relaxation, une diminution de la consommation d'oxygène et une résistance vis-à-vis des lésions ischémiques. Il faut cependant noter que dans des conditions ischémiques très sévères, les $\omega 3$ peuvent présenter des effets pro-arythmiques (Demaison et al. 2019). Les effets bénéfiques seraient en partie dus à une action des $\omega 3$ au niveau des transporteurs calciques et de la signalisation, en partie en jouant sur les phosphoinositides (McLennan 2014). Dans une revue parue récemment, Calder précise que l'enrichissement en EPA et en DHA au niveau des phospholipidiques des membranes cellulaires jouerait un rôle important sur les mécanismes anti-inflammatoires chez l'Homme (Calder 2017). Ces mécanismes incluent la perturbation des radeaux lipidiques et l'inhibition de l'activation de NF- κ B, réduisant ainsi l'expression des gènes inflammatoires. Parmi eux, PPAR γ apparaît comme jouant un rôle sur cette activité anti-inflammatoire. Ce récepteur est également connu pour favoriser la capacité anti-oxydante et la β -oxydation mitochondriale dans le myocarde atrial humain suite à leur activation par des $\omega 3$ d'huile de poisson (Anderson et al. 2014). Une prise alimentaire *in vivo* d'huile de poisson améliore la fonction cardiaque post-ischémique chez des rats carencés en $\omega 3$ (Peltier et al. 2006). Un enrichissement alimentaire en EPA+DHA, mais pas en ALA, limite la vasoconstriction en inhibant l'expression de TXB₂ (Duda et al. 2009). L'association de l'EPA et du DHA favorise même un retardement à l'ouverture du PTPm suite à l'augmentation matricielle de Ca²⁺ chez les animaux sains. La combinaison de ces deux $\omega 3$ -LC limite la fibrose cardiaque dans un modèle murin de rétrécissement aortique transversal tout en prévenant les dysfonctions systolique et diastolique (Chen et al. 2011). Une autre étude dans le même modèle met en avant l'effet bénéfique préférentiel de l'EPA plutôt que celui du DHA sur la fibrose cardiaque : l'EPA permet alors de limiter le remodelage cardiaque pathologique en réponse à une surcharge de pression (Eclöv et al. 2015). A l'aide de fibroblastes cardiaques en culture, Eclöv met d'ailleurs en lumière le rôle potentiel du GPR120 (aussi appelé FFR4 pour free fatty acid receptor 4) qui serait activé

par l'EPA. Cet acide gras n'aurait pas besoin de pénétrer dans les fibroblastes pour agir. Le GPR120 appartient à une famille de récepteurs couplés à une protéine G (GPR) et son activation semble prévenir l'insuffisance cardiaque (O'Connell et al. 2017). Cette famille de récepteurs présente une affinité particulière pour les acides gras : les GPR 41 et 43 pour les acides gras à chaîne courte, le GPR84 pour les chaînes intermédiaires et les GPR 40 et 120 pour les AGPI à longue chaîne.

4.1.3.3 Oméga 3 et maladies métaboliques

Ces dernières décennies, l'impact bénéfique de plusieurs nutriments, en particulier les ω 3, a été démontré en prévention primaire et secondaire du diabète et de l'obésité (Skyler 2013; Ley et al. 2014). Dans sa revue sur les effets des ω 3 dans des situations d'insuffisance cardiaque, Kazemian met en avant leur effet bénéfique dans le cadre du diabète en réduisant la durée d'hospitalisation des patients (Kazemian et al. 2012). Une augmentation du rapport ω 6/ ω 3 dans l'alimentation favorise une hausse de la prévalence de surpoids et d'obésité (Simopoulos 2016). Un rapport élevé stimule également la synthèse des eicosanoïdes dérivant de l'ARA mais un accroissement de la prise alimentaire d'EPA et de DHA permet d'inverser cet effet. Bien que l'obésité, abdominale principalement, stimule l'activité cardiaque et la fonction mitochondriale (Mourmoura et al. 2014), il est connu qu'avec le temps, l'augmentation de sa sévérité ou l'apparition d'un diabète de type 2 provoque une fatigue au niveau cardiaque qui conduit à l'insuffisance cardiaque. Une délétion des récepteurs GPR120 chez la souris et chez l'Homme conduit au développement de l'obésité (Ichimura et al. 2012). L'activation de ces récepteurs par l'EPA et le DHA permettent de réduire la prévalence de l'obésité et de l'insulino-résistance tout en luttant contre l'inflammation (Waguri et al. 2013; Oh et al. 2014). Par contre, chez des diabétiques de type 2 hypertendus, ni l'EPA ni le DHA n'ont d'effet sur l'insulinémie à jeun (Woodman et al. 2002). Une amélioration de la sensibilité à l'insuline et de la tolérance au glucose au niveau plasmatique a également été observée avec l'EPA dans le cadre de souris C57BL/6J et Ob/Ob soumises à un régime riche en graisses et en sucres (Pinel et al. 2016). Chez des individus en surpoids légèrement hyperlipidémiques et des diabétiques hypertendus de type 2, l'EPA et le DHA diminuent les isoprostanes F_2 urinaires et plasmatiques comparativement à des sujets contrôles nourris avec un régime enrichi en huile d'olive (Mori et al. 2000; Mas et al. 2010) : ceci indique une baisse du stress oxydant et de la peroxydation lipidique

in vivo. Une réduction des teneurs en isoprostanes F₂ a été associée positivement aux modifications du contrôle glycémique comme l'indiquent les taux d'HbA1c et elles ont également été reliées à une diminution du taux de TNF- α circulants chez des patients diabétiques (Mori et al. 2003). Une étude récente avec des patients atteints d'un diabète de type 2 a mis en évidence une baisse de l'indice athérogène plasmatique suite à une supplémentation en EPA à 2 g/jour pendant 8 semaines (Golzari et al. 2018). Dans cette même étude, il a été constaté que les patients supplémentés en EPA présentent une réduction importante des concentrations sérologiques en cystéine et en méthionine. Or, une corrélation positive existe entre les acides aminés aromatiques et le risque de résistance à l'insuline et de troubles cardio-métaboliques ultérieurs (Wang et al. 2011; Würtz et al. 2013; Wiklund et al. 2014).

4.1.3.4 Oméga 3 et sepsis

Une étude clinique a mis en évidence des effets bénéfiques à l'aide d'un traitement nutritionnel composé d'une émulsion lipidique d'huile de poisson (10% Omegaven) chez des patients gravement septiques (Khor et al. 2011). Une nutrition parentérale enrichie en ω 3 présente des effets bénéfiques dans des situations d'hospitalisation pour maladies graves comme le sepsis, principalement sur les effets inflammatoires. Un régime présentant un rapport AGPI ω 6/ ω 3 faible permet de réduire les complications infectieuses grâce à une diminution de l'activité nucléaire de NF- κ B (Martin et Stapleton 2010; Ott, Hiesgen, et Mayer 2011). L'huile de poisson riche en AGPI ω 3 permet aussi de réduire l'induction d'une dysbiose au niveau intestinal due à un excès de consommation d'AGPI ω 6, mais limite la déphosphorylation des LPS responsables du sepsis (Costantini et al. 2017). Le rôle anti-inflammatoire des AGPI ω 3 peut être préjudiciable en cas d'infection nécessitant une réponse inflammatoire élevée pour la survie des patients. Dans un modèle murin de colite infectieuse, Ghosh a constaté une expression ralentie de la phosphatase alcaline intestinale ce qui limite la capacité des souris nourries avec de l'huile de poisson à déphosphoryler les LPS bactériens et favorise la survenue d'un sepsis (Ghosh et al. 2013). Cependant, cette constatation a été observée au niveau du tube digestif et en cas d'atteinte grave mettant en cause la survie, mais pas au niveau cardiaque en tant que traitement préventif. Certains effets favorables des ω 3 proviennent de leurs différents médiateurs tels que les éicosanoïdes qui sont des produits de la cyclooxygénase et de la lipoxygénase. D'autres composés bioactifs dérivés des AGPI ω 3, tels que les résolvines, les protectines et les lipoxines présentent des effets intéressants, principalement au niveau des

phénomènes inflammatoires dans le cas d'infections bactériennes (Russell et Schwarze 2014). Une étude récente menée chez des patients hospitalisés pour un sepsis en unité de soins intensifs a d'ailleurs mis en évidence une corrélation importante entre les médiateurs lipidiques sanguins issus des AGPI et la survie (Dalli et al. 2017). Les AGPI ω 3 limitent également l'atteinte due à l'inflammation et améliorent la survie dans un modèle murin de sepsis (Körner et al. 2018). Ces effets sont obtenus en modulant l'activité des enzymes impliquées dans la synthèse des médiateurs lipidiques issus des AGPI, en stimulant la formation de la lipoxine A4, de la protectine DX et de la marésine 1 et en favorisant notamment la régénération tissulaire. La marésine 1 a d'ailleurs été récemment repérée comme constituant majeur permettant d'éviter la dysfonction mitochondriale en jouant sur la voie ALX/cAMP/ROS à la fois dans un modèle murin de sepsis par ligature et perforation caecales et chez des patients atteints de sepsis (Gu et al. 2018).

4.1.3.5 Controverse sur les oméga 3

De nombreuses études sur cellules, chez l'animal et chez l'Homme démontrent des effets bénéfiques de l'ingestion d'AGPI ω 3 : prévention des maladies cardiovasculaires et d'autres pathologies chroniques, stimulation du système immunitaire, défense de l'organisme grâce à des activités anti-tumorales, lutte contre l'inflammation ou maintien de la fonction mitochondriale (Larsen, Eilertsen, et Elvevoll 2011; Lepretti et al. 2018). Cependant, en parallèle, des études, des revues scientifiques et des méta-analyses pointent du doigt une absence d'effet, voire des conséquences délétères suite à un enrichissement en ω 3 dans des contextes d'immuno-nutrition, de sepsis, d'atteintes cardiovasculaires, de cancer ou de diabète (Heyland et al. 2001; Dyall 2011; Serini et al. 2011; Hooper et al. 2006; Aung et al. 2018; Li 2015; ASCEND Study Collaborative Group et al. 2018). Ces résultats sont à analyser prudemment car les effets des ω 3 sont dépendants du cas étudié, de la dose administrée, de la durée de traitement et de l'association ou non avec d'autres composés. Par exemple, l'association d'AGPI ω 3 à l'arginine dans le cadre d'une inflammation sévère ne fait apparaître aucune influence délétère mais supprime les effets anti-inflammatoires des ω 3 pourtant constatés maintes fois (Hamani et al. 2010). Li met également en avant un impact délétère des ω 3-LC dans le cadre du diabète de type 2 chez des sujets Caucasiens. Cet effet ne concerne cependant pas les individus d'origine asiatique, ce qui suggère des variations métaboliques entraînant des effets différents pour des traitements similaires (Li 2015).

Au vu du nombre considérable d'études sur les AGPI ω 3, de nombreuses revues et méta-analyses ont tenté de conclure sur leur potentiel bénéfique en particulier au niveau cardiovasculaire. Bien que certaines d'entre elles ont conclu à des effets bénéfiques et à la nécessité d'un apport régulier en AGPI ω 3, d'autres se prononcent plutôt pour une absence d'effet voire des conséquences délétères

Parmi les études en faveur des AGPI ω 3, de nombreuses méta-analyses englobant plus de 200 000 sujets mettent en avant une réduction du risque cardiovasculaire grâce à une consommation régulière en poisson. Une alimentation comportant 5 portions ou plus de poisson par semaine permet de réduire de 38% la mortalité coronarienne et le risque d'accidents vasculaires cérébraux (He et al. 2004; He et Greenland 2004). Ces effets sont en plus dose-dépendants car une consommation hebdomadaire de poisson plus faible apporte néanmoins un effet bénéfique, mais de plus faible amplitude. Une baisse respective de 15 et 17% des maladies coronariennes et de la mortalité coronarienne est observée suite à une consommation régulière de poisson (Whelton et al. 2004). Ce constat a également été mis en lumière grâce à une méta-analyse de plus de 300 000 participants (Zheng et al. 2012). Une corrélation positive entre la consommation d'AGPI ω 3-LC et une diminution de la mortalité totale, des décès dus à une insuffisance cardiaque, des accidents vasculaires cérébraux et de la mort subite a été mise en évidence dans des études avec un suivi supérieur à un an en situation de préventions primaire et secondaire (C. Wang et al. 2006). Cette méta-analyse pointe en revanche du doigt l'absence de bénéfice apporté par l'ALA et met en avant les ω 3-LC comme l'EPA. Une étude de cohorte prospective sur 23 ans avec 2622 sujets âgés de 74,4 ans en moyenne au départ met également en avant un effet bénéfique d'une alimentation riche en EPA+DPA+DHA, en EPA seul ou en DPA seul en augmentant la probabilité de vieillissement sain. Le DHA ou l'ALA seul ne présente pas le même effet positif (Lai et al. 2018). Dans une revue publiée en 2013, Lorente-Cebrián et coll. mettent en avant un impact bénéfique des ω 3-LC administrés entre 1 et 4 g par jour pendant 6 à 24 semaines sur la composition corporelle, le profil lipidique et la santé cardiovasculaire dans des situations de dyslipidémies, de syndrome métabolique, d'obésité et de diabète de type 2 (Lorente-Cebrián et al. 2013). Cependant, les études incluses dans cette revue présentent parfois une association avec des traitements médicamenteux comme les statines, des composés comme les phytostérols ou encore une activité physique régulière pouvant être impliquée dans les améliorations constatées. Une revue récente rassemblant 3

études de cohortes américaines avec un suivi de 8,3 à 11,2 ans a mis en avant l'effet bénéfique d'une augmentation du DPA et du DHA circulants sur les accidents cardiovasculaires cérébraux cardio-emboliques et athéro-thrombotiques (Saber et al. 2017). Une autre revue parue la même année se concentrant sur les essais contrôlés randomisés recommande l'utilisation de l'EPA+DHA dans la prévention secondaire suite à une maladie coronarienne ou à une insuffisance cardiaque, mais déconseille fortement une supplémentation avec ces acides gras dans les cas de la fibrillation atriale, des accidents vasculaires cérébraux ou du diabète sucré (Siscovick et al. 2017).

Au contraire, certaines études insistent sur l'absence d'effets cardioprotecteurs des AGPI ω 3. Dans l'étude Alpha-Omega (Kromhout et al. 2010), 4 837 patients ayant récemment présenté un problème cardiovasculaire ont consommé 18,8 g par jour de margarine supplémentée en EPA+DHA pendant 3,3 ans (soit un apport quotidien de 226 mg en EPA et de 150 mg de DHA), en ALA (1,9 g/jour) ou les deux. Aucun impact sur la santé cardiovasculaire n'a été observé mais ce constat reste discutable. En effet, la dose d'AGPI ω 3 apportée reste faible et la margarine est un aliment riche en AGS. De plus, certains patients présentaient un traitement aux statines et l'absence de ce traitement chez les autres sujets était caractérisé par une baisse de 50% de la plupart des événements cardiovasculaires, de manière indépendante à la supplémentation en ω 3-LC (Eussen et al. 2012). Dans l'étude DART2, 2 portions de poisson par semaine (200-400 g) ou 3 capsules/jour d'huile de poisson (510 mg + 345 mg de DHA) sur 9 ans ont été administrées. Des effets négatifs ont été observés sur la santé cardiovasculaire mais il a été constaté que ces résultats sont accrus lors d'un traitement avec certains médicaments utilisés en situation d'altération de la fonction cardiovasculaire tels que les β -bloquants ou la nifédipine (Michael L. Burr 2007).

Enfin, d'autres études mettent plutôt en avant un effet neutre des AGPI ω 3 (D. J. Hunter et al. 1988; Ascherio et al. 1995). Un apport trop faible a probablement contribué à cette absence d'effet comme dans l'étude d'Ascherio où la consommation médiane en ω 3 totaux était de 0,58 g/jour. L'interaction avec d'autres nutriments tels que les acides gras saturés peut également être mise en cause (Massaro et al. 2008). Un impact de la formulation des ω 3 et de la méthode de préparation de l'aliment peut également jouer comme dans l'étude de Mozaffarian où le poisson frit ne présente pas les mêmes avantages au niveau cardiaque que le poisson grillé (Mozaffarian et al. 2003). Une méta-analyse récente ciblée sur de larges études cliniques

randomisées regroupant 77 917 sujets suivis pendant au moins 1 an conclut l'absence d'amélioration de la santé cardiovasculaire suite à une consommation en EPA comprise entre 226 et 1800 mg par jour (Aung et al. 2018). Cependant, cette méta-analyse rassemble des études où les ω 3-LC sont administrés à des doses variables et jamais élevées mais aussi soit seuls ou en association avec d'autres nutriments ou traitements médicamenteux. Deux méta-analyses ont également étudié les effets potentiellement cardioprotecteurs d'une supplémentation en AGPI ω 3-LC (Kwak et al. 2012; Rizos et al. 2012). L'étude de Kwak regroupe 20 485 patients avec des antécédents cardiovasculaires et recevant entre 0,4 et 0,8 g d'EPA+DHA par jour. Aucun effet des AGPI ω 3 n'a été constaté. Ce papier a été critiqué au vu de l'inclusion d'études cliniques au suivi court uniquement, ce qui limite évidemment l'apparition d'effets significatifs. Cette méta-analyse a aussi été critiquée au vu de l'exclusion de l'étude GISSI pourtant reconnue comme un essai de référence (F. B. Hu et Manson 2012). L'étude de Rizos regroupant plus de 68 600 personnes a elle-aussi conclut à l'absence d'effet bénéfique des ω 3-LC sur la mortalité cardiovasculaire et même sur la mortalité toutes causes confondues malgré l'administration d' ω 3-LC sur une période de plus d'un an. Cependant, cette méta-analyse s'est concentrée sur des patients en prévention secondaire dont la supplémentation en ω 3-LC était associée à des traitements médicamenteux qui ont pu bloquer les effets bénéfiques des ω 3-LC, comme le montre l'utilisation de statines (Eussen et al. 2012). L'étude SU.FOL.OM3 impliquant 2 501 patients sur 4,7 ans avec une supplémentation quotidienne en EPA+DHA (400 mg EPA + 200 mg DHA) n'a également pas conclu à un effet bénéfique des ω 3. Il est important de noter que dans cette étude, les ω 3-LC ont parfois été associés à de la vitamine B ce qui a pu inhiber les effets bénéfiques potentiels des ω 3-LC. D'autres études ont associé une autre vitamine, la vitamine E, avec les AGPI ω 3. Ceci peut expliquer les effets neutres ou délétères des ω 3, en particulier par rapport au stress oxydant car la vitamine E et les oméga 3 sont connus pour être délétères dans des situations de stress oxydant intense (« Dietary Supplementation with N-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Vitamin E after Myocardial Infarction: Results of the GISSI-Prevenzione Trial. Gruppo Italiano per Lo Studio Della Sopravvivenza Nell'Infarto Miocardico » 1999; Alves Luzia et al. 2015; Li et al. 2019).

Malgré les controverses constatées généralement dues à des différences dans les protocoles et les sujets étudiés, Mozaffarian et Wu montrent dans une revue récente que les patients atteints de maladies cardiovasculaires sont désormais bien plus sensibilisés aux bienfaits d'une alimentation riche en poissons gras et donc en ω 3-LC (Mozaffarian et Wu

2011). C'est pourquoi, même les sujets des groupes témoins peuvent présenter un apport en ω 3-LC conséquent ce qui limite la possibilité de mettre en avant des différences significatives avec les groupes de patients et donc de démontrer un effet bénéfique de ces acides gras. Malgré cela, les recommandations nationales et internationales ont convergé vers des conseils cohérents pour que la population générale consomme au moins 2 portions de poisson gras par semaine ou au moins 250 mg/jour d'AGPI ω 3 à longue chaîne. Une revue récente rassemblant des études randomisées de supplémentation en EPA+DHA (< 6 g/jour) et des études prospectives larges (> 1000 individus avec un suivi de plus de 3 ans) conclut également à un effet cardioprotecteur de ces ω 3-LC avec un apport quotidien entre 200 et 300 mg (Trikalinos et al. 2012). Ces recommandations ont d'ailleurs été confirmées récemment par une étude de l'American Heart Association qui indique que 1 à 2 repas de fruits de mer par semaine devraient être inclus pour réduire le risque d'insuffisance cardiaque congestive, de maladie coronarienne, d'accident ischémique cérébral et de mort subite (Rimm et al. 2018). Ces effets bénéfiques sont surtout constatés lorsque les fruits de mer remplacent la consommation d'aliments moins sains. En France, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail recommande 250 mg d'EPA, 250 mg de DHA associés à l'ingestion de 1% d'ALA par rapport à l'apport énergétique total.

Une notion essentielle à prendre en compte dans un traitement préventif ou curatif par les ω 3 est la sévérité de la pathologie et, en particulier, l'intensité du stress oxydant. Bien que les ω 3 présentent un rôle de découplant naturel au niveau mitochondrial limitant la production de ROS (Korshunov et al. 1998), ceci n'est pas valable dans toutes les situations. C'est le cas lors d'un stress oxydant important conduisant à une forte peroxydation des phospholipides cardiaques, surtout s'ils sont riches en ω 3, favorisant ainsi une perméabilité membranaire accrue et délétère pour la survie de la cellule (Al-Gubory 2012). En situation de dommages cellulaires modérés, les ω 3 montrent des effets cardio-protecteurs (Demaison et al. 2019). Cependant, en conditions d'ischémie/reperfusion sévère, les ω 3 présentent des propriétés pro-arythmiques (Luc Demaison et al. 2013). En présence d'un stress oxydant important, les ω 3-LC sont fortement peroxydés conduisant alors à une fragilisation des membranes et favorisant l'accroissement des dégâts cellulaires. Il est toutefois intéressant de noter que beaucoup des revues et méta-analyses concluant sur le potentiel bénéfique apporté par les AGPI ω 3 ne présentent généralement pas les paramètres du stress oxydant. Or, la majorité des situations étudiées (insuffisance cardiaque, maladies coronariennes, obésité, diabète, etc.) sont

accompagnées d'un stress oxydant plus ou moins sévère. En revanche, le niveau de stress oxydant peut influencer les effets des AGPI ω 3 car il est connu que ces acides gras sont très sensibles à l'attaque radicalaire (Albert et al. 2013). La peroxydation des AGPI ω 3 pourrait neutraliser leurs effets bénéfiques leur conférant même quelques fois des propriétés nocives. Comme nous l'avons précisé préalablement, certaines associations (AGPI ω 3 et vitamine E, AGPI ω 3 et arginine) peuvent favoriser la peroxydation lipidique des lipides membranaires ou inhiber l'action anti-inflammatoire des ω 3 (« Dietary Supplementation with N-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Vitamin E after Myocardial Infarction: Results of the GISSI-Prevenzione Trial. Gruppo Italiano per Lo Studio Della Sopravvivenza Nell'Infarto Miocardico » 1999; Alves Luzia et al. 2015; Li et al. 2019; Heyland et al. 2001; Hamani et al. 2010). L'inflammation et le stress oxydant sont deux phénomènes intimement liés qui jouent sur la détérioration de la santé cardiovasculaire (Richter et al. 1995).

Au vu de ces nombreuses controverses sur le bénéfice des AGPI ω 3 et principalement des ω 3-LC sur la santé cardiovasculaire, des études supplémentaires doivent être réalisées. Ceci vaut également pour les revues et méta-analyses où les critères d'inclusion doivent être très sélectifs afin de comparer des études les plus similaires possibles et pouvoir conclure de manière scientifiquement fiable sur l'effet des AGPI ω 3. Il apparait donc nécessaire que les revues et méta-analyses classent les études en fonction du niveau de stress oxydant. Il faut également déterminer chez l'animal les effets des AGPI ω 3 en fonction de l'intensité du stress oxydant et de l'inflammation. Dans des situations où les systèmes antioxydants endogènes sont défaillants, un apport exogène d'antioxydants est nécessaire. Cependant, le type d'antioxydant et la dose administrée doivent être adaptés en fonction de la pathologie.

4.2 Nutrition et antioxydants

Dans des conditions où les systèmes antioxydants de l'organisme sont insuffisants, l'apport de nutriments antioxydants constitue une alternative intéressante. Les antioxydants retrouvés dans la nature et l'alimentation sont nombreux (Ratnam et al. 2006).

4.2.1 Exemples d'antioxydants alimentaires

Les caroténoïdes sont connus pour donner la couleur orangée/rouge à de nombreux aliments. Cette famille comprend par exemple le β -carotène retrouvé dans les courges, notamment la citrouille, ou encore le lycopène présent dans le pamplemousse rose et les tomates. Ce dernier agit en piégeant l'oxygène singulet correspondant à un état métastable et donc excité de la molécule de dioxygène.

La vitamine C, trouvée dans de nombreux fruits ou les poivrons, est connue pour permettre le piégeage de O_2^- par formation d'un radical semi-hydroascorbate qui est ensuite réduit par la GSH.

La vitamine E, quant à elle, est très abondante dans les huiles végétales (soja, maïs, tournesol) et les fruits oléagineux comme les noix et les amandes. Elle favorise le piégeage direct de O_2^- , la stimulation de l'activité des enzymes antioxydantes endogènes et l'inhibition de la peroxydation lipidique.

Le CoQ10 est retrouvé dans le saumon ou le thon. Il permet l'inhibition de la peroxydation des lipides et réduit le stress oxydant mitochondrial. Cet agent antioxydant et la vitamine E sont d'ailleurs retrouvés dans le colza et plus précisément dans son huile.

L'huile de colza, riche en ALA, présente un autre composé aux propriétés antioxydantes : le 4-vinyl-2,6-diméthoxyphénol, communément appelé le canolol. Ce phénol est obtenu suite à la décarboxylation de l'acide sinapique qui présente lui aussi des propriétés antioxydantes. Le bienfait de ces composés dans la lutte contre le stress oxydant a été constaté sur la fonction cardiaque dans des situations d'altérations métaboliques (Zern et Fernandez 2005; Devaraj et al. 2008; Xu et al. 2011; 2013; 2014).

L'acide ellagique est un composé phénolique naturel contenu dans le raisin, les noix, les fraises, les cassis, les framboises, les grenades et le thé vert. Il présente des avantages dans l'inhibition de l'activation ROS-dépendante de la voie inflammatoire NF-kB et de l'apoptose (Edderkaoui et al. 2008; Salimi et al. 2015). Il prévient également l'altération mitochondriale et limite la production de ROS issue de ces organites (Hwang et al. 2010).

Les polyphénols constituent certainement la famille d'antioxydants la plus richement représentée. Ils sont retrouvés dans le raisin ou les fruits rouges en général pour le resvératrol ou encore dans le thé vert pour les catéchines. Leurs bénéfices ont été plusieurs fois démontrés au niveau cardiaque (Pataki et al. 2002; Testai et al. 2013; Sun et al. 2018).

4.2.2 Effets antioxydants du thé vert

Outre les antioxydants cités précédemment, le thé vert présente un intérêt majeur chez l'Homme dans la prévention et le traitement de pathologies comme le cancer (Yu et al. 2014), la maladie de Parkinson, l'arthrite, le diabète (Khan et Mukhtar 2013) ou les atteintes cardiovasculaires (Velayutham, Babu, et Liu 2008). Une baisse de la mortalité globale a été observée suite à la consommation quotidienne moyenne de 4 tasses de thé alors que les effets protecteurs sur la mort par atteinte cardiovasculaire sont constatés pour 2 à 3 tasses par jour (Zhang et al. 2015) (Figure 30).

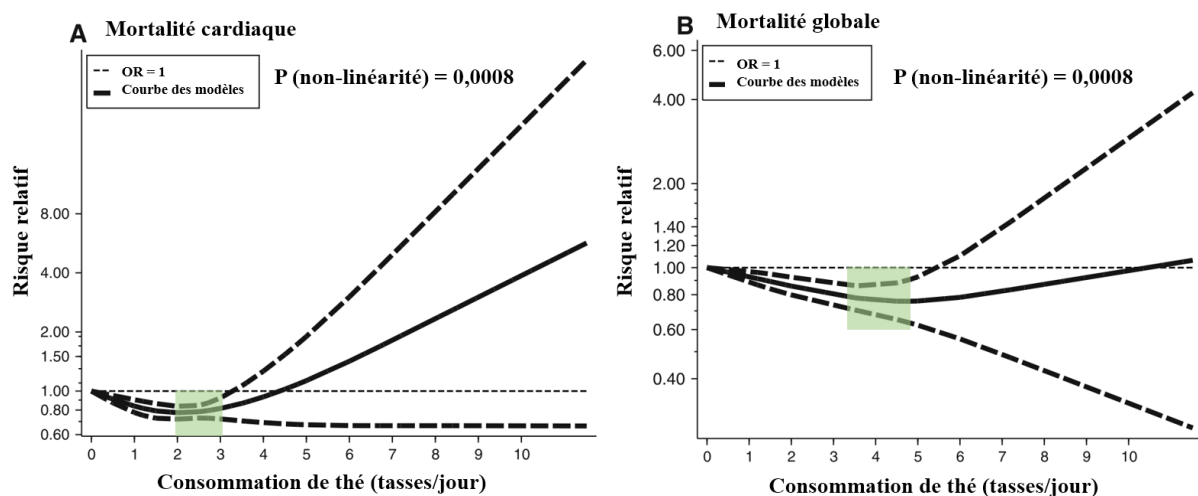


Figure 30 : Relation entre la consommation quotidienne de thé et la mortalité. (A) Mortalité par atteinte cardiaque ; (B) Mortalité globale ; Trait plein : courbe des modèles correspondant à la consommation moyenne en thé vert dans les études ; Carré vert : zone préférentielle pour le nombre de tasses de thé quotidien apportant un effet bénéfique. (Source : d'après Zhang, Eur J Epidemiol., 2015).

Les effets bénéfiques du thé vert sont principalement associés à son activité antioxydante. Celle-ci survient de 2 façons complémentaires : i) par la stimulation des mécanismes endogènes de lutte contre le stress oxydant comme la SOD, la GPx et la catalase ;

et ii) par l'inhibition des enzymes à l'origine de la production des ROS et des RNS telles que la NOX, la LOX, la COX, la xanthine oxydase ou encore l'iNOS (Bhardwaj et Khanna 2013). Outre ses effets antioxydants, le thé vert a le potentiel d'inhiber la voie NF-kB, de limiter la libération de cytokines pro-inflammatoires et de réduire les peroxydes lipidiques dans le cœur en situation de diabète ou de cancer (Babu, Sabitha, et Shyamaladevi 2006b; Babu et Liu 2008). Ces effets sur la peroxydation des acides gras ont été démontrés pour une consommation quotidienne comprise entre 0,6 et 1,5 litres de thé vert (Ellinger et al. 2011). Le thé vert permet également de réduire le taux circulant de protéine C réactive chez des patients atteints d'un diabète de type 2 (Asbaghi et al. 2019). Les propriétés antioxydantes du thé vert sont dues à la présence de polyphénols appelés les catéchines ou flavanols, appartenant à la famille des flavonoïdes (Heim, Tagliaferro, et Bobilya 2002). Les flavonoïdes auxquels appartiennent les catéchines sont également capables d'inhiber directement le stress oxydant en piégeant l'O₂⁻ et les peroxydites (J. P. Hu et al. 1995; Haenen et al. 1997).

4.2.3 Autres actions du thé vert sur la santé cardiovasculaire

Outre leurs actions anti-oxydantes, les catéchines permettent de réduire la mobilisation excessive de Ca²⁺ intracellulaire, la libération d'ARA et l'activité de la synthase du TXA₂ limitant alors la coagulation sanguine (Velayutham, Babu, et Liu 2008) (Figure 31). Il a également été démontré qu'un extrait de thé vert limitait la rigidité cardiaque induite par une hypersensibilité calcique des myofibrilles et favorisait la relaxation du myocarde dans un modèle murin de cardiomyopathie restrictive (Wang et al. 2016). Les catéchines sont également capables de stimuler la eNOS, favorisant ainsi la santé cardiovasculaire en stimulant la relaxation musculaire et la vasodilatation (Moore, Jackson, et Minihane 2009). Le thé vert présente également des propriétés hypoglycémiantes et hypolipémiantes (Vinson, Teufel, et Wu 2004; Wolfram et al. 2006). En 2006, Babu a mis en lumière une limitation de la dyslipidémie, de la peroxydation lipidique et de la glycation protéique grâce au thé vert (Babu, Sabitha, et Shyamaladevi 2006a). Ces observations étaient associées à une atténuation de la concentration calcique intracellulaire grâce à la modulation de l'activité de la Ca²⁺-ATPase et de la Na⁺/K⁺-ATPase qui sont stimulées dans le cadre du diabète. Le thé vert améliore la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline dans des modèles animaux d'obésité (Ortsäter et al. 2012; Jang, Ridgeway, et Kim 2013).

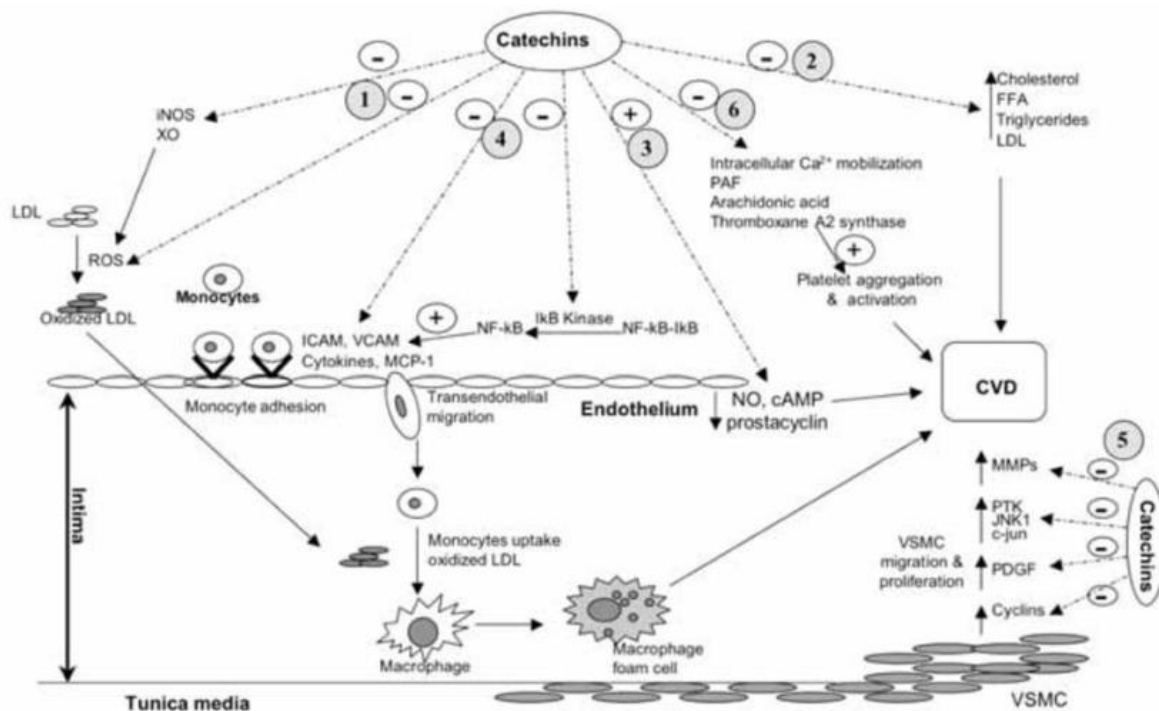


Figure 31 : Mécanismes impliqués dans l'effet cardioprotecteur des catéchines. (1) les catéchines réduisent le stress oxydatif induit par les ROS et l'oxydation des LDL en piègeant les radicaux libres et en inhibant les enzymes pro-oxydantes ; (2) elles augmentent l'excrétion des lipides intestinaux et réduisent le cholestérol, les acides gras et l'absorption des triglycérides ainsi que leur synthèse ; (3) elles peuvent stimuler la production endothéliale de NO, de prostacycline et de cAMP ; (4) elles empêchent l'adhésion des monocytes à l'endothélium par inhibition de la voie NF-kB et de la production des cytokines inflammatoires et des molécules d'adhésion ; (5) elles inhibent les cyclines, PDGF, PTK, JNK1, C-jun et MMPs ; (6) enfin, elles peuvent également réduire l'agrégation et l'activation plaquettaire en diminuant la mobilisation intracellulaire du calcium, la libération de PAF et d'acide arachidonique et la thromboxane A2 synthase. (Source : Velayutham, Curr Med Chem., 2008).

4.2.4 Effets spécifiques de certains composés du thé vert

Le composé majeur des catéchines du thé est le gallate d'épigallocatechine (EGCG) qui présente de nombreux bénéfices au niveau cardiovasculaire. En 2014, Liu a mis en évidence l'atténuation de la dysfonction mitochondriale cardiaque et de l'autophagie induites par le diabète en administrant de l'EGCG à des rats Goto-Kakizaki (Liu et al. 2014). Des rats soumis à une ischémie de 30 minutes suivie d'une phase de reperfusion de 2 heures présentent une diminution de la taille de l'infarctus suite à l'injection intraveineuse de 10 mg/kg d'EGCG (Kim et al. 2014). Ce constat s'accompagne d'une hausse de la phosphorylation d'Akt

et de GSK-3 β impliqués dans la récupération des lésions de reperfusion, mais également d'une réduction de celles de p38 et de JNK qui jouent un rôle dans les phénomènes d'apoptose. Dans un modèle d'hypertrophie cardiaque déclenchée par rétrécissement aortique abdominal, Sheng a montré que 100 mg/kg d'EGCG injectés en intragastrique favorisent l'activité de la SOD et limitent la teneur en MDA indiquant un amoindrissement de la peroxydation lipidique (Gu et al. 2018). Ceci permettrait d'inhiber l'apoptose des cardiomyocytes tout en empêchant le raccourcissement des télomères et la perte du facteur 2 de liaison répétée au télomère (TRF2) constatés dans ce modèle d'hypertrophie cardiaque. La délétion de la SOD2 mitochondriale induit une insuffisance cardiaque congestive progressive. Dans un modèle de souris SOD2^{-/-}, il a été constaté que l'administration orale d'EGCG (100 mg/L) pendant 8 semaines abaisse les niveaux de stress oxydant myocardique et d'acides gras libres circulants par rapport au groupe contrôle (Oyama et al. 2017). Ce dernier présente une mortalité élevée, un remodelage cardiaque caractérisé par une dilatation excessive, une contractilité réduite, un raccourcissement des télomères et une baisse de l'activité de la télomérase. Ces modifications ne sont pas perçues dans le groupe traité avec l'EGCG indiquant que le polyphénol réduit le taux de mortalité, l'inflammation, le raccourcissement des télomères et favorise le maintien de la fonction cardiaque.

L'épicatéchine est une autre catéchine trouvée dans le thé qui est également présente dans les pommes et le cacao. Il a été constaté qu'elle réduit l'activité de l'antiport échangeur de Na⁺/H⁺ (NHE1) érythrocytaire de 93% chez des individus sains et de plus de 85% chez des patients atteints d'un diabète de type 1 ou 2 (Matteucci, Rizvi, et Giampietro 2001). L'inhibition de NHE1 a été considérée comme cardio-protectrice en limitant la surcharge calcique liée à NCX1 (Karmazyn, Sostaric, et Gan 2001).

Il est intéressant de noter que tous les effets bénéfiques du thé vert ne sont pas forcément dus à la présence des catéchines. En effet, il a été constaté que la 1,3,7-triméthylxanthine, mieux connue sous le nom de théine ou caféine, améliore la fonction cardiaque et la survie au cours des 96h suivant l'induction d'un sepsis par ligature et perforation caecale dans un modèle de rats Sprague-Dawley (Verma et al. 2009). Ceci est associé à la restauration de l'activité de la cytochrome c oxydase mitochondriale au niveau du myocarde.

Chapitre 2 : Objectifs & Stratégies

Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité au monde. De plus, de nombreuses pathologies sont associées ou évoluent vers une altération de la fonction cardiaque. Ces atteintes du myocarde ne concernent pas uniquement la morphologie du cœur ou la contractilité mais devraient également affecter la fonction mitochondriale. Une des causes principales de ces atteintes est le développement d'un stress oxydant de plus en plus sévère. En parallèle, les AGPI $\omega 3$ ont montré des effets cardio-protecteurs intéressants dans de nombreuses situations d'agressions. Cependant, leur impact bénéfique semble modulé par le niveau de stress oxydant.

L'objectif principal de ma thèse est donc double. Tout d'abord, il consiste à étudier les situations où les $\omega 3$ présentent ou non des effets bénéfiques sur la santé cardiovasculaire en fonction du niveau de stress oxydant à l'aide de modèles animaux. Ensuite, il paraît nécessaire de déterminer si l'association avec un antioxydant permet de maintenir l'impact bénéfique de ces acides gras malgré un stress oxydant conséquent.

Dans un premier temps, je me suis intéressé à l'association des $\omega 3$ avec des composés antioxydants (association vitamine E + coenzyme Q10 (CoQ10) et canolol) dans le cadre d'un modèle animal soumis à un régime obésogène associé ou non à l'ingestion d'huile de colza riche en ALA. Cette étude a mis en avant un effet pro-oxydant de l'association vitamine E + CoQ10 administrée à forte dose. Cette fortification stimule la fibrose myocardique en augmentant l'expression du récepteur 1b à l'angiotensine 2 (Ag2R-1b). L'influence cardio-protectrice du canolol a cependant été mise en avant en annulant l'impact délétère de l'association vitamine E + CoQ10 suite à la normalisation des taux d'expression de l'Ag2R-1b et de la SOD2. De plus, le canolol a permis d'annuler l'augmentation des triglycérides plasmatiques induite par l'association. Les détails de cette étude sont consultables dans la **Publication n°1**.

L'obésité est connue pour être un facteur de risque du syndrome métabolique voire du diabète de type 2 qui s'accompagne d'une hyperglycémie favorisant le développement d'un stress oxydant. Le second objectif de ma thèse consiste à déterminer les effets cardiovasculaires de l'EPA, d'un extrait de thé vert ou de l'association des deux dans un contexte de stress oxydant sévère et chronique induit par un diabète sucré. Des rats Wistar ont été répartis en 5 groupes en fonction du régime assigné pendant 9 semaines : soit un régime normo-lipidique, soit un régime riche en graisses saturées (high-fat ou HF) enrichi ou non par de l'EPA, un extrait de thé vert ou l'association des deux composés. Après 3 semaines de régime, les animaux sous régime HF ont subi une injection unique de streptozotocine (33 mg/kg) afin de déclencher un diabète sucré associé à une hyperglycémie et à l'apparition d'un stress oxydant important. Dans le contexte du diabète, l'enrichissement en thé vert seul a amélioré la fonction cardiaque et a limité plusieurs troubles liés au diabète, en particulier l'inflammation, la réactivité coronaire et le métabolisme des lipides. En revanche, l'EPA administré seul a entraîné un accroissement radical et rapide de la mortalité des animaux. Cet effet a été compensé par l'association avec l'extrait de thé vert. La combinaison des deux enrichissements améliore considérablement la réactivité coronaire, beaucoup plus que dans le cas du thé vert seul. Les éléments de ce travail sont précisés dans la **Publication n°2** (en cours de soumission).

L'insuffisance cardiaque induite par de nombreuses situations pathologiques est associée à une dysfonction mitochondriale reliée au stress oxydant. L'altération de l'activité contractile du cœur n'apparaît pas dès l'initiation de l'agression mais plus tardivement. Le sepsis constitue un bon exemple de ce phénomène. En effet, l'évolution du sepsis passe par une phase hyperdynamique de stimulation de la fonction cardiaque avant de conduire à la phase hypodynamique caractérisée par la défaillance cardiaque. Notre hypothèse suppose que l'atteinte mitochondriale survient à un stade précoce et qu'elle favorise l'installation ultérieure de la défaillance cardiaque. Pour vérifier cela, nous avons tout d'abord mis en place un modèle de sepsis précoce obtenu par une ligature et une double perforation cæcales. Les paramètres de la fonction cardiaque ont été évalués *in vivo* grâce à une sonde Millar et *ex vivo* dans le cœur isolé perfusé selon la méthode de Langendorff. Les paramètres du stress oxydant et de l'inflammation aux niveaux sanguin et tissulaire ont également été mesurés. Ce travail a confirmé l'absence de dysfonction mécanique cardiaque et de stress oxydant malgré une stimulation de l'inflammation, validant alors notre modèle. L'étude détaillée est reportée dans la **Publication n°3**.

Le régime de type occidental est caractérisé par une déficience en AGPI ω 3. Les ω 3, en particulier l'EPA, sont connus pour apporter une protection vis-à-vis des dysfonctionnements cardiaques et de la létalité liée au sepsis. C'est pourquoi, nous avons évalué l'impact d'un enrichissement en EPA *versus* un régime carencé en ω 3 sur les paramètres mécaniques et mitochondriaux de l'activité cardiaque chez des rates opérées fictivement ou dans le but de déclencher un sepsis précoce et peu sévère. Les résultats obtenus ont confirmé l'absence d'altération mécanique cardiaque malgré une atteinte mitochondriale précoce chez les animaux carencés en ω 3. En revanche, le régime EPA a permis de maintenir l'oxydation phosphorylante et de limiter la production de ROS au niveau mitochondrial. Ces effets sont reliés à la stimulation de l'expression de deux protéines mitochondriales majeures : la Sirt3 et l'UCP3. Les détails de cette expérimentation sont consultables dans la **Publication n°4**.

Au vu des résultats positifs constatés suite à un enrichissement en EPA, les perspectives ont consisté à mettre en place une étude clinique afin d'évaluer l'effet de l'association de cette AGPI et d'un antioxydant, potentiellement le thé vert, sur les atteintes cardiaque et mitochondriale induites par l'obésité et l'endocardite aiguë. Une recherche bibliographique poussée a montré que les études fonctionnelles sur les mitochondries cardiaques humaines sont rares, surtout lorsque ces organites sont extraits à partir de tissu frais, avec des mitochondries généralement altérées par la méthode d'extraction. Pour mener à bien notre projet, trois étapes sont nécessaires. Premièrement, adapter notre méthode d'extraction du cœur de rat au tissu myocardique humain. Les détails de ce protocole basé sur une extraction du tissu atrial et son application préliminaire dans l'évaluation de l'impact de l'obésité sur la fonction mitochondriale sont décrits dans la **Publication n°5** (en cours de soumission). Une fois cette phase terminée, l'étape suivante consistera à étudier les effets de l'obésité et de l'endocardite aiguë sur les mitochondries cardiaques humaines. Ce projet fait l'objet d'un essai clinique (numéro d'identification sur ClinicalTrial.gov : NCT03690076). La dernière étape correspondra à la perspective finale consistant à déterminer les effets de l'EPA associé à un antioxydant sur les modifications du métabolisme mitochondrial constatées dans ces deux situations et la mise en évidence des mécanismes impliqués.

Chapitre 3 : Principales méthodes d'étude employées

3.1 Cœur isolé perfusé selon la méthode de Langendorff

Après une thoracotomie rapide, le cœur est immédiatement recueilli et placé dans un tampon salin à 4°C. Le schéma de la méthode est présenté dans la [Figure 32](#). Dans la première minute après l'ablation, le cœur est perfusé par l'aorte à 37°C avec un tampon Krebs-Heinselett afin d'éviter des problèmes de dommages cellulaires et de préconditionnement. Le fluide de perfusion est composé de (en mM) NaCl (119), KCl (4,8), MgSO₄ (1,6), NaHCO₃ (22), KH₂PO₄ (1,2), CaCl₂ (1,8), D-glucose (11) et hexanoate de sodium (0,5), pH 7,4. Le cœur maintenu à 37°C est constamment oxygéné avec du carbogène (95% O₂, 5% CO₂). Il est constamment perfusé à l'aide d'une pompe péristaltique (Gilson, Middleton, USA) permettant de maintenir le débit de perfusion constant jusqu'à la fin de l'expérimentation. Dès la cinquième minute de perfusion, le cœur est stimulé électriquement à un rythme de 370 battements par minute. Pour évaluer l'activité mécanique cardiaque, un ballon en latex est inséré dans le ventricule gauche. Il est relié à une sonde de pression et à un amplificateur. Le ballon est gonflé jusqu'à ce que la pression diastolique atteigne la valeur de 10 mmHg. Le système permet d'évaluer les pressions systolique, diastolique et développée ainsi que la fréquence cardiaque, la contraction (dP/dt max) et la relaxation (dP/dt min). L'évaluation de ces deux derniers paramètres est rendue possible par l'emploi de conditions de perfusion parfaitement normalisées. La pression coronaire est également évaluée à l'aide d'une sonde de pression insérée juste avant la canule aortique. Les modifications de la pression coronaire révèlent des variations du volume vasculaire (dilatation, constriction et/ou oblitération des vaisseaux coronariens). Tous les paramètres de la fonction cardiaque sont enregistrés et analysés avec le logiciel HSE (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Allemagne).

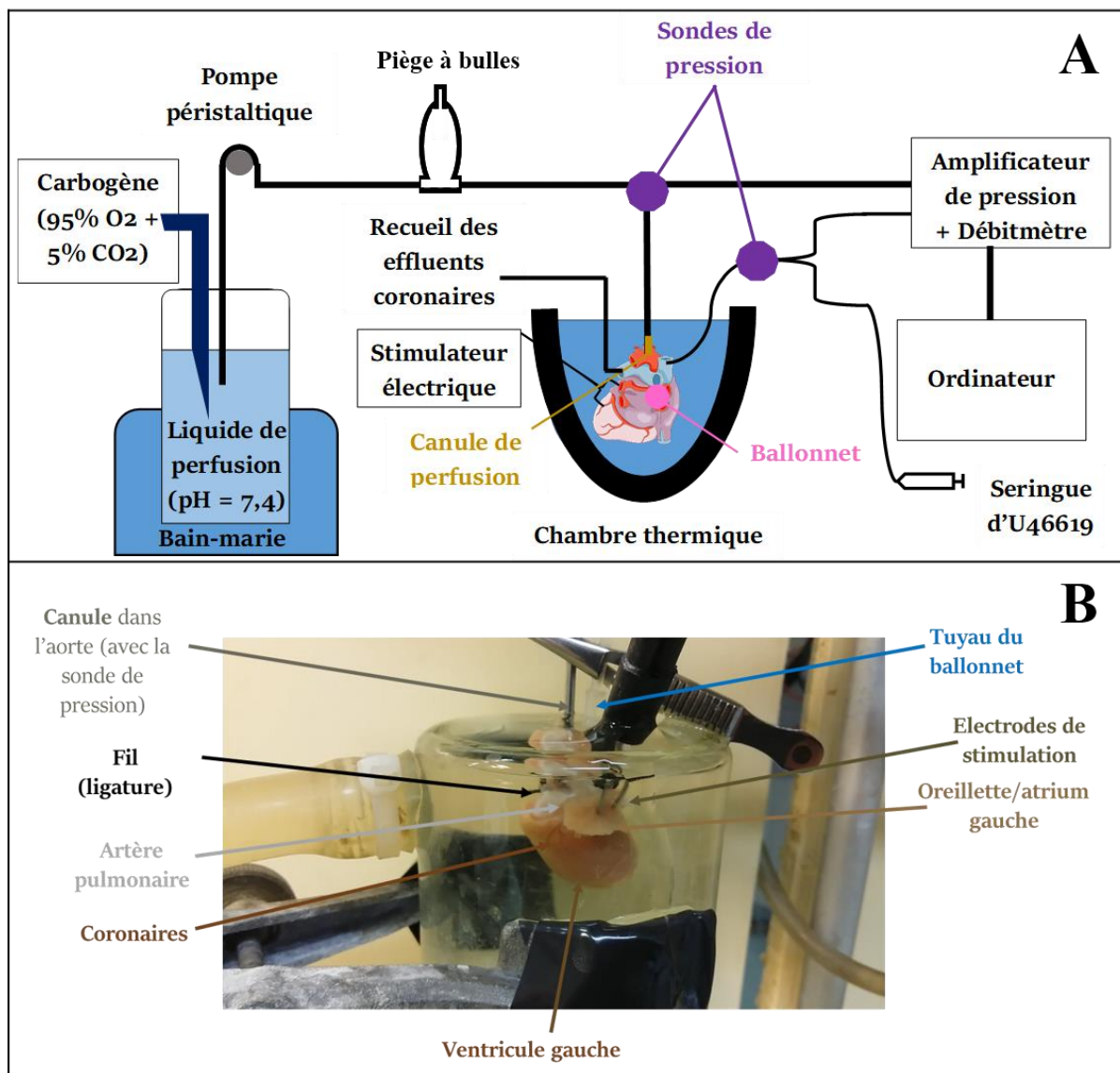


Figure 32 : Représentation du système de cœur isolé selon la méthode de Langendorff en débit imposé. (A) Schéma du système de cœur isolé perfusé ; (B) Visualisation de l'installation du cœur dans la chambre thermique. (Source : Thibault Leger)

3.2 Réactivité coronaire

Cette mesure est effectuée dans le cœur isolé perfusé selon la méthode de Langendorff. Après l'évaluation de l'activité mécanique, le tonus coronarien est augmenté par infusion constante d'un agent vasoconstricteur analogue du thromboxane A₂, l'U46619 (30 nM), près de la canule aortique à un taux ne dépassant jamais 1,5% du débit coronaire. Ceci permet l'obtention d'une pression coronaire supérieure à 100 mmHg. Le potentiel de vasodilatation est alors évalué à l'aide de deux agents injectés à des doses croissantes : l'acétylcholine (10, 20, 30 et 40 pmol) et le sodium nitroprusside (100, 200, 300, 400 et 500 pmol) (Figure 33).

Les vasodilatations induites par l'acétylcholine (Ach) et le sodium nitroprusside (SN) reflètent respectivement la vasodilatation endothéliale-dépendante due aux activités simultanées des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses et la vasodilatation endothéliale-indépendante due à la relaxation des cellules musculaires lisses.

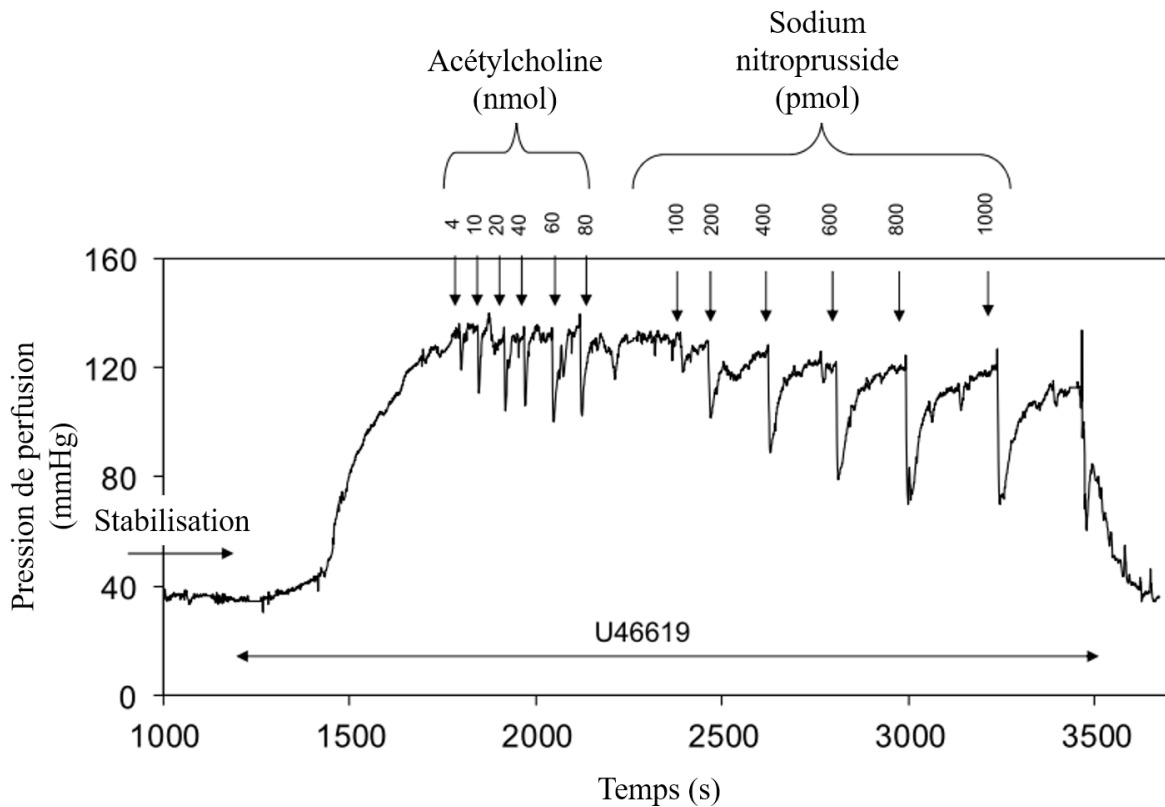


Figure 33 : Schéma théorique de la courbe de réactivité coronaire. Après une période de stabilisation, l'agent vasoconstricteur U46619 est injecté de manière continue. L'ajout des agents vasodilatateurs (acétylcholine et sodium nitroprusside) en concentrations croissantes permet d'évaluer la réactivité coronaire. Les injections de ces composés sont arrêtées quand un phénomène de saturation de la vasodilatation est atteint. (Source : Thibault Leger)

L'amplitude de la dilatation est calculée par le rapport entre la diminution maximale de la pression coronaire et la pression coronaire mesurée juste avant l'injection des agents vasodilatateurs. Comme le poids du cœur et le volume coronaire sont soumis à des variations intra et intergroupes, une correction est effectuée pour normaliser la fonction d'entrée des agents vasodilatateurs en fonction du flux coronarien. La courbe dose-réponse entre la quantité d'Ach injectée et la vasodilatation endothéliale-dépendante est ensuite ajustée à un polynôme de 3^{ème} degré pour chaque cœur, ce qui permet de réaliser les analyses statistiques. Dans le cas de la vasodilatation endothéliale-indépendante, les courbes sont adaptées à une fonction

logarithmique népérienne. De plus, l'activité vasodilatatrice des cellules endothéliales (AVCE) est également estimée à partir des vasodilatations endothéliale-dépendante et -indépendante ajustées. Pour chaque cœur et chaque dose d'Ach injectée, la quantité de SN (reflétant la quantité d'agent vasodilatateur) nécessaire pour obtenir le même pourcentage de dilatation induite par l'Ach a été extraite de la courbe de vasodilatation endothéliale-indépendante selon la formule : $(AVCE) = e^{[(\% \text{ Ach-dilatation}-b)/a]}$, où a et b sont les coefficients de la courbe de vasodilatation endothéliale-indépendante théorique. Les résultats sont exprimés en picomoles-équivalents de SN.

3.3 Imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM)

La morphologie et la fonction cardiaque ont été évaluées par IRM à la plateforme AgroResonance de l'INRA de Theix. Après anesthésie à l'isoflurane (induction : 4%, maintien : 2%), les mesures ont été effectuées à l'aide d'un aimant de 11,7 Tesla adapté aux animaux de petits calibres. Cet aimant provoque un alignement de tous les atomes d'hydrogène (^1H) selon son axe. Une stimulation par onde radio est imposée pour la mise en résonance de ces atomes. Cet état permet leur mise en phase et favorise une rotation synchrone du proton de l'hydrogène. Il permet également d'imposer un angle entre leur axe de rotation et l'axe de l'aimant. Lorsque l'onde radio est stoppée, les atomes d'hydrogène reviennent dans l'axe de l'aimant et se déphasent, entraînant alors l'émission de l'énergie qui leur a été artificiellement apportée (Figure 34). Le signal, perçu par un détecteur adapté, dépend du tissu considéré et il permet d'obtenir une acquisition en temps réel de l'image du cœur en mouvement selon un certain plan de coupe. L'acquisition pour chaque plan de coupe transversal a duré environ 8 minutes : elle a permis l'obtention d'une cinétique du mouvement cardiaque pendant 2 secondes à une résolution de $0,2 \times 0,2 \times 1 \text{ mm}^3$. Les plans de coupe étudiés ont été séparés de 1 mm sur toute la longueur du cœur, ce qui représente 10 à 12 plans de coupe par cœur. La durée d'acquisition s'est donc élevée à environ 2 heures pour chaque animal. Le traitement informatique de l'ensemble des plans de coupe pour chaque cœur a permis de reconstituer l'organe entier en mouvement (Figure 35). L'analyse tridimensionnelle du cœur a abouti à l'estimation de différents paramètres concernant la morphologie et la fonction cardiaques. Ils incluent les volumes en fin de diastole et de systole, le volume d'éjection systolique,

la fréquence cardiaque, la fraction d'éjection systolique et le rendement cardiaque (volume de sang expulsé par le ventricule gauche par unité de temps).

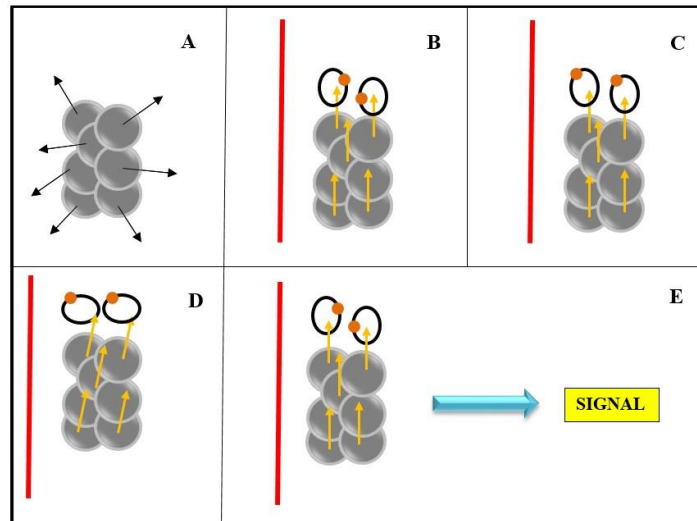


Figure 34 : Principe de l'imagerie par résonance magnétique nucléaire. (A) état normal des protons ; (B) orientation des protons sous l'influence du champ magnétique de l'aimant ; (C) mise en résonance des protons sous l'influence d'une onde radio imposée ; (D) la direction des protons bascule légèrement sous l'influence de l'onde radio imposée ; (E) retour à l'état B lors de l'arrêt de l'émission de l'onde entraînant la libération du signal. Rond gris : proton ^1H ; trait rouge : axe du champ magnétique de l'aimant ; flèches : spin des atomes d'hydrogène ; cercles noirs : orbite de rotation du proton ; rond orange : proton. (Source : Thibault Leger)

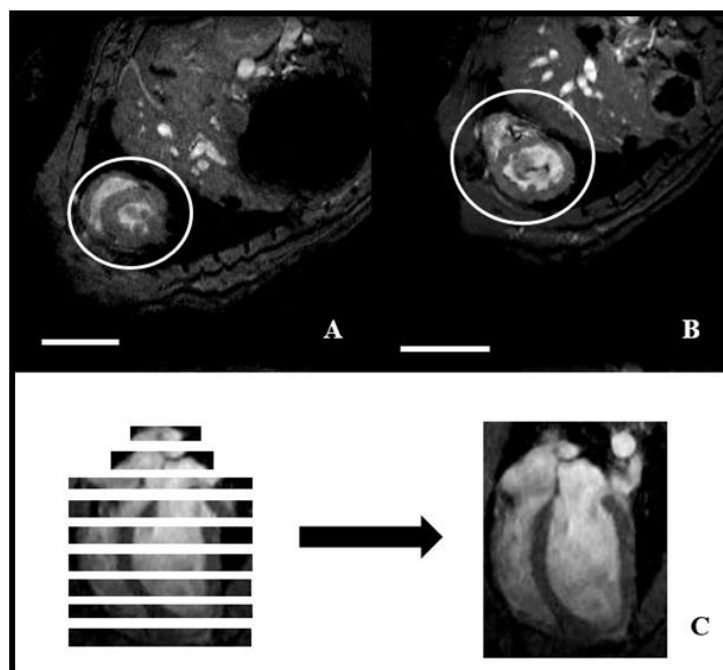


Figure 35 : Exemples d'acquisition par IRM cardiaque. A et B : exemples d'acquisition obtenues sur le plan transversal ; C : Schématisation de la reconstitution d'un cœur entier de ratte à partir des différentes coupes transversales ; Cercles blancs : cœur. Barre d'échelle : 10 mm. (Source : Thibault Leger)

3.4 Ligature et perforation cœcale pour déclencher un sepsis précoce

L'opération consiste à extérioriser le cæcum après incision de la paroi abdominale, à faire une ligature à 1 cm de son apex et à percer à deux reprises le cæcum avec une aiguille de taille 19G. Le cæcum est ensuite replacé dans la cavité abdominale et l'incision est recousue, puis agrafée. Le relargage des fèces et des bactéries du microbiote dans la cavité abdominale conduit à l'infection menant au sepsis. Afin d'obtenir un groupe contrôle, un second groupe d'animaux subit une opération fictive qui suit le même schéma opératoire décrit ci-dessus mais sans ligature ni perforation cœcales (Figure 36).

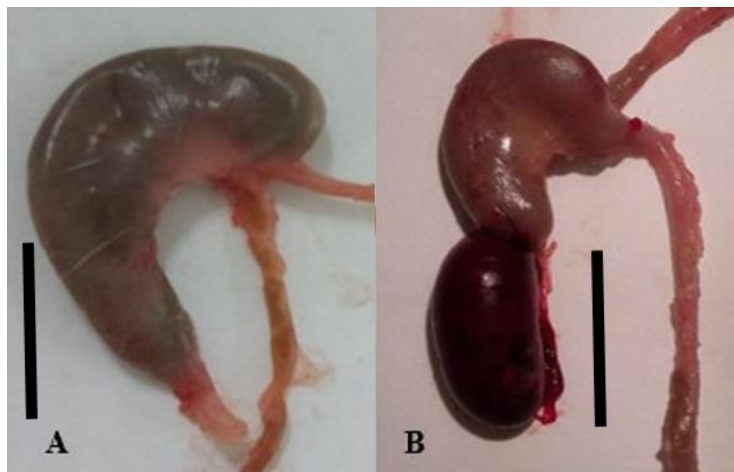


Figure 36 : Photographies de cæcums des rats en fonction de l'opération subie. (A) animal opéré fictivement ; (B) animal ayant subi une ligature et une perforation cœcale. La barre d'échelle représente 1,5 cm. (Source : Thibault Leger)

3.5 Extraction de mitochondries cardiaques

Le protocole décrit ci-dessous est celui utilisé chez le rat. Le protocole adapté pour le tissu cardiaque humain est détaillé dans la Publication n°5. Toutes les opérations sont réalisées à 4°C. Le fragment de myocarde destiné à l'extraction des mitochondries est débarrassé du sang résiduel, puis rincé avec le tampon A (mannitol 220 mM, saccharose 70 mM, MOPS 5 mM, EGTA 2 mM, pH 7,4 à 4°C, albumine 0,2%). Il est ensuite fragmenté à l'aide de ciseaux dans le tampon A et les fragments sont filtrés sur de la gaze, puis rincés avec le tampon A. Ils sont alors mis en suspension dans du tampon A (5,4 mL/g de tissu) avant d'être broyés à l'aide d'un polytron pendant 1,2 secondes à vitesse de

rotation maximale. Après homogénéisation au potter (350 rpm, 3 passages) et dilution dans du tampon A (5,4 mL/g de tissu), l'homogénat est centrifugé (10 min, 800 g). Le surnageant contenant les mitochondries séparées mécaniquement (mitochondries subsarcolemmales) est maintenu à 4°C pendant l'extraction enzymatique des mitochondries intermyofibrillaires. Le culot est ensuite remis en suspension dans 7,5 mL de tampon B (KCl 100 mM, MOPS 50 mM, EGTA 2 mM, pH 7,4 à 4°C, albumine 0,2%) où il est soumis pendant 1 minute à l'action de la subtilisine (3,1 unités Anson/mL), une protéase bactérienne à sérine permettant la digestion des protéines myofibrillaires. L'action de la subtilisine est alors stoppée par l'ajout de 15 mL de tampon B et par centrifugation (10 min, 8000 g). Le culot contenant les mitochondries séparées enzymatiquement est ensuite re-suspendu avec 2 x 5,4 mL de milieu B/g de tissu et l'ensemble est centrifugé (10 min, 800 g). Après filtration, le surnageant contenant les mitochondries isolées grâce à la subtilisine est associé au surnageant contenant les mitochondries séparées mécaniquement. Une nouvelle centrifugation (10 min, 8000 g) est alors effectuée. Le culot de mitochondries est ensuite remis en suspension dans du tampon C dénué d'albumine (KCl 100 mM, MOPS 50 mM, EGTA 1 mM, pH 7,4 à 4°C) et la suspension est centrifugée dans les mêmes conditions que précédemment. Le culot de mitochondries purifiées est repris dans le tampon C à la concentration approximative de 10-15 mg de protéines/ml. Cette suspension de mitochondries est conservée à 4°C jusqu'aux étapes ultérieures.

3.6 Oxygraphie et étude de la respiration mitochondriale

La respiration mitochondriale est évaluée par oxygraphie à l'aide d'une électrode de Clarke (S1, Hansatech, King's Lynn, Angleterre) reliée à un oxygraphe (Oxytherm, Hansatech, King's Lynn, Angleterre) piloté par ordinateur. Dans la chambre de mesure, 1 mL de milieu de respiration (KCl 125 mM, Tris-base 20 mM, KH₂PO₄ 10 mM, EGTA 1 mM, pH 7,2 à 30°C) est maintenu à 30°C sous agitation avec 0,2 mg de protéines mitochondriales. D'autres éléments nécessaires à la respiration sont alors ajoutés extemporanément : de l'albumine (0,15%), de la peroxidase de raifort (4,4 U/mL) et de l'Amplex® Red (1 µM). L'évolution de la concentration en oxygène est estimée après fermeture de la chambre de respiration. Trois substrats sont testés : le glutamate (0,55 mM) + malate (0,25 mM), le palmitoycarnitine (20 µM) + malate (0,20 mM) et le succinate (0,55 mM) + roténone

(20 μM). Le premier est un substrat du complexe I, le second correspond à un substrat lipidique et le dernier constitue un substrat du complexe II. Les mesures sont effectuées à 30°C. La respiration est stimulée en conditions saturantes par l'ajout d'ADP (1 mM). La consommation mitochondriale en oxygène est tout d'abord mesurée à l'état 2, c'est à dire en la seule présence du substrat oxydatif et sans ADP (Figure 37). Dans ces conditions, la respiration est lente et elle correspond à l'établissement et au maintien d'une force protomotrice. L'absence d'ADP empêche la synthèse d'ATP. Ensuite, la respiration est stimulée en état 3 par l'ajout d'ADP qui permet la consommation de la force protomotrice pour synthétiser l'ATP et correspond à la situation d'oxydation phosphorylante maximale. Enfin, l'oligomycine (0,5 $\mu\text{g/ml}$) est additionnée pour bloquer la F_1F_0 -ATP synthase et mesurer la respiration à l'état 4 qui correspond à la consommation d'oxygène compensant la dissipation de la force protomotrice par fuite de protons. Le rapport état 3/état 4 est appelé indice de contrôle respiratoire (ICR). Il renseigne sur l'intégrité mitochondriale.

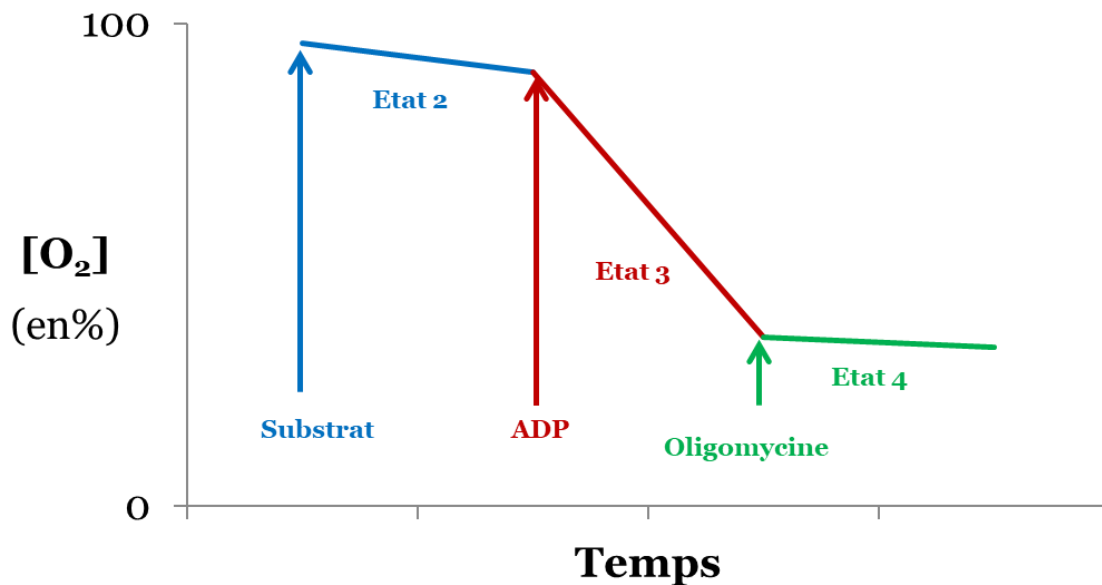


Figure 37 : Schématisation d'une courbe d'oxygraphie mitochondriale. Etat 2 : installation et maintien d'une force protomotrice lors de l'ajout du substrat ; Etat 3 : oxydation phosphorylante maximale due à une concentration saturante d'ADP ; Etat 4 : blocage de la F_1F_0 -ATP synthase par l'oligomycine et mesure de la consommation d'oxygène due à la seule fuite de protons. (Source : Thibault Leger)

3.7 Fluorimétrie et mesure de la libération des ROS

En parallèle de l'évaluation de la consommation d'oxygène, la mesure de la libération mitochondriale des ROS est effectuée par fluorimétrie à l'aide d'un spectrofluorimètre (Xenius XC, SAFAS, Monaco, Monaco). Le principe de cette méthode repose sur l'ajout de peroxydase de raifort et d'Amplex® Red au milieu de respiration. La peroxydase de raifort transforme les ions superoxydes libérés par les mitochondries en peroxyde d'hydrogène qui réagit alors avec l'Amplex® Red pour former une molécule fluorescente, la résorufine, excitable à 560 nm et dont l'émission s'effectue à 584 nm. Les mesures sont effectuées exactement dans les mêmes conditions que celles d'oxygraphie, la peroxydase et l'Amplex® Red ayant été ajoutés pour ces dernières afin d'homogénéiser les deux dosages. La production de ROS est alors évaluée au cours des états respiratoires 2, 3 et 4.

3.8 Evaluation de la production d'ATP par bioluminescence

Le dosage de l'ATP est réalisé grâce à une technique de bioluminescence dont le principe repose sur la réaction entre l'ATP et la luciférine en présence de luciférase. La réaction se traduit par la formation de pyrophosphate et d'adényl-luciférine ensuite oxydée par une molécule de dioxygène. Cette oxydation se traduit par la formation de CO₂, d'adénosine mono-phosphate et d'oxyluciférine dans un état électronique excité. Lors du retour à un état stable de cette dernière, 0,9 photons par molécule d'ATP sont émis à une longueur d'onde de 562 nm. La quantité de lumière émise est alors proportionnelle à la concentration initiale en ATP. Pour chaque animal étudié, quinze échantillons sont analysés pour la quantification de l'ATP : 5 par substrat (un échantillon prélevé toutes les 45 secondes lors de l'état 3) et ceci pour les trois substrats.

Au cours des mesures de respiration, 5 µl d'échantillon sont prélevés toutes les 45 secondes, immédiatement dilués dans 50 µl de DMSO et le tout est congelé à -80°C jusqu'au dosage de l'ATP. Au moment du dosage, 1 ml d'eau distillée est ajouté puis 17 µL de cette solution sont déposés dans les puits de la microplaque (Microfluor®). Chaque puits

est ensuite complété à 100 μL QSP avec de l'eau distillée. Une fois les échantillons et la gamme d'ATP déposés en triplicat, le dosage est effectué à l'aide d'un luminomètre (Luminoskan Ascent, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Etats-Unis) lequel dépose 100 μL de la solution du réactif luciférine/luciférase (kit ENLITEN®, Promega FF2021, Madison, Etats-Unis). La mesure de la densité optique est effectuée directement dans le même appareil.

Chapitre 4 : Résultats

Publication n°1

Dietary canolol protects the heart against the deleterious effects induced by the association of rapeseed oil, vitamin E and coenzyme Q10 in the context of a high-fat diet.

L'obésité entraîne progressivement une insuffisance cardiaque (Karam et al. 2017). Les AGPI $\omega 3$ à longue chaîne présentent des effets cardio-protecteurs dans de nombreuses situations pathologiques (Calder 2017). A l'heure actuelle, on ne sait pas si l'huile de colza, contenant de l'ALA, offre un effet protecteur similaire. Les AGPI $\omega 3$ sont sensibles aux attaques radicalaires et les produits de peroxydation lipidique pourraient endommager les cellules cardiaques (Mori et al. 2000; Mas et al. 2010). Nous avons donc testé si l'huile de colza raffinée, enrichie ou non avec différents antioxydants (association vitamine E + coenzyme Q10 et canolol), est cardio-protectrice lors de l'obésité abdominale.

Pour cela, 60 rats mâles Wistar ont été subdivisés en 5 groupes ayant reçu un régime spécifique pendant 11 semaines. Nous avons comparé des rats soumis à un régime normo-lipidique à un régime riche en graisses saturées et en acides gras monoinsaturés suite à l'ajout d'huile de palme. Ce même traitement nutritionnel a été modulé par l'ajout d'huile de colza, riche en ALA. Afin de déterminer l'impact de l'huile de colza contre le stress oxydant, nous avons enrichi une partie des régimes avec de la vitamine E + du coQ10 associés ou non avec du canolol.

L'obésité abdominale réduit le stress oxydant cardiaque et le taux d'apoptose tout en augmentant la proportion d'acide arachidonique (AA) dans les phospholipides membranaires. L'huile de colza présente le même effet, bien qu'il normalise la proportion d'AA en améliorant

la proportion d'AGPI ω 3-LC dans les membranes. L'ajout de vitamine E + CoQ10 dans le régime riche en graisses et en huile de colza a un effet délétère en augmentant la fibrose et l'expression de l'ARNm du récepteur de l'angiotensine-2b (Ag2R-1b). La surexpression de ce récepteur déclenche une vasoconstriction coronaire qui provoque probablement une hypoxie. Ces mêmes conditions nutritionnelles induisent une augmentation des triglycérides plasmatiques. Elles provoquent également une hausse de l'activité de la GPx et de l'expression des gènes de la catalase, de la GPX4 et de la SOD2 suggérant une augmentation du stress oxydant. La supplémentation en canolol contrecarre ces effets délétères en réduisant la vasoconstriction coronaire, en maintenant un taux normal de triglycérides et en limitant l'apparition d'un stress oxydant au vu de l'expression réduite de la SOD2.


Le canolol s'avère capable de contrecarrer les effets fibrotiques et oxydatifs de l'enrichissement en vitamine E + CoQ10 dans le cadre d'un régime riche en graisses et en huile de colza raffinée qui réduit le stress oxydant cardiaque. Cet effet se manifeste par la normalisation de l'expression de l'ARNm Ag2R-1b cardiaque, la diminution de l'hypoxie et le maintien du statut oxydant du myocarde.

RESEARCH

Open Access



Dietary canolol protects the heart against the deleterious effects induced by the association of rapeseed oil, vitamin E and coenzyme Q10 in the context of a high-fat diet

Thibault Leger¹, Isabelle Hininger-Favier², Frédéric Capel¹, Alain Geloën³, Jean-Paul Rigaudière¹, Chrystèle Jouve¹, Elodie Pitois¹, Gaëlle Pineau³, Carole Vaysse⁴, Jean-Michel Chardigny^{1,5}, Marie-Caroline Michalski³, Corinne Malpuech-Brugère¹ and Luc Demaison^{1*} 

Abstract

Background: Obesity progressively leads to cardiac failure. Omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) have been shown to have cardio-protective effects in numerous pathological situations. It is not known whether rapeseed oil, which contains α -linolenic acid (ALA), has a similar protective effect. Omega-3 PUFAs are sensitive to attack by reactive oxygen species (ROS), and lipid peroxidation products could damage cardiac cells. We thus tested whether dietary refined rapeseed oil (RSO) associated with or without different antioxidants (vitamin E, coenzyme Q10 and canolol) is cardio-protective in a situation of abdominal obesity.

Methods: Sixty male Wistar rats were subdivided into 5 groups. Each group was fed a specific diet for 11 weeks: a low-fat diet (3% of lipids, C diet) with compositionally-balanced PUFAs; a high-fat diet rich in palm oil (30% of lipids, PS diet); the PS diet in which 40% of lipids were replaced by RSO (R diet); the R diet supplemented with coenzyme Q10 (CoQ10) and vitamin E (RTC diet); and the RTC diet supplemented with canolol (RTCC diet). At the end of the diet period, the rats were sacrificed and the heart was collected and immediately frozen. Fatty acid composition of cardiac phospholipids was then determined. Several features of cardiac function (fibrosis, inflammation, oxidative stress, apoptosis, metabolism, mitochondrial biogenesis) were also estimated.

Results: Abdominal obesity reduced cardiac oxidative stress and apoptosis rate by increasing the proportion of arachidonic acid (AA) in membrane phospholipids. Dietary RSO had the same effect, though it normalized the proportion of AA. Adding vitamin E and CoQ10 in the RSO-rich high fat diet had a deleterious effect, increasing fibrosis by increasing angiotensin-2 receptor-1b (Ag2R-1b) mRNA expression. Overexpression of these receptors triggers coronary vasoconstriction, which probably induced ischemia. Canolol supplementation counteracted this deleterious effect by reducing coronary vasoconstriction.

Conclusion: Canolol was found to counteract the fibrotic effects of vitamin E + CoQ10 on cardiac fibrosis in the context of a high-fat diet enriched with RSO. This effect occurred through a restoration of cardiac Ag2R-1b mRNA expression and decreased ischemia.

Keywords: Heart, Rapeseed oil, ω 3 PUFAs, Antioxidant, Canolol, Obesity

* Correspondence: luc.demaison@inra.fr

¹Université Clermont Auvergne, INRA, UNH, Unité de Nutrition Humaine, CRNH Auvergne, 58 rue Montalembert, BP 321, 63009 Clermont-Ferrand cedex 1, France

Full list of author information is available at the end of the article



Background

The prevalence of obesity in the Western world has increased dramatically in the past two decades [1]. Obesity, and especially central or abdominal obesity, is strongly associated with the occurrence of metabolic syndrome and type-2 diabetes mellitus which increase the risk of developing cardiovascular disease. Insulin resistance and hyperglycemia are associated with oxidative stress and inflammation [2] which affect the vessels and induce atherosclerosis [3, 4]. Moreover, obesity also alters cardiac function, leading to heart failure in the long term. A preliminary step that increases cardiac mechanical function leads to increased proportion of arachidonic acid (C20:4 ω 6 or AA) in the cardiac membrane and increased coronary microvessel vasodilatation capacities [5]. However, this status is transient: heart failure inexorably develops [6] due to the progressive development of post-prandial hyperglycemia and oxidative stress. These changes alter coronary microvessel function [7], reduce myocardial perfusion and decrease cardiac mechanical function.

Partial substitution of ω 6 PUFA by ω 3 PUFA such as α -linolenic acid (C18:3 ω 3 or ALA), eicosapentaenoic acid (C20:5 ω 3 or EPA) and docosahexaenoic acid (C22:6 ω 3 or DHA) in the diet is known to reduce the proportion of AA in cardiac phospholipids [8]. It can thus prevent obesity-induced hyper-activation of cardiac function and slow the development of cardiac insufficiency. These fatty acids also act on systemic glucose metabolism. It was recently shown that dietary EPA reduces high-fat diet-induced insulin resistance [9], and may thus help slow progression toward heart failure.

Dietary ω 3 PUFA have long been shown to protect the heart against several diseases such as atherosclerosis [10], ischemia/reperfusion [11] and hypertrophy [12]. However, ω 3 PUFA are also very vulnerable to ROS attack, much more so than ω 6 PUFA. ROS attack can occur in the diet through food oxygenation and intake. ω 3 PUFA are often protected by an adequate type and amount of antioxidants (vitamin E, rosmarinic acid, etc.), but their dispersion in the whole organism including biological membranes necessitates specific anti-oxidative properties. Indeed, the body can play host to strong ROS production, particularly during pathophysiological conditions. The mitochondria, but also several enzymes such as the NADPH oxidase and xanthine oxidase, are a source of ROS. The low amount of antioxidants associated with dietary ω 3 PUFA may not be high enough to protect the ω 3 PUFA dispersed in the whole organism. Furthermore, the type of antioxidants may be ill-suited to converge toward the intracellular site of ROS production. It thus appears logical to treat progressive obesity with an adequate amount of appropriate antioxidants in order to protect the ω 3 PUFA in the whole organism when oxidative stress is high.

Rapeseed oil contains approximately 8–10% ALA and is a common dietary source of lipids in human nutrition. Rapeseed oil also contains several antioxidants, namely vitamin E, coenzyme Q10 (CoQ10) and phenolic compounds such as canolol, sinapic acid and sinapin. ALA has well-documented cardio-protective effects [13–16], namely for the prevention of coronary heart disease, sudden cardiac death, non-fatal acute myocardial infarction, heart failure and stroke, but apart from CoQ10 against heart failure, there is still controversy over whether the other antioxidants such as vitamin E have beneficial effects [17].

Here we report a study designed to evaluate the effects of ALA-rich rapeseed oil on key aspects of cardiac function (fibrosis, inflammation, oxidative stress, apoptosis, metabolism, mitochondrial biogenesis) in male Wistar rats in the context of a high-fat diet, and to test whether the addition of different rapeseed-sourced antioxidants (vitamin E, CoQ10 and canolol) improved the effects of refined rapeseed oil.

Methods

Oil preparation

Refined palm oil was furnished by the Société Industrielle des Oléagineux (Saint-Laurent-Blangy, France). Refined rapeseed and sunflower oils were prepared by the French Institute for Fats and Oils Research (ITERG, Pessac, France). Canolol was prepared by the ITERG through thermal treatment of rapeseed crops. α -tocopherol was purchased from Sigma (Saint-Quentin-Fallavier, France). CoQ10 was kindly gifted by Kaneka Nutrients (Pasadena, TX). Two fortified rapeseed oil mixtures were prepared: the first one was enriched with 1700 mg/kg α -tocopherol and 300 mg/kg CoQ10 (RTC) and the second one had the same composition but also contained canolol as 600 sinapic acid-equivalents (RTCC). Details of the exact composition of the different lipid preparations are reported in Table 1.

Animals and diets

Sixty male Wistar rats weighing 220–250 g were purchased from Janvier SA (Le Genest Saint-Isle, France) then housed 4 per cage in an animal facility controlled for temperature (22 °C) and light/dark cycles (12 h/12 h). After 2 weeks of chow diet, they were divided into 5 groups of 12 animals. Each group was nourished with a specific diet for 11 weeks: a low-fat diet (3% of lipids, C diet) with compositionally-balanced PUFAs; a high-fat diet rich in palm oil (30% of lipids, PS diet); the PS diet in which 40% of lipids were replaced by RSO (R diet); the R diet supplemented with coenzyme Q10 (CoQ10) and vitamin E (RTC diet); and the RTC diet supplemented with canolol (RTCC diet). The lipid composition of these diets is presented in Table 1. At the end of the

Table 1 Micronutrient and fatty acid compositions of the different lipid fractions

	PS	R	RTC	RTCC
Palm oil	90	60	60	60
Sunflower oil	10			
Rapeseed oil	-	40	40	40
α -toco (mg/kg)	125	180	2140	2020
CoQ10 (mg/kg)	20	20	260	260
Canolol (eq. S)	-	-	-	600
FA composition				
C16:0	40	28.3	28.4	28.6
C18:0	4.2	3.2	3.2	3.2
SFA	46.3	33.2	33.3	33.5
C18:1	43.5	48.7	48.8	48.6
MUFA	43.9	49.7	49.7	49.5
C18:2 ω 6	9	13.2	13.1	13.1
C18:3 ω 3	0.2	3.1	3.1	3.1
Trans FA	0.6	0.8	0.8	0.7

PS palm oil/sunflower oil mixture, R rapeseed oil, RTC α -tocopherol + coenzyme Q10 mixture in rapeseed oil, RTCC same mixture as RTC + canolol, α -toco α -tocopherol, CoQ10 coenzyme Q10, eq. S sinapic acid equivalent, FA fatty acid, SFA saturated fatty acid, MUFA monounsaturated fatty acid

feeding period, the animals were sacrificed under anesthesia and their hearts were rapidly collected and frozen in liquid nitrogen. The samples were pulverized in liquid nitrogen and the powder was stored at -80°C until the biochemical determinations were performed.

Western blotting

Tissues were ground three times in a mini-bead beater (Minilys System, Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France) in presence of a lysis buffer constituted of HEPES 50 mM, sodium chloride 150 mM, EDTA 10 mM, anhydrous sodium tetrabasic pyrophosphate 10 mM, β -glycerophosphate 25 mM, sodium fluoride 100 mM and anhydrous glycerol 1.086 M supplemented with phosphatase inhibitors (Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). Successive centrifugations were performed in order to collect the supernatants. Protein quantifications were performed using a bicinchoninic acid assay kit (Thermo Scientific, Rockford, IL). For protein immunoblotting, 20 μg of proteins were loaded for separation by SDS-PAGE electrophoresis and transfer on PVDF membranes. Membranes were then immunoblotted with the appropriate antibody to detect glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), serine 473 phosphorylated Akt, total Akt, cleaved caspase 3, transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), matrix metalloproteinase-9 (MMP9) and nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha (I κ B α). Antibody binding was detected using HRP-conjugated secondary

antibodies and ECL western blotting substrate (Thermo Scientific, Rockford, IL). Immunoblots were visualized via a chemoluminescence imaging system (MF ChemiBIS, DNR bio imaging systems, Jerusalem, Israel) and quantified using MultiGauge V3.2 software.

Gene expression analysis

Total RNA were extracted from 50 mg of cardiac powder using TRIzol[®] (Thermo Scientific, Rockford, IL) according to the manufacturer's instructions. RNA quantification and integrity were verified by measuring the ratio of optical density at 260 and 280 nm and by agarose gel, respectively. cDNA was synthesized from 2 μg of total RNA using a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit from Applied Biosystems (Thermo Scientific, Rockford, IL). The reverse transcription products were used for quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) using specific primers and Rotor-Gene SYBR Green PCR master mix on a Rotor-Gene Q system (Qiagen, Courtaboeuf, France). Messenger RNA (mRNA) was quantified using the standard curve of native cDNA and serial dilutions. mRNA expressions were determined for p53, PGC1- α , angiotensin-2, angiotensin-2 receptors-1a and -1b, pyruvate dehydrogenase 4, superoxide dismutase 2, glutathione peroxidase 4, catalase, ICAM-1, VCAM-1 and nitric oxide synthase 3. Primer sequences and PCR conditions can be made available on request (luc.demaison@inra.fr). β -actin and non-POU domain-containing octamer-binding protein (NoNo) genes were used as housekeeping genes.

Fatty acid analysis

Fatty acid profiling of cardiac phospholipids was performed by gas chromatography-flame ionization detection (GC-FID). Briefly, total lipids were extracted from cardiac tissues as per Floch et al. [18] and the organic phase was evaporated under nitrogen. Phospholipids were separated from non-phosphorus lipids using a Sep-Pak cartridge (Chromabond, Macherey-Nagel, Düren, Germany) [19]. Fatty acid methyl esters (FAMES) were prepared via basic trans-esterification followed by acid trans-esterification, and analyzed using a silica CP-Sil 88 capillary column (100 m/0.25 mm internal diameter/0.20 μm film thickness; Varian, Palo Alto, CA) on a GC system (Thermo Electron Corp.; Waltham, MA) equipped with a flame ionization detector.

Cardiac oxidative stress

Protein oxidation in the heart was evaluated by the disappearance of protein thiol groups [20]. Thiols were assayed using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid (DTNB)) to derive the thiol groups. The calibration curve was obtained by mixing two stock solutions of N-acetyl cystein (NAC) in the range of 0.125–0.6 mmol/L. Samples were

measured spectrophotometrically at 415 nm (Hitachi 912, B Braun Science Tec, France) in the presence of a phosphate buffer 50 mM, EDTA 100 mM, pH 8 and bis-5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) 10 mM.

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were assayed as per Poubelle et al. [21].

The antioxidant status of the heart was evaluated using the ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay as a global marker of antioxidant power. The FRAP assay uses antioxidants as reductants in a redox-linked colorimetric method. In this assay, at low pH, a ferric-tripyridyltriazine (Fe^{III} -TPTZ) complex is reduced to the ferrous form, which is blue and monitored by measuring the change in absorption at 593 nm. The change is directly proportional to the reducing power of the electron-donating antioxidants present in the tissue. The absorbance change is translated into a FRAP value (in $\mu\text{mol/L}$) by relating the change of absorbance at 593 nm of test sample to that of a standard solution of known FRAP value.

Glutathione peroxidase (GPx) activity, measuring a seleno-enzyme involved in protection against H_2O_2 , was evaluated by the modified method of Flohé & Gunzler [22] using tert-butyl hydroperoxide (Sigma Chemical Co, Paris, France) as substrate instead of hydrogen peroxide.

SOD was assayed using a commercially-available kit (Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France).

Other biochemical determinations

Myocardial caspase 3 activity and collagen content were evaluated using commercially available kits from Abcam (Paris, France).

Cardiac lipids (triglycerides, diglycerides, free fatty acids, cholesterol, cholesterol esters and phospholipids) were determined by flame ionization detection by the Iatroscan method [23].

Statistical analysis

Results are presented as means \pm S.E.M. Data were tested by one-way analysis of variance (ANOVA) performing the following comparisons: PS vs. C, R vs. PS, RTC vs. R, RTCC vs. RTC. Group means were compared with a Fisher's LSD test. A probability (p) less than 0.05 was considered significant. All statistical analysis was performed using NCSS 2007 software.

Results

General data

The high-fat diets tended to increase animal weight (477 ± 14 , 469 ± 13 , 460 ± 12 and 459 ± 11 g for the PS, R, RTC and RTCC groups, respectively) compared to the control diet (435 ± 7), but the differences were not significant. However, the high-fat diets strongly

increased abdominal adiposity (by 36 ± 2 , 37 ± 3 , 34 ± 2 and 36 ± 2 g for the PS, R, RTC and RTCC groups vs. 21 ± 1 g for the C group), but not enough to increase animal weight. The heart weight was similar in all the dietary groups (209 ± 7 , 219 ± 8 , 211 ± 9 , 211 ± 8 and 222 ± 8 mg of dry weight for the C, PS, R, RTC and RTCC groups). Similarly, the heart weight to body weight ratios were unaffected by the dietary manipulations (data not shown).

Fatty acid composition of cardiac phospholipids

The most significant results presented in Table 2 are the followings: i) the PS diet strongly increased the proportion of AA (+20%, $p < 0.001$), C22:4 ω 6 (+20%, $p < 0.01$) and C22:5 ω 6 (+377%, $p < 0.001$) compared to the control group. This was due to a decrease in linoleic acid (C18:2 ω 6 or LA, -49%, $p < 0.001$). This diet reduced the proportions of individual ω 3 fatty acids (-87, -25, -53 and -35% for the ALA, EPA, C22:5 ω 3 and DHA, $p < 0.001$, 0.05, 0.001 and 0.001, respectively). It also decreased the PUFA/SFA ratio (-17%, $p < 0.001$); ii) the rapeseed oil-rich diets decreased the proportions of AA (-18% in general, $p < 0.001$), C22:4 ω 6 (-59% in general, $p < 0.001$) and C22:5 ω 6 (-93% in general, $p < 0.001$) compared to the PS diet, and slightly increased that of LA (+30% in general, $p < 0.001$). They also raised the proportions of ALA (+915% in general, $p < 0.001$), docosapentaenoic acid (C22:5 ω 3 or DPA, +368% in general, $p < 0.001$) and DHA (+214% in general, $p < 0.001$). PUFA/SFA ratio was slightly but significantly increased by rapeseed oil-rich diets (+5, +8 and +7%, $p < 0.05$, 0.001 and 0.01, for the R, RTC and RTCC groups compared to the PS group); iii) the diet combining α -tocopherol, CoQ10 and rapeseed oil and the same diet with added polyphenol canolol had little effect on cardiac phospholipid fatty acid composition compared to the R diet.

Myocardial mRNAs for angiotensin 2 and associated receptors

Myocardial angiotensin 2 mRNA expression was unaffected by the different diets (Fig. 1a). Cardiac angiotensin 2 receptor type 1a mRNA expression was also unchanged (Fig. 1b). In contrast, angiotensin 2 receptor type 1b expression was significantly increased by the RTC diet compared with the other four diets (+149%, Fig. 1c).

Myocardial collagen content

The myocardial collagen content of the 5 dietary groups is shown in Fig. 2a. High-fat diets led to lower collagen content of myocardial tissue compared to C diet, especially with R and RTCC diets (-18 and -15%, $p < 0.05$) but not the RTC diet which maintained a high cardiac collagen content (+24% vs R group and +20% vs RTCC

Table 2 Fatty acid composition of cardiac phospholipids

	C	PS	R	RTC	RTCC
12:0	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01
14:0	0.17 ± 0.01 ^a	0.15 ± 0.01 ^{ac}	0.13 ± 0.01 ^{cd}	0.12 ± 0.01 ^{bde}	0.13 ± 0.01 ^{ce}
15:0	0.09 ± 0.01 ^a	0.03 ± 0.01 ^b	0.04 ± 0.01 ^b	0.04 ± 0.01 ^b	0.04 ± 0.01 ^b
DMA 16:0	2.33 ± 0.06 ^a	3.14 ± 0.05 ^b	2.74 ± 0.14 ^c	2.88 ± 0.06 ^c	2.85 ± 0.06 ^c
16:0	11.90 ± 0.33	11.98 ± 0.29	12.11 ± 0.34	11.85 ± 0.16	12.35 ± 0.28
17:0	0.32 ± 0.01 ^a	0.12 ± 0.01 ^b	0.14 ± 0.01 ^b	0.13 ± 0.01 ^b	0.14 ± 0.01 ^b
DMA 18:0	0.81 ± 0.09 ^a	1.02 ± 0.06 ^b	0.91 ± 0.03 ^{ab}	1.00 ± 0.09 ^{ab}	0.93 ± 0.05 ^{ab}
18:0	19.53 ± 0.31 ^a	22.25 ± 0.29 ^b	21.27 ± 0.48 ^c	21.17 ± 0.09 ^c	20.88 ± 0.07 ^c
20:0	0.18 ± 0.02 ^{ac}	0.17 ± 0.02 ^a	0.23 ± 0.01 ^{bd}	0.25 ± 0.01 ^{bd}	0.22 ± 0.01 ^{cd}
22:0	0.16 ± 0.01 ^a	0.31 ± 0.01 ^b	0.21 ± 0.01 ^c	0.22 ± 0.02 ^c	0.20 ± 0.01 ^c
24:0	0.01 ± 0.01 ^a	0.08 ± 0.01 ^b	0.02 ± 0.01 ^a	0.02 ± 0.01 ^a	0.02 ± 0.01 ^a
SFA	35.21 ± 0.33 ^a	39.29 ± 0.24 ^b	37.86 ± 0.50 ^c	37.56 ± 0.21 ^c	37.56 ± 0.16 ^c
16:1ω9	0.10 ± 0.01 ^a	0.08 ± 0.01 ^b	0.10 ± 0.01 ^a	0.08 ± 0.01 ^{bc}	0.09 ± 0.01 ^{ac}
16:1ω7	0.47 ± 0.05 ^a	0.1 ± 0.01 ^b	0.08 ± 0.02 ^b	0.08 ± 0.01 ^b	0.11 ± 0.02 ^b
18:1ω9	3.89 ± 0.22 ^a	6.79 ± 0.45 ^b	7.21 ± 0.60 ^b	6.09 ± 0.20 ^b	6.60 ± 0.40 ^b
18:1ω7	4.09 ± 0.10 ^a	2.50 ± 0.02 ^b	2.88 ± 0.04 ^c	2.93 ± 0.05 ^c	3.00 ± 0.04 ^c
20:1ω9	0.11 ± 0.01 ^a	0.06 ± 0.01 ^b	0.06 ± 0.01 ^b	0.05 ± 0.01 ^b	0.05 ± 0.01 ^b
MUFA	8.66 ± 0.34 ^a	9.50 ± 0.47 ^{ab}	10.32 ± 0.62 ^b	9.21 ± 0.16 ^{ab}	9.78 ± 0.47 ^{ab}
18:2ω6	24.22 ± 0.87 ^a	12.24 ± 0.46 ^b	14.28 ± 0.57 ^c	15.48 ± 0.56 ^c	14.72 ± 0.31 ^c
18:3ω6	0.06 ± 0.01 ^a	0.07 ± 0.01 ^a	0.14 ± 0.01 ^c	0.11 ± 0.01 ^b	0.12 ± 0.01 ^{bc}
20:2ω6	0.19 ± 0.01 ^a	0.10 ± 0.01 ^b	0.11 ± 0.01 ^b	0.11 ± 0.01 ^b	0.12 ± 0.01 ^b
20:3ω6	0.31 ± 0.01 ^a	0.38 ± 0.01 ^b	0.43 ± 0.03 ^c	0.50 ± 0.02 ^d	0.46 ± 0.02 ^{cd}
20:4ω6	21.70 ± 0.34 ^a	26.13 ± 0.50 ^b	21.76 ± 0.76 ^a	21.52 ± 0.45 ^a	20.68 ± 0.39 ^a
22:4ω6	1.21 ± 0.05 ^a	1.44 ± 0.04 ^b	0.61 ± 0.01 ^c	0.58 ± 0.02 ^c	0.56 ± 0.02 ^c
22:5ω6	1.38 ± 0.09 ^a	6.58 ± 0.58 ^b	0.48 ± 0.05 ^c	0.46 ± 0.02 ^c	0.50 ± 0.03 ^c
ω6 PUFA	48.73 ± 0.52 ^a	46.93 ± 0.53 ^b	37.82 ± 0.41 ^c	38.77 ± 0.50 ^c	37.74 ± 0.35 ^c
18:3ω3	0.15 ± 0.01 ^a	0.02 ± 0.01 ^b	0.22 ± 0.02 ^c	0.19 ± 0.01 ^c	0.20 ± 0.01 ^c
20:5ω3	0.12 ± 0.01 ^a	0.09 ± 0.01 ^b	0.10 ± 0.01 ^{ab}	0.11 ± 0.01 ^{ab}	0.10 ± 0.01 ^{ab}
22:5ω3	1.22 ± 0.07 ^a	0.57 ± 0.02 ^b	2.42 ± 0.12 ^c	2.71 ± 0.16 ^{cd}	2.88 ± 0.18 ^d
22:6ω3	5.59 ± 0.27 ^a	3.61 ± 0.15 ^b	11.26 ± 0.39 ^c	11.47 ± 0.38 ^c	11.28 ± 0.36 ^c
ω3 PUFA	7.09 ± 0.32 ^a	4.28 ± 0.16 ^b	14.0 ± 0.40 ^c	14.48 ± 0.36 ^c	14.45 ± 0.51 ^c
PUFA	55.53 ± 0.28 ^a	51.21 ± 0.52 ^{cd}	51.82 ± 0.59 ^{bd}	52.98 ± 0.21 ^b	52.37 ± 0.54 ^{bc}
ω6/ω3	6.99 ± 0.38 ^a	11.09 ± 0.47 ^b	2.72 ± 0.08 ^c	2.69 ± 0.10 ^c	2.60 ± 0.10 ^c
EPA + DHA	5.71 ± 0.27 ^a	3.70 ± 0.16 ^b	11.36 ± 0.39 ^c	11.58 ± 0.37 ^c	11.37 ± 0.36 ^c
EPA/AA (× 10 ³)	5.08 ± 0.44 ^a	3.36 ± 0.44 ^b	4.61 ± 0.31 ^a	5.07 ± 0.43 ^a	4.62 ± 0.29 ^a
(EPA + DHA)/AA	0.27 ± 0.01 ^a	0.14 ± 0.01 ^b	0.53 ± 0.02 ^c	0.54 ± 0.02 ^c	0.55 ± 0.02 ^c
PUFA/SFA	1.563 ± 0.005 ^a	1.304 ± 0.018 ^b	1.371 ± 0.028 ^c	1.406 ± 0.012 ^c	1.395 ± 0.019 ^c

C control rats, PS rats fed a palm oil/sunflower oil mixture, R rats fed rapeseed oil, RTC rats fed rapeseed oil enriched with α-tocopherol and coenzyme Q10, RTCC rats fed RTC plus canolol, DMA dimethylacetal, SFA saturated fatty acid, MUFA monounsaturated fatty acid, PUFA polyunsaturated fatty acid, EPA eicosapentaenoic acid or C20:5ω3, DHA docosahexaenoic acid or C22:6ω3, AA arachidonic acid or C20:4ω6. Averages of 5 rats per group
^{a, b, c, d, e} means in a row without a common letter are significantly different

group, $p < 0.05$). The observed changes in collagen content were not associated with significant changes in amount of TGF-β1 (Fig. 2b) and matrix metalloproteinase-9 (Fig. 2c).

Myocardial metabolism

In terms of metabolism (Table 3), the PS diet reduced myocardial diglyceride content (−36%, $p < 0.05$) compared to the C group. However, PS diet did not alter the

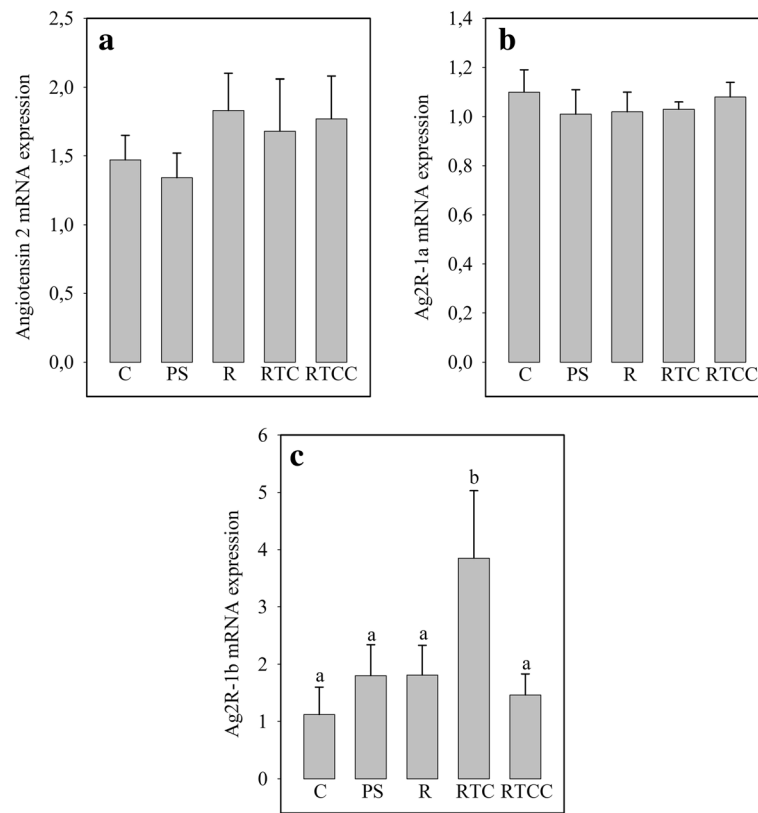


Fig. 1 Influence of the different diets on myocardial mRNA levels for angiotensin 2 (panel **a**), angiotensin 2 receptor-1a (Ag2R-1a, panel **b**) and angiotensin 2 receptor-1b (Ag2R-1b, panel **c**). Figures are averages of 12 rats per group. C: rats fed the control diet; PS: rats fed with the high-fat diet rich in saturated and monounsaturated fatty acids; R: rats fed the high-fat diet rich in rapeseed oil; RTC: rats fed with the same diet as R, but enriched with vitamin E and CoQ10; RTCC: rats fed the same diet as RTC, but enriched with canolol; a,b: In a given panel, histograms without a common letter are significantly different

other metabolic parameters determined here (ratio between phosphorylated and non-phosphorylated protein kinase B, pyruvate dehydrogenase kinase-4 mRNA expression, myocardial contents of triglycerides, NEFA, cholesterol, cholesterol esters and phospholipids). Compared to the PS diet, the R diet increased cardiac diglyceride level (+ 44%, $p < 0.01$) but did not change the other parameters. The RTC diet led to a strong increase in pyruvate dehydrogenase kinase-4 mRNA expression compared to the R diet (+ 54%, $p < 0.05$). However, comparisons of RTC vs. R diets did not reveal significant differences in the other metabolic parameters. Finally, compared to RTC diet, the RTCC diet significantly normalized pyruvate dehydrogenase kinase-4 mRNA expression and myocardial triglyceride content (– 46 and – 23%, $p < 0.05$ and 0.05 , respectively) down to the level observed with the R diet.

Oxidative stress

Several features of myocardial oxidative stress are presented in Table 4. Compared to the C diet, the PS diet strongly decreased the myocardial content of TBARS (–

21, $p < 0.01$), total antioxidant capacities (FRAP, – 10%, $p < 0.05$) and SOD activity (– 53%, $p < 0.01$) without altering the other parameters of oxidative stress. Adding RSO to the high-fat diet (R diet) increased the amount of thiol groups (+ 12%, $p < 0.001$) compared to the PS diet, suggesting reduced protein oxidative stress. Enrichment of the R diet with vitamin E and CoQ10 (RTC diet) increased GPx activity (+ 9%, $p < 0.05$) and SOD2 (+ 46%, $p < 0.05$) and GPX4 (+ 20%, $p < 0.05$) mRNA expression. Further addition of canolol had little effect other than decreasing SOD2 mRNA expression (– 31%, $p < 0.05$) back down to the level observed with the R diet.

Apoptosis

Western blotting analysis (Fig. 3a) indicated that the cardiac level of the cleaved caspase-3 was reduced with the PS diet (– 50%, $p < 0.05$) compared to the C diet, suggesting that apoptosis was less intense in this group. Caspase-3 activity (Fig. 3b) and p53 mRNA expression (Fig. 3c) were not significantly reduced. Adding RSO to the PS diet did not modify the situation. Likewise, adding vitamin E and CoQ10 to the R diet did not alter the

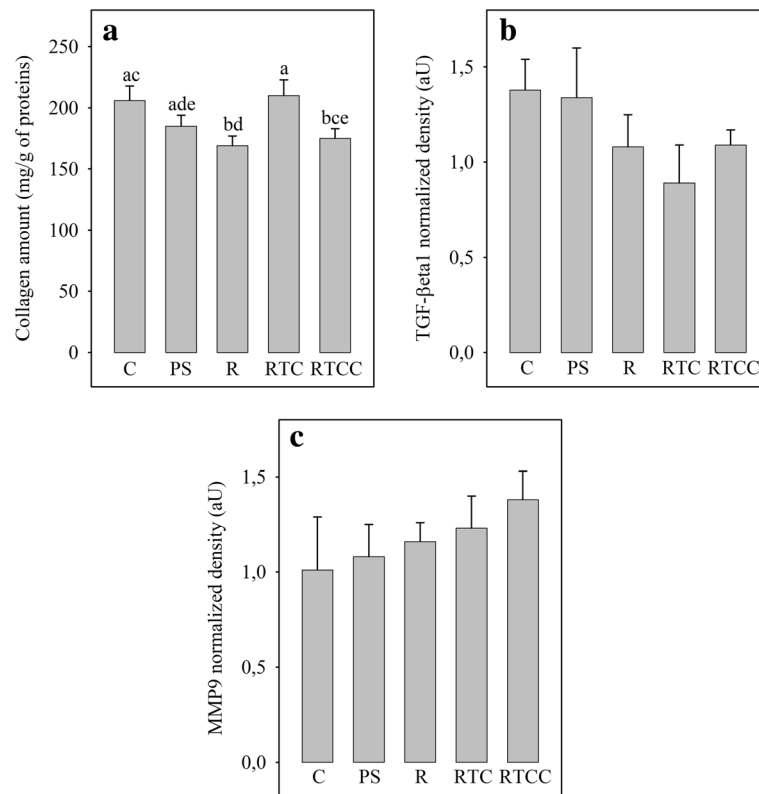


Fig. 2 Myocardial contents of collagen (panel **a**), TGF-β1 (panel **b**) and MMP9 (panel **c**). Averages of 12 rats per group. C: rats fed the control diet; PS: rats fed the high-fat diet rich in saturated and monounsaturated fatty acids; R: rats fed with high-fat diet rich in rapeseed oil; RTC: rats fed with the same diet as R, but enriched with vitamin E and CoQ10; RTCC: rats fed the same diet as RTC, but enriched with canolol; TGF-β1: transforming growth factor-β1; MMP9: matrix metalloproteinase 9; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; a,b,c,d,e: In a given panel, histograms without a common letter are significantly different

severity of apoptosis but did significantly reduce p53 mRNA expression compared to the RTC diet (−27%, $p < 0.05$). Finally, adding canolol to the RTC diet did not alter the protein expression of cleaved caspase-3 and caspase-3 activity compared to the R and RTC diets, but tended to bring p53 mRNA expression back down

to the level observed with the R diet. The differences in apoptosis intensity were not due to activation of the inflammation pathway (Table 5): neither the amount of IκBα protein nor the mRNA levels for ICAM, VCAM and nitric oxide synthase-3 were altered by the different diets.

Table 3 Myocardial glucose and lipid metabolism

	C	PS	R	RTC	RTCC
pAkt/totAkt	1.64 ± 0.32	1.52 ± 0.25	1.20 ± 0.29	1.29 ± 0.25	1.52 ± 0.23
PDK4	0.13 ± 0.02 ^a	0.28 ± 0.07 ^{ab}	0.41 ± 0.08 ^b	0.63 ± 0.09 ^c	0.34 ± 0.03 ^b
TG	20 ± 1 ^a	25 ± 2 ^{ab}	25 ± 2 ^{ab}	31 ± 4 ^b	24 ± 2 ^a
DG	1.4 ± 0.2 ^{ac}	0.9 ± 0.09 ^b	1.3 ± 0.1 ^{cd}	1.1 ± 0.1 ^{bd}	0.9 ± 0.1 ^b
NEFA	1.2 ± 0.2 ^a	1.1 ± 0.1 ^{ab}	1.1 ± 0.1 ^{ab}	0.9 ± 0.1 ^b	0.9 ± 0.1 ^b
Chol	3.2 ± 0.3 ^a	2.7 ± 0.3 ^{ab}	2.5 ± 0.1 ^b	2.4 ± 0.1 ^b	2.4 ± 0.1 ^b
CE	2.6 ± 0.6	2.3 ± 0.6	1.1 ± 0.2	1.8 ± 0.4	2.0 ± 0.6
PL	70 ± 3	68 ± 2	65 ± 4	63 ± 4	70 ± 3

C control rats, PS rats fed a palm oil/sunflower oil mixture, R rats fed rapeseed oil, RTC rats fed rapeseed oil enriched with α-tocopherol and coenzyme Q10, RTCC rats fed RTC plus canolol, pAkt/totAkt phosphorylated protein kinase B-to-total protein kinase B ratio, PDK4 pyruvate dehydrogenase kinase-4 mRNA expression, TG, DG, NEFA, Chol, CE, PL amounts of triglycerides, diacylglycerols, non-esterified fatty acids, cholesterol, cholesterol esters and phospholipids, respectively, in the myocardium. Averages of 12 rats per group. Lipid amounts are expressed in mg/g of heart weight

^{a, b, c, d} means in a row without a common letter are significantly different

Table 4 Oxidative stress

	C	PS	R	RTC	RTCC
Thiols	55 ± 1 ^a	57 ± 1 ^a	64 ± 1 ^b	62 ± 2 ^b	65 ± 1 ^b
TBARS	0.29 ± 0.01 ^a	0.23 ± 0.01 ^b	0.23 ± 0.02 ^b	0.24 ± 0.02 ^b	0.24 ± 0.01 ^b
FRAP	107 ± 4 ^a	96 ± 3 ^c	88 ± 2 ^{cb}	88 ± 3 ^{cb}	86 ± 3 ^b
SOD activity	358 ± 55 ^a	170 ± 20 ^b	167 ± 15 ^b	158 ± 11 ^b	132 ± 21 ^b
GPX activity	1062 ± 22 ^a	1065 ± 28 ^a	1066 ± 26 ^a	1160 ± 25 ^b	1096 ± 26 ^{ab}
SOD2	0.41 ± 0.03 ^a	0.55 ± 0.09 ^a	0.57 ± 0.08 ^a	0.83 ± 0.10 ^b	0.57 ± 0.08 ^a
GPX4	0.54 ± 0.01 ^a	0.59 ± 0.02 ^{ab}	0.55 ± 0.03 ^a	0.66 ± 0.04 ^b	0.64 ± 0.04 ^b
Cat	0.30 ± 0.05 ^a	0.51 ± 0.11 ^{ab}	0.57 ± 0.09 ^{ab}	0.79 ± 0.15 ^b	0.56 ± 0.11 ^{ab}

C control rats, PS rats fed a palm oil/sunflower oil mixture, R rats fed rapeseed oil, RTC rats fed rapeseed oil enriched with α -tocopherol and coenzyme Q10, RTCC rats fed RTC plus canolol, TBARS thiobarbituric acid reactive substances, FRAP ferric reducing antioxidant power, SOD superoxide dismutase, GPX glutathione peroxidase, SOD2, GPX4 and Cat SOD2, GPX4 and catalase mRNA expression. Thiols, TBARS and FRAP are expressed in μ moles/g of proteins. SOD and GPX activities are expressed in U/g of proteins. Averages of 12 rats per group

^{a, b, c} means in a row without a common letter are significantly different

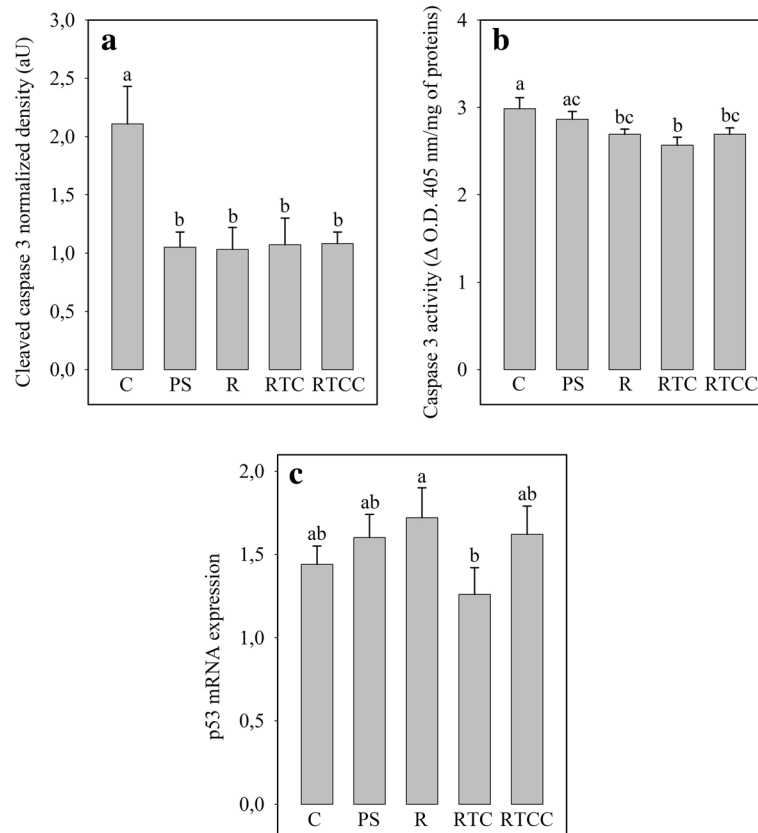


Fig. 3 Myocardial apoptosis estimated as the amount of cleaved caspase 3 (panel **a**), caspase 3 activity (panel **b**) and p53 mRNA level (panel **c**). Figures are averages of 12 rats per group. C: rats fed the control diet; PS: rats fed the high-fat diet rich in saturated and monounsaturated fatty acids; R: rats fed the high-fat diet rich in rapeseed oil; RTC: rats fed the same diet as R, but enriched with vitamin E and CoQ10; RTCC: rats fed with the same diet as RTC, but enriched with canolol; Δ O.D.: change in optical density. a,b,c: In a given panel, histograms without a common letter are significantly different

Table 5 Activation of the inflammation pathway

	C	PS	R	RTC	RTCC
IkB α	1.57 \pm 0.13	1.38 \pm 0.11	1.31 \pm 0.09	1.38 \pm 0.06	1.48 \pm 0.16
ICAM	1.67 \pm 0.47	1.7 \pm 0.45	2.01 \pm 0.50	1.89 \pm 0.48	1.1 \pm 0.22
VCAM	0.84 \pm 0.22	0.92 \pm 0.22	0.87 \pm 0.18	1.11 \pm 0.27	1.13 \pm 0.21
NOS3	1.06 \pm 0.25	0.83 \pm 0.17	0.89 \pm 0.16	0.89 \pm 0.17	0.94 \pm 0.14

C control rats, PS rats fed a palm oil/sunflower seed oil mixture, R rats fed rapeseed oil, RTC rats fed rapeseed oil enriched with α -tocopherol and coenzyme Q10, RTCC rats fed RTC plus canolol, IkB α : nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha normalized density (aU), ICAM-1 intercellular adhesion molecule-1 mRNA expression, VCAM-1 vascular cell adhesion protein-1 mRNA expression, NOS3 nitric oxide synthase-3 mRNA expression. Averages of 12 animals per group

Mitochondrial biogenesis

This pathway was evaluated by determining PGC-1 α mRNA expression (Fig. 4). The various inter-group comparisons tested here (PS diet vs. C diet, R diet vs. PS diet, RTC and RTCC diets vs. R diet) did not find any significant differences.

Discussion

The purpose of this study was to evaluate the effects of ALA-rich rapeseed oil on some aspects of cardiac activity in the context of a high-fat diet and to see whether the addition of different rapeseed-sourced antioxidants (vitamin E, CoQ10 and canolol) improved the effects of the refined rapeseed oil. The main significant results obtained during the study are summarized in Table 6.

Effects of the different diets on cardiac phospholipid fatty acid composition

The high-fat diet rich in saturated and monounsaturated fats (PS diet) triggered an increase in cardiac phospholipid

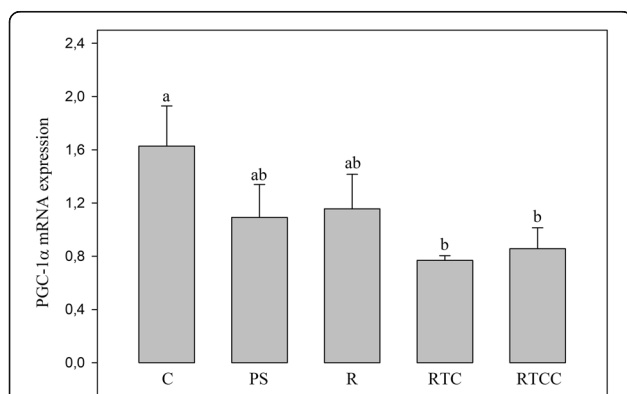


Fig. 4 Mitochondrial biogenesis estimated as PGC-1 α mRNA expression. Figures are averages of 12 rats per group. C: rats fed the control diet; PS: rats fed the high-fat diet rich in saturated and monounsaturated fatty acids; R: rats fed the high-fat diet rich in rapeseed oil; RTC: rats fed the same diet as R, but enriched with vitamin E and CoQ10; RTCC: rats fed the same diet as RTC, but enriched with canolol; PGC-1 α : peroxisome proliferator activated receptor alpha; a,b: In a given panel, histograms without a common letter are significantly different

SFA that was offset by a reduction in PUFA. These changes were associated with profound shifts in PUFA profile, probably in order to maintain membrane fluidity. The shortest and least unsaturated ω 6 PUFA (LA and C20:2 ω 6) were drastically decreased and replaced by the longest and most unsaturated ω 6 PUFAs (AA, C22:4 ω 6 and C22:5 ω 6). To compensate for this increased double bond index, all the ω 3-series PUFA were reduced. The membrane lipid changes induced by the palm oil-rich PS diet are close to those provoked by a high-fat diet composed mainly of lard [5]. Interestingly, other data obtained in Zucker Diabetic Fatty rats indicated that the membrane lipid changes shown here were similar to those observed in hyperphagic animals fed a low-fat diet with compositionally-balanced PUFA [24]. The lipid profile of a classical high-fat diet thus appeared to have little effect on membrane fatty acid composition, which means the key inducer of the observed changes was likely the high calorie intake and/or amount of ingested fatty acids.

Our results showed that this conclusion does not apply to all high-fat diets. R diet, which is a source of ALA, led to a very different cardiac phospholipid fatty acid profile, as proportion of AA was normalized in comparison with the control group and C22:4 and C22:5 ω 6 were even reduced. These ω 6 PUFAs were replaced by long-chain ω 3 PUFAs (ALA, DPA and DHA). These modifications are classic responses when dietary ω 6 PUFA are replaced by ω 3 PUFA. They are due to ω 6 and ω 3 PUFA competing for incorporation in membrane phospholipids, and have already been seen with low-fat diets [11]. Supplementing the R diet with antioxidant did not modify membrane-phospholipid fatty acid composition.

Effects of the different diets on oxidative stress

The different diets used here substantially modulated cardiac oxidative stress. The high-fat diets reduced oxidative stress compared to the control diet. This was characterized by a decrease in the amount of TBARS associated or not with an increase in thiol group preservation for the RSO-rich diets. These results can be explained by the PUFA profile of membrane phospholipids. The PS diet-induced increase in AA was already observed in one of our previous studies [5] evaluating the effects of a high-fat diet enriched with lard instead of palm oil. Coronary reactivity measurements indicated that the vasodilation capacities of the microvessels were increased by one or more cyclooxygenase product(s). AA can have a strong effect on vessel dilatation via its cyclooxygenase products (prostaglandins such as prostacyclin). Thus, the high-fat diet-induced accumulation of AA probably increased coronary flow. The heart reacts like an engine: when it receives more fuel, i.e. more blood in this case, it contracts more intensively. Our previous work clearly indicated that the high-fat

Table 6 Summary of the main significant results

	PS vs. C	R vs. PS	RTC vs. R	RTCC vs. RTC
PL PUFA				
ω6 PUFAs	↓ 18:2 and ↑ 20:4, C22:4, C22:5;	↑ 18:2, ↓ 20:4, 22:4 and 22:5;	-	-
ω3 PUFAs	↓	↑ 18:3, 22:5 and 22:6	-	-
PUFAs/SFAs	↓	↑	-	-
Ag2 pathway				
mRNA Ag2R-1b	-	-	↑	↓
Collagen	-	-	↑	↓
Metabolism				
mRNA for PDK4	-	-	↑	↓
DG	↓	↑	-	-
TG	-	-	-	↓
Oxidative stress				
Thiol group	-	↑	-	-
TBARS	↓	-	-	-
FRAP	↓	-	-	-
SOD activity	↓	-	-	-
GPX activity	-	-	↑	-
mRNA for SOD2	-	-	↑	↓
mRNA for GPX4	-	-	↑	-
Apoptosis				
Cleaved caspase-3	↓	-	-	-
p53 mRNA	-	-	↓	-

PS vs. C comparison between rats fed the high-saturated fatty acid diet and rats fed the control diet, *R vs. PS* influence of rapeseed oil in the context of a high-fat diet, *RTC vs. R* influence of the combination of vitamin E and coenzyme Q10 in the context of a high-fat diet enriched with rapeseed oil, *RTCC vs. RTC* influence of canolol in the context of a high-fat diet enriched with rapeseed oil, vitamin E and coenzyme Q10, *PL* phospholipid, *PUFAs* polyunsaturated fatty acids, *SFAs* saturated fatty acids, *Ag2* angiotensin 2, *mRNA* messenger ribonucleic acid, *PDK4* pyruvate dehydrogenase kinase-4, *DG* diglyceride, *TG* triglyceride, *TBARS* thiobarbituric acid reactive substances, *FRAP* ferric reducing ability of plasma, *SOD* superoxide dismutase, *GPX* glutathione peroxidase

diet was associated with increased in vivo cardiac mechanical function [5]. It was not possible to measure cardiac mechanical function here. However, given the large increase in AA proportion of cardiac membranes, it is likely that myocardial contractility was increased. This data brings crucial insight to help understand the observations here. Indeed, the high-fat diets reduced oxidative stress despite a decrease in SOD activity. Obesity is known to increase oxidative stress [25]. However, our results clearly indicate an opposite effect that could at least occur in the heart during an early and short phase. To our knowledge, this is the first report of this kind of observations. The reduction of oxidative stress could be related to the likely increase in mechanical activity of the heart. Mechanical stimulation inevitably increases cardiomyocyte energy demand. As a result, the mitochondria increase their oxidative phosphorylation rate. This stimulation of oxidative phosphorylation reduces the mitochondrial $\Delta\Psi$: in isolated mitochondria, with $\Delta\Psi$ being high during basal respiration and strongly reduced when oxidative phosphorylation is activated by

ADP [26]. However, mitochondrial ROS release is high during basal respiration and strongly reduced by ADP addition [27]. A high $\Delta\Psi$ is associated with numerous positive charges in the mitochondrial inter-membrane space which are able to extract electrons from the respiratory chain. These extracted electrons react with molecular oxygen to form superoxide anions. The relation between stimulation of mechanical function and reduced oxidative stress has already been observed in the heart in pathological situations such as the hyper-dynamic phase of sepsis [28]. Regular physical activity also reduces oxidative stress in skeletal muscle by decreasing the amount of TBARS [29] and enhancing GSH [30].

The reduced oxidative stress induced by the RSO-rich diets is more difficult to explain in relation to the PUFA profile of cardiac membranes, as proportions of AA were reduced to the levels observed in the control group. Therefore, the AA-induced activation of cardiac mechanical function was unable to fully explain the reduced oxidative stress induced by the RSO-rich diets. Cardiac mechanical performances were not determined here, so

we do not know whether they were increased in the RSO-fed animals compared to controls, but such an increase would enable the animals to maintain their mobility despite excess fat and body masses. AA was normalized by dietary ALA-rich RSO, which suggests that the R diet did not increase coronary reactivity and mechanical function. However, several ω 3 PUFA were increased. It is tempting to speculate that these fatty acids increased coronary micro-vessel dilatation, but there are only indirect evidences in the literature to support such an effect: ω 3 fatty acid supplementation improves endothelial function and maximal oxygen uptake in endurance-trained athletes [31]; endothelial function is boosted by ω 3 PUFA compared to saturated fats when circulating NEFA were increased by heparin treatment [32]; DHA-rich fish oil reverses the detrimental effects of SFA on postprandial vascular reactivity [33]. It is thus possible that dietary RSO improved coronary vessel dilatation and cardiac mechanical performances in this high-fat-diet context. The PS diets also decreased PUFA/SFA ratio while the ω 3 PUFA-rich diets failed to restore this value to the level measured in the C group. The increased cardiac mechanical activity thought to occur with high-fat diets could result from this decreased PUFAs/SFAs ratio which may govern membrane fluidity and consequently cardiac function. ω 3-PUFA are reported to increase membrane fluidity [34], which could perhaps sustain an increase in cardiac mechanical function as well as a decrease in mitochondrial ROS generation and cardiac oxidative stress.

Effects of the different diets on cellular death

The reduced amounts of cleaved caspase-3 showed that the high-fat diets decreased the rate of apoptosis. This was true for the PS diets as well as for the R, RTC and RTCC diets. These results were probably related to oxidative stress, which produces cellular death through apoptosis and necrosis [35]. Thus, the high-fat-diet-induced reduction of oxidative stress led to downregulation of the apoptosis pathway in the present study. It also tended to reduce cardiac collagen content, since there was lower cell death and higher amounts of viable cardiomyocytes persisting in the myocardium. This was true for all the high-fat diets except RTC which maintained collagen content at a similar level to the control group. Fibrotic tissue was thus more abundant with the RTC diet than with the R and RTCC diets. The phenomenon was associated with increased angiotensin-2 receptor-1b (Ag2R-1b) mRNA expression.

The accumulation of adipose tissue in the obese state causes a rise in circulating angiotensin 2 [36]. In this context, adipose tissue contributes to at least 30% of plasma angiotensin. Ag2R-1a and -1b have potent vasoconstrictive effects on coronary vessels [37], and their

activation by angiotensin 2 triggers autophagy and, in the long term, cardiac hypertrophy and heart failure [38]. Induced autophagy suggests cell death and fibrosis. The increased collagen content observed with the RTC diet can thus be explained by enhanced Ag2R-1b protein expression which potentiated the effects of angiotensin-2 on cellular death. The Ag2R activation-induced vasoconstriction of coronary micro-vessels probably triggered ischemia. Several features of myocardial activity suggested the occurrence of ischemia in this study. The RTC diet was associated with increased oxidative stress compared to the R diet, as signaled by an increase in GPx activity and SOD-2 and GPX-4 mRNA expression. However, ischemia is inevitably associated with increased ROS generation [39]. The observed changes evoked increased ROS production, which can induce cellular death as ω 3-PUFA are vulnerable to ROS attack. The oxidative stress led to mitochondrial dysfunctions: the rise of myocardial triglyceride content suggested a decrease in β -oxidation rate. Furthermore, the increased pyruvate dehydrogenase kinase-4 mRNA expression evoked a simultaneous decrease in glucose oxidation. Reductions of glucose and fatty acid oxidation rates probably led to ATP deficiency. However, ischemia is well known to trigger ATP breakdown [40], and to provoke cellular death through necrosis and apoptosis [41, 42]. However, apoptosis occurs when there is still enough ATP present in the cardiomyocytes to activate the apoptosome, whereas necrosis occurs with ATP deficiency. Our data showed that the high rate of cellular death in the RTC group occurred mainly through necrosis. Here, the quantification of p53 mRNA expression helped estimate the type of cellular death occurring with this diet. p53 protein is anti-apoptotic: p53 mRNA expression was reduced by the RTC diet compared to the R diet, which suggested that the cardiomyocytes attempted to increase apoptosis, as necrosis was high due to the ATP deficiency. This was then confirmed by the caspase-3 activity, which tended to be reduced with the RTC diet compared to the R diet. The high rate of necrosis observed with the RTC diet suggests that the Ag2R-1b mRNA overexpression was efficient in triggering ischemia.

Supplementation of the RTC diet with canolol reversed the situation, preventing the overexpression of Ag2R-1b and occurrence of ischemia, as demonstrated by the reductions in fibrosis (collagen content restored to levels observed with the R diet), metabolic dysfunctions (re-activation of β -oxidation and glucose degradation rates) and oxidative stress (decrease in SOD2 mRNA expression).

The reason why vitamin E + CoQ10 increased Ag2R-1b mRNA expression in the context of a high-fat RSO-enriched diet remains unknown. The increase was probably related to the doses of vitamin E and CoQ10 chosen

for this study. It has previously been shown that excess vitamin E is deleterious for isolated mitochondria [43], as it induces the opening of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) in the presence of calcium and thus promotes cell death. mPTP opening is provoked by excess oxidative stress [44]. High amounts of tocopheryl radicals in the mitochondrial membrane environment can thus trigger cellular death. It can also send signals to the nucleus to increase Ag2R-1b mRNA and protein expressions. The excess radical charge of tocopheryl compounds is usually detoxified by hydrophilic antioxidants such as vitamin C. In accordance with this hypothesis, addition of canolol to the RTC diet restored the situation observed with the R food. It is possible that canolol, despite being lipophilic, played the role of vitamin C and decreased the amount of tocopheryl radicals in the direct environment of the mitochondrial membrane. This process may be accompanied by a reduction in Ag2R-1b protein expression and in related toxicity.

Limitations of the study

This study used single doses of vitamin E, CoQ10 and canolol. It is possible that lower doses of vitamin E and CoQ10 would not be noxious through induction of ischemia, in which case the protective effects of canolol would not have been observed. In contrast, lower doses of vitamin E and CoQ10 may have been able to exert a cardioprotective effect by acting as an antioxidant therapy. The study was not designed to answer these questions. Likewise, lower or higher doses of canolol could be either without effect or noxious. Further studies with varied doses of each of these antioxidants along with an ALA-rich diet may confirm/argue against the findings reported in the present study. Such studies are necessary before an adequate dietary formula can be determined.

Conclusion

Our results indicated that the palm-oil-rich high-fat diet (PS diet) used here decreased cardiac oxidative stress, due to the increased accumulation of arachidonic acid in membrane phospholipids which, according to previous results collected in our laboratory, stimulates coronary perfusion and cardiac mechanical activity. As a result, energy metabolism was probably activated, which could reduce mitochondrial $\Delta\Psi$ and ROS generation. These changes were logically associated with reduced apoptosis and fibrosis. The high-fat diet enriched with rapeseed oil (R diet) had similar effects on cardiomyocyte activity, although it normalized the AA proportion of cardiac phospholipids. However, rapeseed oil contains ALA, a ω 3 fatty acid, which increased membrane accumulation of long-chain ω 3 fatty acids such as ALA, DPA and DHA. The cyclooxygenase products derived from these fatty acids can have similar dilatation effects on coronary

micro-circulation to the cyclooxygenase products formed from AA. When the R diet was enriched with vitamin E and CoQ10 (RTC diet), cardiac fibrosis was increased due to the occurrence of ischemia. The phenomenon was probably related to the accumulation of tocopheryl radicals in the environment of the mitochondrial membranes and an increased expression of angiotensin-2 receptor 1-b which has vasoconstriction properties. This ischemia was associated with deep mitochondrial dysfunctions characterized by a lower capacity to oxidize fatty acid and glucose and, finally, to synthesize ATP. Addition of canolol to the RTC diet suppressed the deleterious effects of excess vitamin E + CoQ10, probably by deactivating tocopheryl radicals in the mitochondria environment.

Taken together, our results indicated that ALA-rich rapeseed oil had an interesting effect since it strongly reduced the pro-inflammatory AA in cardiac phospholipids in favor of the anti-inflammatory long-chain ω 3 PUFAs; without increasing oxidative stress: in the long term, dietary ALA could prevent the occurrence of cardiac failure due to obesity. However, we noted that the occurrence of a sustained oxidative stress (induced by dietary vitamin E + CoQ10 supplementation probably in excess in our experimental conditions) precipitated the cardiomyocytes toward ischemia, necrosis and fibrosis, which can accelerate the occurrence of cardiac failure. This effect could be due to the particular vulnerability of membrane ω 3 fatty acids to ROS attack. Administration of an adequate antioxidant such as canolol in association with dietary ω 3 PUFA thus appears essential in order to protect the organism during the pathophysiological situations involving sustained oxidative stress.

Abbreviations

AA: Arachidonic acid; ADP: Adenosine diphosphate; Ag2R: Angiotensin-2 receptor; Akt: Protein kinase B; ALA: α -linolenic acid; ANOVA: Analysis of variance; ATP: Adenosine triphosphate; C: Control; cDNA: Complementary deoxyribonucleic acid; CoQ10: Coenzyme Q10; DG: Diglyceride; DHA: Docosahexaenoic acid; DPA: Docosapentaenoic acid; DTNB: Ellman's reagent; ECL: Enhanced chemiluminescence; EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid; EPA: Eicosapentaenoic acid; Fe^{III}-TPTZ: Ferric-tripyridyl triazine; FRAP: Ferric reducing ability of plasma; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GPx: Glutathione peroxidase; GSH: Reduced glutathione; H₂O₂: Hydrogen peroxide; HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; HRP: Horseradish peroxidase; ICAM: Intercellular adhesion molecule; ITCG: Institut des Corps Gras; I κ B α : Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha; LA: Linoleic acid; MMP9: matrix metalloproteinase 9; mRNA: messenger ribonucleic acid; NAC: N-acetyl-cysteine; NCSS: Number cruncher statistical system; NEFA: Nonesterified fatty acid; NoNo: Non-POU domain-containing octamer-binding protein; p: Probability; p53: Tumor protein p53; PDK: Pyruvate dehydrogenase kinase; PGC-1 α : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha; PS: Palm oil/sunflower oil; PUFA: Polyunsaturated fatty acid; PVDF: Polyvinylidene fluoride; qRT-PCR: Real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction; R: Rapeseed oil; ROS: Reactive oxygen species; RTC: Rapeseed oil + α -tocopherol + coenzyme Q10; RTCC: Rapeseed oil + α -tocopherol + coenzyme Q10 + canolol; SDS: Sodium dodecyl sulfate; SEM: Standard error of the mean; SFA: Saturated fatty acid; SOD: Superoxide dismutase; TBARS: Thiobarbituric acid reactive substances; TG: Triglyceride; TGF-

$\beta 1$: Transforming growth factor beta 1; VCAM: Vascular cell adhesion molecule; $\Delta\Psi$: Mitochondrial membrane potential

Acknowledgments

The authors thank all the staff of the INSA Lyon animal facility for assistance with animal care and Mireille Osman for assistance with the measurements and assays for GPX activity, FRAP, TBARS and thiol groups in the heart.

Funding

This work was performed as part of a program in partnership with the French Institute for Energy Transition (ITE) Picardy-region platform for plantlife innovations, tech research, and outreach (<https://institute-pivert.com>) venture selected as an "Investment for the Future" (*Investissements d'Avenir*) venture. This work received support, under the *Investissements d'Avenir* grants program, from the French Government under reference ANR-001-01.

Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study has been included in this published article.

Authors' contributions

TL, IH-F, AG, J-PR, CJ, EP and GP made substantial contributions to the implementation and technical completion of the study. FC, CV, J-MC, M-CM and CM-B contributed to conception and design of the study. FC and CM-B critically revised the manuscript critically and helped draft the final version. LD conducted the experiment, made substantial contributions to implementation of the study, conducted the statistical analysis and interpretation of data, and prepared the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

All experiments followed European Union guidelines concerning the care and use of laboratory animals for experimental and scientific purposes. All procedures involving animals and their care were approved by the INSA-Lyon Institutional Animal Care and Use Committee.

Consent for publication

All the authors have given the manuscript approval if accepted for publication in *Nutrition & Metabolism*.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Université Clermont Auvergne, INRA, UNH, Unité de Nutrition Humaine, CRNH Auvergne, 58 rue Montalembert, BP 321, 63009 Clermont-Ferrand cedex 1, France. ²Univ. Grenoble Alpes, INSERM, LBF, 38000 Grenoble, France. ³Univ-Lyon, laboratoire CarMeN, INRA UMR1397, INSERM U1060, Université Claude Bernard Lyon 1, INSA-Lyon, IMBL, 69621 Villeurbanne, France. ⁴ITERG-ENMS, Université de Bordeaux, rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex, France. ⁵Present address: Centre de Recherche INRA Bourgogne Franche Comté, Bâtiment Le Magnen, 17 rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon cedex, France.

Received: 24 October 2017 Accepted: 6 February 2018

Published online: 13 February 2018

References

- Flegal KM, Carroll MD, Kit BK, Ogden CL. Prevalence of obesity and trends in the distribution of body mass index among US adults, 1999-2010. *JAMA*. 2012;307(5):491-7.
- Bagi Z. Mechanisms of coronary microvascular adaptation to obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009;297(3):R556-67.
- Hashimoto M, Akishita M, Eto M, Kozaki K, Ako J, Sugimoto N, Yoshizumi M, Toba K, Ouchi Y. The impairment of flow-mediated vasodilatation in obese men with visceral fat accumulation. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1998;22(5):477-84.
- Kapiotis S, Holzer G, Schaller G, Haumer M, Widhalm H, Weghuber D, Jilma B, Roggla G, Wolzt M, Widhalm K, et al. A proinflammatory state is detectable in obese children and is accompanied by functional and morphological vascular changes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(11):2541-6.
- Mourmoura E, Chate V, Couturier K, Laillet B, Vial G, Rigaudiere JP, Morio B, Malpuech-Brugere C, Azarnoush K, Demaison L. Body adiposity dictates different mechanisms of increased coronary reactivity related to improved in vivo cardiac function. *Cardiovasc Diabetol*. 2014;13:54.
- Habbout A, Li N, Rochette L, Vergely C. Postnatal overfeeding in rodents by litter size reduction induces major short- and long-term pathophysiological consequences. *J Nutr*. 2013;143(5):553-62.
- Vial G, Dubouchaud H, Couturier K, Lanson M, Leverve X, Demaison L. Na⁺/H⁺ exchange inhibition with cariporide prevents alterations of coronary endothelial function in streptozotocin-induced diabetes. *Mol Cell Biochem*. 2008;310(1-2):93-102.
- Sergiel JP, Martine L, Raederstorff D, Grynberg A, Demaison L. Individual effects of dietary EPA and DHA on the functioning of the isolated working rat heart. *Can J Physiol Pharmacol*. 1998;76(7-8):728-36.
- Pinel A, Pitois E, Rigaudiere JP, Jouve C, De saint-Vincent S, Laillet B, Montaurier C, Huertas A, Morio B, Capel F. EPA prevents fat mass expansion and metabolic disturbances in mice fed with a western diet. *J Lipid Res*. 2016;57(8):1382-97.
- Zehr KR, Walker MK. Omega-3 polyunsaturated fatty acids improve endothelial function in humans at risk for atherosclerosis: a review. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*. 2018;134:131-40.
- Demaison L, Sergiel JP, 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 ischemia. *Biochim Biophys Acta*. 1994;1227(1-2):53-9.
- McLennan PL, Abeywardena MY, Dallimore JA, Raederstorff D. Dietary fish oil preserves cardiac function in the hypertrophied rat heart. *Br J Nutr*. 2012;108(4):645-54.
- Cicero AFG, Colletti A. Nutraceuticals and dietary supplements to improve quality of life and outcomes in heart failure patients. *Curr Pharm Des*. 2017;23(8):1265-72.
- Fleming JA, Kris-Etherton PM. The evidence for alpha-linolenic acid and cardiovascular disease benefits: comparisons with eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. *Adv Nutr*. 2014;5(6):863S-76S.
- Fotino AD, Thompson-Paul AM, Bazzano LA. Effect of coenzyme Q(10) supplementation on heart failure: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr*. 2013;97(2):268-75.
- Fretts AM, Mozaffarian D, Siscovick DS, Sitlani C, Psaty BM, Rimm EB, Song X, McKnight B, Spiegelman D, King IB, et al. Plasma phospholipid and dietary alpha-linolenic acid, mortality, CHD and stroke: the cardiovascular health study. *Br J Nutr*. 2014;112(7):1206-13.
- Goszcz K, Deakin SJ, Duthie GG, Stewart D, Leslie SJ, Megson IL. Antioxidants in cardiovascular therapy: panacea or false hope? *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2015;2:29.
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957;226(1):497-509.
- Juaneda P, Rocquelin G. Rapid and convenient separation of phospholipids and non phosphorus lipids from rat heart using silica cartridges. *Lipids*. 1985;20(1):40-1.
- Bouvard S, Faure P, Roucard C, Favier A, Halimi S. Characterization of free radical defense system in high glucose cultured HeLa-tat cells: consequences for glucose-induced cytotoxicity. *Free Radic Res*. 2002;36(9):1017-22.
- Poubelle P, Chaintreuil J, Bensadoun J, Blotman F, Simon L, Crastes de Paulet A. Plasma lipoperoxides and aging. Critical assessment of the thiobarbituric acid method for the measurement of lipoperoxides and malondialdehyde. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedicine & Pharmacotherapie*. 1982;36(3):164-6.
- Flohe L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*. 1984;105:114-21.
- Kramer JK, Farnworth ER, Thompson BK. Quantitating heart lipids: comparison of results obtained using the Iatrosan method with those from phosphorus and gas chromatographic techniques. *Lipids*. 1985;20(8):536-41.
- Mourmoura E, Vial G, Laillet B, Rigaudiere JP, Hininger-Favier I, Dubouchaud H, Morio B, Demaison L. Preserved endothelium-dependent dilatation of the coronary microvasculature at the early phase of diabetes mellitus despite the increased oxidative stress and depressed cardiac mechanical function ex vivo. *Cardiovasc Diabetol*. 2013;12:49.

25. Nawab A, Nichols A, Klug R, Shapiro JL, Sodhi K. Spin trapping: a review for the study of obesity related oxidative stress and Na⁺/K⁺-ATPase. *J Clin Cell Immunol*. 2017;8(3). Epub May 2017.
26. Sibille B, Ronot X, Filippi C, Nogueira V, Keriel C, Leverve X. 2,4 Dinitrophenol-uncoupling effect on delta psi in living hepatocytes depends on reducing-equivalent supply. *Cytometry*. 1998;32(2):102–8.
27. Garait B, Couturier K, Servais S, Letexier D, Perrin D, Batandier C, Rouanet JL, Sibille B, Rey B, Leverve X, et al. Fat intake reverses the beneficial effects of low caloric intake on skeletal muscle mitochondrial H₂O₂ production. *Free Radic Biol Med*. 2005;39(9):1249–61.
28. Leger T, Charrier A, Moreau C, Hiningier-Favier I, Mourmoura E, Rigaudiere JP, Pitois E, Bouvier D, Sapin V, Pereira B, et al. Early sepsis does not stimulate reactive oxygen species production and does not reduce cardiac function despite an increased inflammation status. *Physiological Reports*. 2017;5(13)
29. Pinho RA, Andrades ME, Oliveira MR, Pirola AC, Zago MS, Silveira PC, Dal-Pizzol F, Moreira JC. Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. *Cell Biol Int*. 2006;30(10):848–53.
30. Sen CK. Glutathione homeostasis in response to exercise training and nutritional supplements. *Mol Cell Biochem*. 1999;196(1–2):31–42.
31. Zebrowska A, Mizia-Stec K, Mizia M, Gasior Z, Poprzecki S. Omega-3 fatty acids supplementation improves endothelial function and maximal oxygen uptake in endurance-trained athletes. *European Journal of Sport Science*. 2015;15(4):305–14.
32. Newens KJ, Thompson AK, Jackson KG, Williams CM. Endothelial function and insulin sensitivity during acute non-esterified fatty acid elevation: effects of fat composition and gender. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases : NMCD*. 2015;25(6):575–81.
33. Newens KJ, Thompson AK, Jackson KG, Wright J, Williams CM. DHA-rich fish oil reverses the detrimental effects of saturated fatty acids on postprandial vascular reactivity. *Am J Clin Nutr*. 2011;94(3):742–8.
34. Kamat SG, Roy R. Evaluation of the effect of n-3 PUFA-rich dietary fish oils on lipid profile and membrane fluidity in alloxan-induced diabetic mice (*Mus Musculus*). *Mol Cell Biochem*. 2016;416(1–2):117–29.
35. Sack MN, Fyhrquist FY, Saijonmaa OJ, Fuster V, Kovacic JC. Basic biology of oxidative stress and the cardiovascular system: part 1 of a 3-part series. *J Am Coll Cardiol*. 2017;70(2):196–211.
36. Pahlavani M, Kalupahana NS, Ramalingam L, Moustaid-Moussa N. Regulation and functions of the renin-angiotensin system in white and brown adipose tissue. *Comprehensive Physiology*. 2017;7(4):1137–50.
37. Storch U, Blodow S, Gudermann T, Mederos YSM. Cysteinyl leukotriene 1 receptors as novel mechanosensors mediating myogenic tone together with angiotensin II type 1 receptors-brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35(1):121–6.
38. Porrello ER, Delbridge LM. Cardiomyocyte autophagy is regulated by angiotensin II type 1 and type 2 receptors. *Autophagy*. 2009;5(8):1215–6.
39. Matejikova J, Kucharska J, Pinterova M, Pancza D, Ravingerova T. Protection against ischemia-induced ventricular arrhythmias and myocardial dysfunction conferred by preconditioning in the rat heart: involvement of mitochondrial K(ATP) channels and reactive oxygen species. *Physiol Res*. 2009;58(1):9–19.
40. Takami H, Furuya E, Tagawa K, Seo Y, Murakami M, Watari H, Matsuda H, Hirose H, Kawashima Y. NMR-invisible ATP in rat heart and its change in ischemia. *J Biochem*. 1988;104(1):35–9.
41. Borutaite V, Jekabsone A, Morkuniene R, Brown GC. Inhibition of mitochondrial permeability transition prevents mitochondrial dysfunction, cytochrome c release and apoptosis induced by heart ischemia. *J Mol Cell Cardiol*. 2003;35(4):357–66.
42. Fujiwara H, Onodera T, Tanaka M, Miyazaki S, Wu DJ, Matsuda M, Kawamura A, Ishida M, Takemura G, Fujiwara Y, et al. Acceleration of cell necrosis following reperfusion after ischemia in the pig heart without collateral circulation. *Am J Cardiol*. 1989;63(10):14E–8E.
43. Meynier A, Razik H, Cordelet C, Gregoire S, Demaison L. Involvement of oxygen free radicals in the respiratory uncoupling induced by free calcium and ADP-magnesium in isolated cardiac mitochondria: comparing reoxygenation in cultured cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem*. 2003;243(1–2):55–64.
44. Saotome M, Katoh H, Yaguchi Y, Tanaka T, Urushida T, Satoh H, Hayashi H. Transient opening of mitochondrial permeability transition pore by reactive oxygen species protects myocardium from ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;296(4):H1125–32.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Publication n°2

Dietary EPA increases rat mortality in diabetes mellitus, a phenomenon which is compensated by green tea extract.

Le diabète se caractérise par un taux de mortalité élevé qui est souvent associé à une insuffisance cardiaque (Giacco et Brownlee 2010; Mourmoura et al. 2013). Le thé vert et l'EPA sont connus pour améliorer certains des effets néfastes du diabète et pour exercer une cardio-protection (Babu et Liu 2008; Tenore et al. 2015; Demaison et al. 1994; Golzari et al. 2018).

Le but de l'étude consiste à déterminer les effets de l'EPA, de l'extrait de thé vert et de l'association des deux interventions nutritionnelles sur les conséquences cardiaques du diabète sucré induit chez le rat Wistar par injection d'une faible dose de streptozotocine (33 mg/kg) en association avec un régime riche en graisses (HF pour high-fat). La fonction mécanique cardiaque et la réactivité coronaire ont été évaluées à l'aide d'un système de cœur isolé perfusé selon la méthode de Langendorff.

L'association d'un régime HF et d'un diabète induit par la streptozotocine chez le rongeur déclenche un diabète sucré qui correspond probablement à un diabète de type 2 tardif favorisant un décès partiel des animaux. L'enrichissement en EPA accroît considérablement le taux de mortalité en raison d'une déshydratation et d'un état catabolique exacerbé. Le phénomène est cependant contrebalancé par l'association avec l'extrait de thé vert, probablement en raison des propriétés anti-oxydantes de ce dernier. Le taux de mortalité ne semble pas corrélé à la fonction cardiaque. Les détériorations de la fonction cardiaque induites par le diabète sont liées au stress oxydant et à une augmentation de l'acidose cellulaire associée à des modifications du métabolisme calcique intracellulaire. La fortification avec le thé vert améliore la fonction cardiaque par deux mécanismes : en augmentant la vasodilatation coronaire et en inhibant l'échangeur NHE1 par l'épicatéchine. L'ajout d'EPA dans le régime alimentaire

supprime principalement l'acidose et établi un profil en AGPI favorable dans les phospholipides cardiaques. Le mécanisme exact par lequel l'EPA augmente le taux de mortalité dans la situation diabétique reste à élucider.

Pour conclure sur cette étude, dans un contexte de stress oxydant important tel que celui du diabète sucré, l'enrichissement en EPA constitue un facteur de risque pour la survie des animaux. Son association avec les antioxydants contenus dans le thé vert est non seulement essentielle pour diminuer le taux de mortalité mais elle permet également une meilleure préservation de la fonction cardiaque.



Article

Dietary EPA Increases Rat Mortality in Diabetes Mellitus, a Phenomenon Which Is Compensated by Green Tea Extract

Thibault Leger ^{1,*}, Beibei He ¹, Kasra Azarnoush ^{1,2,3} , Chrystèle Jouve ¹, Jean-Paul Rigaudière ¹, Florent Joffre ⁴, Damien Bouvier ⁵ , Vincent Sapin ⁵ , Bruno Pereira ⁶ and Luc Demaison ¹

¹ Unité de Nutrition Humaine (UNH), INRA/Université Clermont Auvergne, 63000 Clermont-Ferrand, France; hebeibei0122@hotmail.com (B.H.); kasra.azarnoush@chu-st-etienne.fr (K.A.); chrystele.jouve@inra.fr (C.J.); jean-paul.rigaudiere@inra.fr (J.-P.R.); luc.demaison@inra.fr (L.D.)

² Heart Surgery Department, Gabriel Montpied Hospital, Clermont-Ferrand University Hospital, 63000 Clermont-Ferrand, France

³ Hôpital Nord, Saint-Etienne University Hospital, 42270 Saint-Priest-en-Jarez, France

⁴ ITERG, 11 rue Gaspard Monge, - ZA Pessac Canéjan, F-33610 Canéjan, France; f.joffre@iterg.com

⁵ Department of Medical Biochemistry and Molecular Biology, CHU Clermont-Ferrand, 63000 Clermont-Ferrand, France; dbouvier@chu-clermontferrand.fr (D.B.); vsapin@chu-clermontferrand.fr (V.S.)

⁶ Department of Clinical Research and Innovation, CHU Clermont-Ferrand, 63000 Clermont-Ferrand, France; bpereira@chu-clermontferrand.fr

* Correspondence: thibault.leger@gmail.com

Received: 16 October 2019; Accepted: 31 October 2019; Published: 4 November 2019



Abstract: Diabetes is characterized by a high mortality rate which is often associated with heart failure. Green tea and eicosapentaenoic acid (EPA) are known to lessen some of the harmful impacts of diabetes and to exert cardio-protection. The aim of the study was to determine the effects of EPA, green tea extract (GTE), and a combination of both on the cardiac consequences of diabetes mellitus, induced in Wistar rats by injection of a low dose of streptozotocin (33 mg/kg) combined with a high fat diet. Cardiac mechanical function, coronary reactivity, and parameters of oxidative stress, inflammation, and energy metabolism were evaluated. In the context of diabetes, GTE alone limited several diabetes-related symptoms such as inflammation. It also slightly improved coronary reactivity and considerably enhanced lipid metabolism. EPA alone caused the rapid death of the animals, but this effect was negated by the addition of GTE in the diet. EPA and GTE combined enhanced coronary reactivity considerably more than GTE alone. In a context of significant oxidative stress such as during diabetes mellitus, EPA enrichment constitutes a risk factor for animal survival. It is essential to associate it with the antioxidants contained in GTE in order to decrease mortality rate and preserve cardiac function.

Keywords: diabetes; heart; coronary reactivity; EPA; green tea; mitochondria

1. Introduction

Diabetes is one of the major causes of death in humans, accounting for one death every six seconds worldwide according to the International Diabetes Federation (IDF). The eighth IDF Diabetes Atlas suggests that 425 million people, or one in 11 adults, have diabetes mellitus. This number is predicted to rise to almost 700 million by 2045 (“IDF Diabetes Atlas - 2017” n.d.) [1]. The World Health Organization reports that the annual international cost of diabetes is more than US \$827 billion. There are different kinds of diabetes of which diabetes mellitus is the most prevalent. It exists in two major forms: Type I diabetes, characterized by insulin deficiency, and type II, associated with insulin pathway dysfunction.

Each form represents 6% and 92% of diabetic people, respectively. Other kinds of diabetes are more specific. These are gestational diabetes, neonatal diabetes, maturity onset diabetes of the young, and latent autoimmune diabetes in adults. Just over 210 million people worldwide are estimated to suffer from undiagnosed diabetes (“IDF Diabetes Atlas - 2017 Atlas” n.d.), including over 90% of those with monogenic diabetes [2].

All forms of diabetes mellitus lead to hyperglycemia [3,4]. Chronic high blood glucose increases HBA1c and promotes end-damage of several organs. Heart failure occurs in more than 30% of diabetic patients [5], although blood glucose control limits the development of complications [6]. Some cardiac alterations appear in the early stage of diabetes mellitus: Impairment of insulin-related pathways, increase in non-esterified fatty acids (NEFAs), lipotoxicity in myocardial tissue, and mitochondrial dysfunctions [7,8]. Mitochondrial dysfunctions cause oxidative stress to increase, leading to complications such as inflammation characterized by the activation of the nuclear factor kappa-B (NF- κ B) pathway. This phenomenon stimulates the synthesis of pro-inflammatory cytokines and thus provokes multiple cardiovascular diseases [9,10]. Furthermore, NF- κ B induces oxidative stress and increases mitochondrial dysfunctions [11]. Later stage diabetes is characterized by fibrosis with collagen accumulation and coronary microcirculation dysfunctions [12,13]. Diabetic patients often develop electrolyte perturbations such as diabetic ketoacidosis or non-ketotic hyperglycemic hyperosmolar syndrome. This leads to changes in systemic concentrations of potassium, magnesium, phosphate, and calcium ions [14]. Streptozotocin (STZ)-treated rats display reduced myocardial expression of sodium-calcium exchanger 1 (NCX1) calcium channels due to calcium depletion in the blood [15].

The beneficial impact of certain omega 3 (ω 3) polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in the management of diabetes has recently been highlighted [16,17]. The cardiac benefits of ω 3 have recently been the subject of increasing interest. These benefits have been observed during ischemia/reperfusion [18], hypertrophy [19], and arrhythmias [20]. In general, ω 3 protection improves the clinical outcomes of cardiovascular diseases [21]. Among the ω 3 long-chain PUFAs (LC-PUFAs) of marine origin, eicosapentaenoic acid (EPA) (C20:5 n-3) has particularly noticeable positive effects [22]. Its main cardio-protective property is a result of its anti-inflammatory effects, in contrast with ω 6 (omega 6) PUFAs which are pro-inflammatory [23]. Preservation of mitochondrial integrity has also been shown to intervene in the ω 3 LC-PUFAs-induced cardio-protection [24]. In the western diet, the ω 6/ ω 3 PUFAs ratio is approximately 15/1. The World Health Organization recommends increasing ω 3 dietary intake to 4–5/1 [25]. Lowering this ratio improves cardiac phospholipids’ ω 6/ ω 3 PUFAs ratio, stimulating beneficial effects in patients with cardiac diseases [26]. An improvement in insulin sensitivity has also been observed with ω 3 PUFAs in obese subjects [27].

Green tea is also known to reduce risk and mortality due to cardiovascular diseases [28,29]. Catechins, in particular epigallocatechin gallate (EGCG), provide tea with antioxidant and other beneficial properties [30,31]. Its antioxidant properties have been proven in rats subjected to STZ-induced diabetes [32]. In addition, green tea has a hypoglycemic effect during diabetes [33] by improving glucose tolerance and insulin sensitivity in murine models of diabetes [34], reducing hepatic glucose production [35] and limiting intestinal glucose transport [36]. Furthermore, green tea has the potential to inhibit the NF- κ B pathway, to limit the release of pro-inflammatory cytokines, and to reduce lipid peroxidation in the hearts of diabetic animals [37,38]. Green tea also has lipid-lowering properties [39]. Finally, Liu et al. recently highlighted the mitigation of cardiac mitochondrial dysfunction in diabetic Goto-Kakizaki rats using EGCG [40].

The purpose of this study was: (i) to determine the impact of diabetes induced by STZ injection and a high-fat diet (HFD) on cardiac activity and mitochondrial function in rats; (ii) to evaluate the effects of enrichments with EPA, green tea extract (GTE), and a combination of both on the cardiac consequences of the diabetes triggered in this study; and (iii) to analyze the mechanisms involved in the observed effects. Several features of myocardial function were assessed: Ex vivo cardiac mechanical function, fatty acid composition of cardiac phospholipids, plasma parameters, and several factors related to oxidative stress and inflammation.

2. Materials and Methods

2.1. Ethical Approval

All the experiments followed the European Union recommendations for the care and use of laboratory animals for experimental and scientific purposes. All animal work was approved by the local board of ethics for animal experimentation (Comité d'éthique pour l'expérimentation animale, Auvergne) and declared to our laboratory's animal research facility (authorization No. APAFIS#14870-2018042711405357v2). The research complied with the ARRIVE animal research guidelines [41].

2.2. Experimental Rats and Diet

Fifty three-month-old male Wistar rats (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France) were kept under controlled lighting, humidity, and temperature conditions, with two or three rats per cage. After one week of acclimatization, the rats were randomly allocated to five dietary groups. The control group (CTRL) was fed with a normolipidic diet (A04, Safe, Augy, France). The other groups were subjected to a HFD containing (in % *w/w*) casein (27), L-cysteine (0.3), soy oil (3.5), butter (31.7), amylum (5), maltodextrin (8.85), saccharose (13), cellulose (6), mineral mixture (3.5), vitamin mixture (3.5), and choline (0.15). The lipid fraction represented 3% and 35.2% for the normolipidic and high-fat diets. Three diabetic groups were enriched with EPA and/or GTE. In the first group, part of the saturated fatty acids (1.2% of the diet) was replaced by triglyceride-rich EPA. In the second group, part of maltodextrin (0.5% of the diet) was substituted with GTE. Finally, the third group received both substitutes. The animals were fed *ad libitum* with these different diets for nine weeks. The details of the diets are presented in Table 1. It is notable that no lipid peroxidation occurred in the diets, in spite of the high vulnerability of EPA to damage from reactive oxygen species.

Table 1. Composition of the diets.

Food Components	CTRL	DIAB	DIAB+EPA	DIAB+GTE	DIAB+EPA+GTE
Fatty acid composition: (% of lipids of the diet)					
C14:0		14.27	12.29	13.36	12.71
C15:0		1.39	1.17	1.24	1.19
C16:0	20.32	38.25	33.78	36.96	34.3
C17:0			0.59	0.63	0.6
C18:0		10.85	10.23	9.81	10.18
C20:0			0.04		
SFAs	20.32	64.76	58.1	62.01	58.97
C14:1		1.65	1.18	0.84	0.75
C16:1 ω 7		1.34	1.4	1.78	1.69
C17:1			0.1		0.16
C18:1 trans		1.46	2.13	1.66	2.14
C18:1 ω 9	20.43	20.61	22.99	23.61	23.45
C18:1 ω 7	1.69		0.73		
MUFAs	22.11	25.05	28.53	27.89	28.19
C18:2 ω 6 cis	53.66	8.67	8.74	8.64	8.7
C20:4 ω 6			0.25		0.2
ω 6 PUFAs	53.66	8.67	8.99	8.64	8.9
C18:3 ω 3	3.9	1.52	4.38	1.46	1.51
C18:4 ω 3			0.22		
C20:5 ω 3			2.67		2.43
ω 3 PUFAs	3.9	1.52	4.38	1.46	3.94
ω 6/ ω 3 PUFAs	13.75	5.71	2.05	5.9	2.26
Lipid part of diet (%)	3	35.2	35.2	35.2	35.2
EPA (% of the diet)	/	/	1.2	/	1.2
GTE (% of the diet)	/	/	/	0.5	0.5
GTE component: (% of GTE)					
Total phospholipids	/	/	/	\geq 40	\geq 40
Catechins	/	/	/	\geq 25	\geq 25
EGCG	/	/	/	\geq 10	\geq 10
Caffeine	/	/	/	\leq 7	\leq 7
Vitamin E (mg/kg of EFM)	/	346	419	357	430
Peroxide value: (mEq O ₂ /kg of EFM)					
	/	3	6.9	3.1	5.6

CTRL: Control group; DIAB: Diabetic rats; GTE: Green tea extract; and EPA: Eicosapentaenoic acid. SFAs: Saturated fatty acids; MUFAs: Mono-unsaturated fatty acids; PUFAs: Polyunsaturated fatty acids; EGCG: Epigallocatechin gallate; and EFM: Extracted fat mass.

2.3. Diabetes Triggering

After three weeks of feeding, the animals of the four groups fed with HFD (diabetes (DIAB), DIAB+EPA, DIAB+GTE, and DIAB+EPA+GTE) were injected intraperitoneally with STZ (33 mg/kg in citrate buffer, pH 4.5) on the 21st day, following an adapted method initially described by Srinivasan et al. [42]. CTRL animals were sham-injected with the same volume of citrate buffer without STZ.

2.4. Morphological Data

Body weight, fat mass, and lean mass were evaluated each week in live animals by magnetic resonance imaging (Echo MRI LL, Houston, TX, USA). Food consumption was measured twice a week in each cage of two or three animals.

2.5. Assessment of Ex Vivo Cardiac Mechanical Function

After the six week post-injection period, hearts were perfused at constant coronary flow using the non-recirculating Langendorff method. A rapid thoracotomy was performed, and the heart was immediately collected and placed in 4 °C saline buffer until cessation of beating. In the first minute after removal, the heart was perfused through the aorta at 37 °C with a Krebs-Heinselett buffer in order to avoid cellular damage and preconditioning problems. The perfusion fluid was composed of (in mM) NaCl (119), KCl (4.8), MgSO₄ (1.6), NaHCO₃ (22), KH₂PO₄ (1.2), CaCl₂ (1.8), D-glucose (11), and sodium hexanoate (0.5), pH 7.4. It was maintained at 37 °C and constantly oxygenated with carbogen (95% O₂, 5% CO₂). The heart was constantly perfused with a peristaltic pump (Gilson, Middleton, WI, USA), thus upholding the perfusion flow at 14 mL/min until the end of the perfusion. From the fifth minute of perfusion, the hearts were electrically paced at a rate of 368 beats/min. To evaluate cardiac mechanical activity, a latex balloon related to a pressure probe and an amplifier was inserted into the left ventricle. It was inflated until the diastolic pressure reached 10 mmHg. This system meant that systolic, diastolic, and developed pressures as well as heart rate, contraction (dP/dt max), and relaxation (dP/dt min) could be evaluated. The evaluation of these last two parameters was made possible by the use of perfectly standardized perfusion conditions. The coronary pressure was also evaluated with a pressure probe inserted just before the aortic cannula. Changes in the coronary pressure reveal modifications of coronary volume (coronary dilatation, constriction, and/or obliteration of coronary vessels). All the parameters of cardiac function were recorded and analyzed with HSE software (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Germany).

2.6. Coronary Reactivity

At the 50th min of perfusion, the coronary tone was raised by the constant infusion of vasoconstrictor thromboxane analog U46619 (30 nM) into the perfusion system near the aortic cannula, at a maximum rate of 1.5% of coronary flow. This procedure induced a coronary pressure of 95 to 115 mmHg. The vasodilation potential was evaluated with two agents at several doses: Acetylcholine (10, 20, 30, and 40 pmol) and sodium nitroprusside (100, 200, 300, 400, and 500 pmol). Acetylcholine (Ach) and sodium nitroprusside (SN) vasodilations reflected, respectively, the endothelial-dependent vasodilatation (EDD), due to the simultaneous action of endothelial and smooth muscle cells, and endothelial-independent vasodilatation (EID), due to the relaxation of smooth muscle cells. The dilatation amplitude was calculated as the ratio between the maximal decrease in coronary pressure and the coronary pressure just before the injection of the dilatation agents. As the heart weight and coronary volume were subjected to intra- and intergroup variations, a correction was performed to normalize the input function of vasodilatation agents according to coronary flow. The dose-response curve between the amount of Ach injected and the maximal EDD was then fitted to a third degree polynomial for each heart, thus enabling the performance of statistical analyses. In the case of the EID, the curves were fitted to an Ln function. The vasodilation activities of endothelial cells (ECVA)

were also estimated from the corrected EDD and EID. For each heart and each injected Ach dose, the amount of SN (reflecting the amount of dilatation agent) necessary to obtain the same percentage of Ach-induced dilatation was extracted from the EID curve according to the formula: $(ECVA) = e^{[(\% \text{ Ach-induced dilatation}-b)/a]}$, where a and b are the coefficients of the theoretical EID curve. The results were expressed in picomole-equivalents of SN.

At the end of the perfusion protocol, atria and the remaining aorta were cut off from the heart. A piece of myocardium (approximately 200 mg) from the apex of the heart was immediately freeze-clamped and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for further analysis. The other part of the myocardium was immediately used for mitochondrial preparation.

2.7. Preparation of Isolated Mitochondria

The mitochondria were extracted as previously described [43]. Myocardium was shredded with scissors in cold isolation buffer A, composed of mannitol 220 mM, sucrose 70 mM, MOPS 5 mM, and EGTA 2 mM, pH 7.4 at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, fatty acid-free serum albumin 0.2%. The myocardium pieces were rinsed several times on a filter and homogenized with a blender (0.4 s, rheostat = 3, Polytron) and a Potter-Elvehjem homogenizer containing 15 mL of isolation buffer A. After centrifugation ($800\times g$, 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), the supernatant with mechanically-extracted mitochondria was kept in ice. The pellet was re-suspended in cold isolation buffer B, composed of KCl 100 mM, MOPS 50 mM, and EGTA 2 mM, pH 7.4 at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, fatty acid-free serum albumin 0.2%. A protease (subtilisin 0.02%) was added for 1 min to digest myofibrils at ice temperature, and the totality was then homogenized with Potter-Elvehjem homogenizer (300 rpm, three to four transitions). Immediately afterward, subtilisin action was stopped by adding isolation buffer B (30 mL) and centrifuging ($8000\times g$, 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). The supernatant was discarded and the pellet was re-suspended in isolation buffer B. The homogenate was centrifuged ($800\times g$, 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), and the resulting supernatant with enzymatically-extracted mitochondria was filtered and collected with the other supernatant. Mitochondria were then washed by centrifuging ($8000\times g$, 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). The pellet of mitochondria was suspended in cold isolation buffer C, composed of KCl 100 mM, MOPS 50 mM, and EGTA 1 mM, pH 7.4 at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, re-centrifuged ($8000\times g$, 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) and finally re-suspended at a concentration of approximately 13 mg/mL. It was then frozen and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.8. Western Blot Analysis

Tissues were ground three times in a mini bead beater in the presence of a lysis buffer constituted of HEPES 50 mM, sodium chloride 150 mM, EDTA 10 mM, anhydrous sodium tetrabasic pyrophosphate 10 mM, β -glycerophosphate 25 mM, sodium fluoride 100 mM, and anhydrous glycerol 1.086 M supplemented with phosphatase inhibitors (Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). Successive centrifugations were performed and the supernatants collected. Protein was quantified using a bicinchoninic acid assay kit (Thermo Fisher Scientific, Asnières-sur-Seine, France). For protein immunoblotting, 25 μg of proteins were loaded for separation by SDS-PAGE electrophoresis and transfer on polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes. Membranes were then immunoblotted with the appropriate antibody to detect acetylated-lysine (Ac-K, 1:1000, Cell Signaling #9441), acetylated-superoxide dismutase 2 (Ac-SOD2, 24 kDa, 1:1000, Abcam #ab137037), β -actin (β -actin, 42 kDa, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Abcam #ab25894), carnitine palmitoyltransferase 1b (CPT1b, 87 kDa, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Abcam #ab134988), glutathione peroxidase 1 (GPX1, 22 kDa, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Abcam #22604), nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cell inhibitor alpha ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, 39 kDa, 1:1000, Cell Signaling #9242), NADPH oxidase 1 (NOX1, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Abcam #ab131088), pyruvate dehydrogenase acetyl-transferring kinase isozyme 4 (PDK4, 47 kDa, ThermoFisher #PA5-79800), nitrosylated-tyrosine (1:1000, Thermo Scientific #32-1900), sirtuin-1 (Sirt1, 120 kDa, 1:1000, Cell Signaling #9475), sirtuin-3 (Sirt3, 28 kDa, 1:500, Santa Cruz #sc-365175), superoxide dismutase 1 (SOD1, 18 kDa, 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Abcam #ab13498), superoxide dismutase 2 (SOD2, 22 kDa, 1:1000, Cell Signaling #13194), uncoupling protein-3 (UCP3, 34 kDa, 1:1000, Abcam #ab10985), and voltage-dependent anion-selective channel (VDAC,

32 kDa, 1:1000, Cell Signaling #4866). Antibody binding was detected using horse radish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies and ECL Western blotting substrate (Thermo Fisher Scientific, Asnières-sur-Seine, France).

Immunoblots were visualized using a chemiluminescence imaging system (MF ChemiBIS, DNR bio-imaging systems, Jerusalem, Israel) and quantified using MultiGauge V3.2 software (FSTV, Courbevoie, France). For detection of nitrosylated proteins, protein extraction was performed according to the manufacturer's instructions. Protein carbonylation was evaluated with a commercially available OxyBlot Protein Oxidation Detection Kit (S7150, Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). The assessments were performed either on myocardial tissue or on isolated mitochondria. Myocardial and mitochondrial proteins were referred to β -actin and VDAC for their intergroup stability.

2.9. Gene Expression

Total ribonucleic acid (RNA) was extracted from 50 mg of cardiac powder using TRIzol[®] (Thermo Fisher Scientific, Asnières-sur-Seine, France) according to the manufacturer's instructions. Chloroform was added (0.2 mL/mL of TRIzol[®]) and samples were mixed and centrifuged for 15 min at 12,000 \times g at 4 °C. Aqueous phase containing RNA was collected, mixed with isopropanol to precipitate RNA, and centrifuged (12,000 \times g, 4 °C, 15 min). After centrifugation, the pellet was washed with ethanol 70% (v/v), and dried and suspended in water. RNA quantification was verified by measuring the ratio of optical densities at 260 nm and 280 nm, whilst RNA integrity was confirmed by agarose gel migration. cDNAs were synthesized from 2 μ g of total RNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit from Applied Biosystem (Thermo Fisher Scientific, Asnières-sur-Seine, France). The products of reverse transcription were used for quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) using specific primers and Rotor-Gene SYBR Green PCR master mix on a Rotor-Gene Q system (Qiagen, Courtaboeuf, France). Messenger RNA (mRNA) was quantified using the standard curve of native cDNA and serial dilutions. The cardiac mRNA expressions were determined for catalase, interleukins 10, 1 β , and 6 (IL10, IL-1 β and IL6), sodium-calcium exchanger 1, sodium-hydrogen antiporter 1 (NHE1), and superoxide dismutase 2. Primer sequences and PCR conditions are presented in Table 2. After testing several housekeeping genes (cardiac α -actin, β -actin, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), 60S acidic ribosomal protein P0 (RPLP0), and hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1)), GAPDH was chosen for its intergroup stability.

Table 2. Real-time PCR primers used in this study.

Gene	Sequence (5'-3')
β -Actin (NM_031144.3)	(F) TCTGTGTGGATTGGTGGCTCTA (R) CTGCTTGCTGATCCACATCTG
Catalase (NM_012520.2)	(F) CCTGACATGGTCTGGGACTTC (R) AGCTTGAAGGTGTGTGAGCC
GAPDH (NM_017008.4)	(F) GAACATCATCCCTGCATCCA (R) CCAGTGAGCTTCCCGTTCA
IL10 (NM_012854.2)	(F) GTAGAAGTGATGCCCCAGGC (R) AGACACCTTTGTCTTGGAGC
IL-1 β (NM_031512.2)	(F) AAATGCCTCGTGCTGTCTGA (R) GGTGTGCCGTCTTTCATCAC
IL6 (NM_012589.2)	(F) AGCGATGATGCACTGTCAGA (R) GGAACCCAGAAGACCAGAGC
NCX1 (NM_019268.3)	(F) TGTTGTTAAATGAGCTTGGTGG (R) TTACGGTAGAGGGAATCGGATG
NHE1 (NM_012652.1)	(F) AACGGCTGCGGTCCCTATAAC (R) CGAGACATGGTGGGTGAGTC
SOD2 (NM_017051.2)	(F) TGAACAATCTGAACGTCACCG (R) CCTTAGGGCTCAGGTTTGTC

(F): Forward; (R): Reverse. GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; IL-1 β : Interleukin-1 β ; IL-6: Interleukin-6; IL-10: Interleukin-10; NCX1: Sodium-calcium exchanger 1; NHE1: Sodium-proton exchanger 1; and SOD2: Superoxide dismutase 2.

2.10. Other Biochemical Determinations

During the dietary period, glycemia was determined three times a week in a blood droplet collected at the extremity of the tail with a glucose analyzer (ACCU-CHEK Softclix, Newpharma, Liège, Belgium). Insulinemia was determined on the day of sacrifice using an immunoassay kit (Eurobio Laboratoire Abcys, Courtaboeuf, France). Circulating lipids (non-esterified fatty acids, triglycerides, total, high-density lipoprotein, and low-density lipoprotein cholesterols) were assayed with commercial kits (Diasys, Grabels, France). Other plasma compounds, namely creatinine, sodium, and chloride, were analyzed using commercially-available kits (Abcam, Paris, France). Myocardial total collagen was assessed with a kit manufactured by Quickzyme (Leiden, The Netherlands).

2.11. Fatty Acid Composition of Cardiac Phospholipids

Total lipids were extracted from cardiac tissues according to Folch et al.'s procedure [44]. Lipid extracts were prepared from approximately 50 mg of cardiac tissue using 4 mL of chloroform-methanol (2:1 *v/v*) and 1 mL of 0.9% NaCl. After phospholipid separation on Sep-Pack cartridges and methylation of total lipids, fatty acid methyl esters were separated by gas chromatography as previously described [45].

2.12. Statistical Analysis

Results are expressed as mean \pm SEM according to statistical distribution (assumption of normality assessed with the Shapiro-Wilk test). Survival curves were treated with a Log-rank Mantel-Cox test. The repeated measures were analyzed by Repeated-Measures ANOVA. Concerning non-repeated measures, quantitative variables were compared between groups by ANOVA or Kruskal-Wallis tests when assumptions required for the ANOVA were not met (normality and homoscedasticity analyzed with the Bartlett test). When appropriate (omnibus *p*-value < 0.05), a post-hoc test to take into account multiple comparisons was performed: Tukey-Kramer post ANOVA and Dunn after Kruskal-Wallis test. When only two groups were compared, a Mann-Whitney test was carried out. Statistical analyses were performed with the NCSS 2010 software (NCSS LLC, Kaysville, UT, USA).

3. Results

3.1. Glycemia and Insulinemia

All diabetic animals displayed hyperglycemia on or before the third day after the STZ injection (+234% compared to the CTRL rats, *p* < 0.001, Figure 1A). In parallel, insulinemia was reduced in all the STZ-injected rats (−55% compared to the CTRL animals, *p* < 0.05, Figure 1B). The glycemia was then kept at a high level in the diabetic groups, and the insulinemia remained low until the end of the protocol. For these two parameters, no fortification-related differences were observed for the diabetic animals.

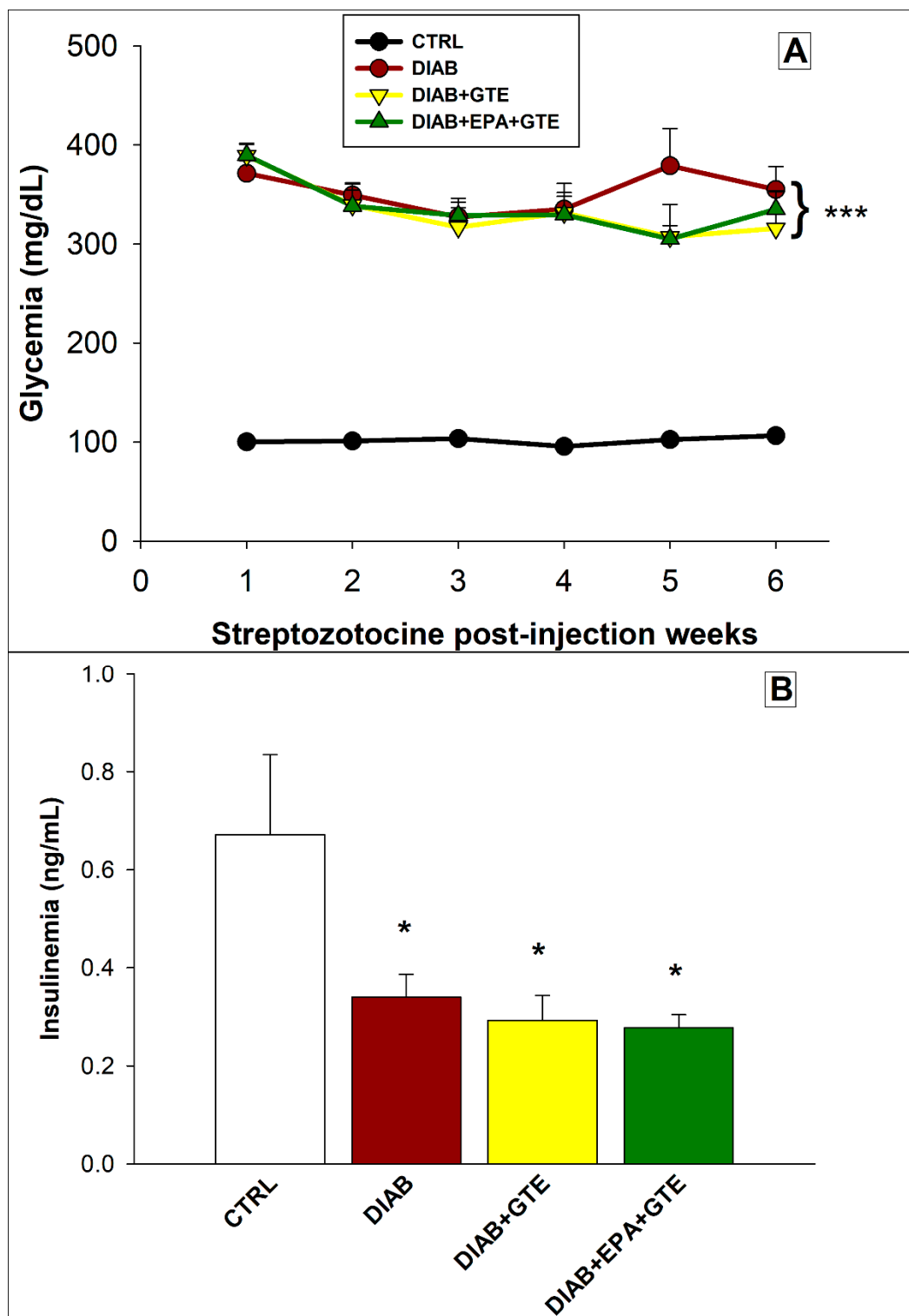


Figure 1. Glycemia and insulinemia. (A) Glycemia after the streptozotocin injection and (B) Insulinemia on the day of euthanasia. CTRL: Control group; DIAB: Diabetic rats; GTE: Green tea extract enrichment; and EPA: Eicosapentaenoic acid enrichment. *: Different to the CTRL group. One symbol: $p < 0.05$; two symbols: $p < 0.01$; and three symbols: $p < 0.001$.

3.2. Survival Rate

Diabetes induction affected the survival rate of the animals (Figure 2). No death occurred in the CTRL group. However, mortality occurred in all the animals which became diabetic. Statistical

analysis of the survival curves indicated that mortality increased greatly in the DIAB+EPA group (no survival at the completion of the protocol) compared to the CTRL group. Addition of GTE alone reduced death compared to the DIAB+EPA group. Furthermore, GTE enrichment greatly prevented the deleterious influence of EPA. However, GTE and GTE+EPA enrichments did not improve survival compared to the DIAB group. Since death occurred in all diabetic groups, the laboratory's animal wellbeing facility did not authorize the reiteration of the protocol. Taking into account misses due to heart perfusion, the sample sizes at the end of the experiment were eight, five, zero, seven, and five for the CTRL, DIAB, DIAB+EPA, DIAB+GTE, and DIAB+EPA+GTE groups, respectively.

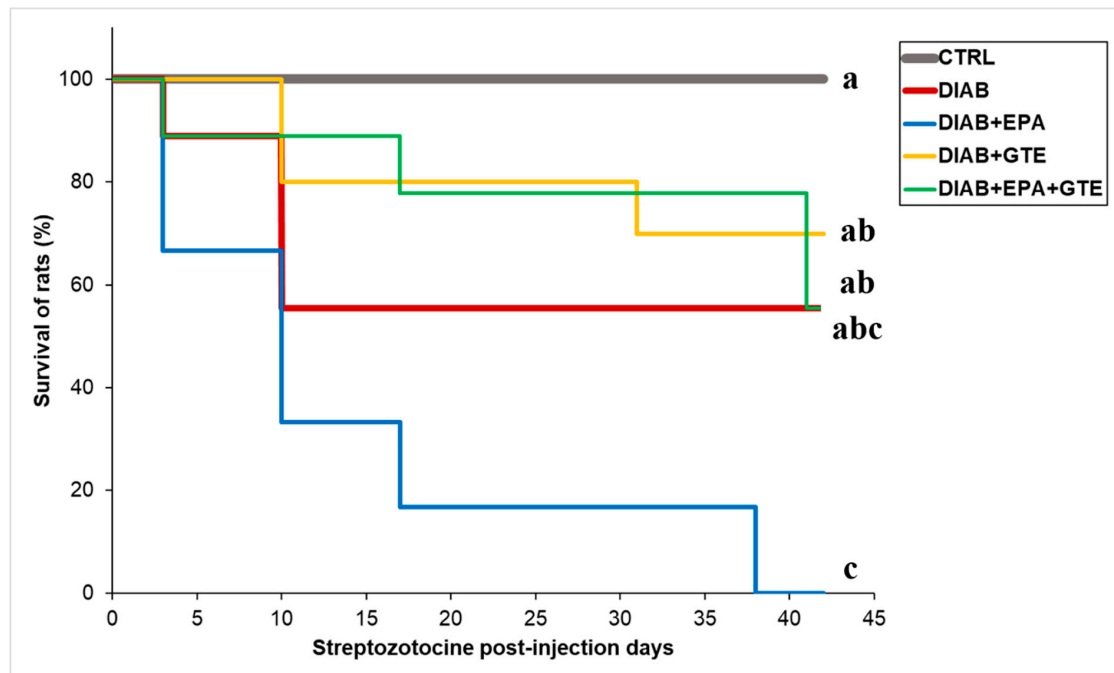


Figure 2. Survival rate of the animals. CTRL: Control group; DIAB: Diabetic rats; GTE: Green tea extract enrichment; and EPA: Eicosapentaenoic acid enrichment. a, b, c: means without a common letter on each line are significantly different, $p < 0.05$.

3.3. Fatty Acid Composition of Cardiac Phospholipids

The fatty acid composition of membrane phospholipids is presented in Table 3. Diabetes induction and the different fortifications did not modify the proportions of saturated, mono-unsaturated, and polyunsaturated fatty acids (SFAs, MUFAs, and PUFAs). However, they did alter the fatty acid profile of each lipid class. In general, diabetes induction increased all the SFAs except palmitic acid (C16:0) which decreased compared to the CTRL group (−29% in general, $p < 0.001$). Similarly, the majority of MUFAs increased, with the exception of C16:1 ω 7 and C18:1 ω 7 which decreased (−87% and −77% in general, $p < 0.01$ and $p < 0.001$). Diabetes mellitus also increased the ω 6/ ω 3 PUFA ratio, mainly by augmenting C18:2 ω 6 (+31%, $p < 0.05$) and reducing C22:6 ω 3 (−54%, $p < 0.001$). GTE enrichment did not modulate the impacts of diabetes. In contrast, EPA enrichment in the context of diabetes and GTE addition limited the proportions of long-chain ω 6 PUFAs C22:4 ω 6 and C22:4 ω 6 (−52% and −82%, $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively) in favor of membrane EPA (+3.9% in general, $p < 0.01$).

Table 3. Fatty acids composition of cardiac phospholipids.

Fatty Acid	CTRL	DIAB	DIAB+GTE	DIAB+EPA+GTE	p-Value
C12:0	0.44 ± 0.05	0.42 ± 0.02	0.34 ± 0.04	0.65 ± 0.17	NS
C14:0	0.32 ± 0.07 a	0.30 ± 0.08 a	0.30 ± 0.06 a	0.69 ± 0.15 b	<i>p</i> < 0.05
C15:0	0.23 ± 0.03 a	0.30 ± 0.04 ab	0.32 ± 0.01 ab	0.40 ± 0.04 b	<i>p</i> < 0.05
C16:0	13.6 ± 0.4 a	9.1 ± 0.6 b	10.0 ± 0.6 b	9.9 ± 0.5 b	<i>p</i> < 0.001
C17:0	0.30 ± 0.01 a	0.36 ± 0.02 b	0.39 ± 0.01 b	0.39 ± 0.01 b	<i>p</i> < 0.001
C18:0 DMA	0.31 ± 0.04 a	0.61 ± 0.10 b	0.67 ± 0.02 b	0.73 ± 0.11 b	<i>p</i> < 0.01
C18:0	19.0 ± 0.3 a	23.1 ± 0.2 b	23.2 ± 0.2 b	22.4 ± 0.3 b	<i>p</i> < 0.001
SFAs	34.2 ± 0.4	34.2 ± 0.7	34.4 ± 0.4	36.1 ± 0.6	NS
C15:1	0.08 ± 0.01 a	0.21 ± 0.03 b	0.24 ± 0.03 b	0.19 ± 0.05 b	<i>p</i> < 0.01
C16:1 ω7	0.54 ± 0.05 a	0.06 ± 0.02 b	0.08 ± 0.01 b	0.07 ± 0.01 b	<i>p</i> < 0.01
C17:1	0.24 ± 0.02	0.20 ± 0.04	0.21 ± 0.02	0.25 ± 0.03	NS
trans-C18:1	0.01 ± 0.01 a	0.18 ± 0.00 b	0.20 ± 0.01 b	0.19 ± 0.02 b	<i>p</i> < 0.01
C18:1 ω9	4.0 ± 0.2 a	6.5 ± 0.6 b	6.5 ± 0.5 b	7.2 ± 0.6 b	<i>p</i> < 0.01
C18:1 ω7	5.0 ± 0.2 a	1.1 ± 0.1 b	1.2 ± 0.0 b	1.2 ± 0.1 b	<i>p</i> < 0.001
C22:1 ω9	0.87 ± 0.02 a	0.81 ± 0.08 ab	0.86 ± 0.14 ab	0.68 ± 0.06 b	<i>p</i> < 0.05
MUFAs	10.8 ± 0.4	9.2 ± 0.5	9.4 ± 0.4	10.3 ± 0.5	NS
C18:2 ω6	23.5 ± 0.3 a	30.9 ± 2.9 b	30.1 ± 1.1 b	30.1 ± 2.3 b	<i>p</i> < 0.05
C20:2 ω6	0.04 ± 0.02	0.00 ± 0.00	0.03 ± 0.02	0.09 ± 0.06	NS
C20:3 ω6	0.20 ± 0.02 a	0.55 ± 0.01 b	0.50 ± 0.02 b	0.43 ± 0.02 c	<i>p</i> < 0.001
C20:4 ω6	18.2 ± 0.4 a	17.8 ± 1.7 ab	18.6 ± 1.0 ab	15.7 ± 1.1 b	<i>p</i> < 0.05
C22:4 ω6	0.66 ± 0.04 a	0.58 ± 0.04 a	0.58 ± 0.06 a	0.28 ± 0.02 b	<i>p</i> < 0.05
C22:5 ω6	0.77 ± 0.07 a	0.50 ± 0.12 ab	0.41 ± 0.09 bc	0.09 ± 0.02 c	<i>p</i> < 0.01
ω6PUFAs	43.6 ± 0.6 a	50.4 ± 1.6 b	47.8 ± 1.7 b	48.3 ± 0.6 b	<i>p</i> < 0.01
C20:5 ω3	0.01 ± 0.01 a	0.03 ± 0.02 a	0.05 ± 0.02 a	1.21 ± 0.12 b	<i>p</i> < 0.01
C22:5 ω3	1.19 ± 0.10 a	1.58 ± 0.26 ab	2.21 ± 0.41 b	3.72 ± 0.97 b	<i>p</i> < 0.05
C22:6 ω3	10.2 ± 0.57 a	4.7 ± 1.0 b	4.0 ± 0.2 b	3.3 ± 0.4 b	<i>p</i> < 0.001
ω3 PUFAs	11.4 ± 0.6 a	6.3 ± 1.2 b	6.2 ± 0.5 b	7.7 ± 0.2 ab	<i>p</i> < 0.01
PUFAs	55.0 ± 0.5	56.6 ± 0.7	55.5 ± 0.6	55.5 ± 0.4	NS
ω6/ω3 PUFAs	3.9 ± 0.3 a	9.8 ± 2.3 b	7.4 ± 1.1 b	5.5 ± 0.7 ab	<i>p</i> < 0.05

CTRL: Control group; DIAB: Diabetic rats; GTE: Green tea extract; and EPA: Eicosapentaenoic acid. SFAs: Saturated fatty acids; MUFAs: Mono-unsaturated fatty acids; and PUFAs: Polyunsaturated fatty acids. a, b, c: means without a common letter on a same line are significantly different.

3.4. Morphological Data and Food Intake

During the first three weeks of feeding, all the animals gradually increased their body mass (Figure 3A). This was particularly noticeable amongst rats fed with an HFD, whose fat masses increased markedly more than those of the CTRL rodents (+45% in general, *p* < 0.01, Figure 3B). Consequently, the part of lean mass was reduced in HFD-fed rats (−8%, *p* < 0.05, Figure 3C).

After the 21st day, weight gain was maintained in the CTRL group until the end of the study, unlike animals injected with STZ. This groups' body weight fell (−15% in general compared to day 21, *p* < 0.001), and their fat mass decreased (−32% in general compared to day 21, *p* < 0.001). Despite the body weight loss, the DIAB+EPA+GTE group's food intake increased following the STZ injection, eventually surpassing the intake of the CTRL group at the end of the experiment (+126%, *p* < 0.05).

3.5. Plasma Biochemical Parameters

Plasma sodium and chloride concentrations decreased in all diabetic animals (−6 and −9%, *p* < 0.01 and *p* < 0.001, Figure 4A). This was also true for creatinine concentration (−21%, *p* < 0.001, Figure 4B).

Diabetes altered the plasma lipid profile (Figure 4C). In general, the pathology increased plasma triglycerides, total cholesterol, LDL-cholesterol, and non-esterified fatty acid concentrations compared to the CTRL group (+1276, +63, +337, and +794%, *p* < 0.01, *p* < 0.05, *p* < 0.001, and *p* < 0.001, respectively). However, this was not verified for the GTE group which did not differ significantly from the CTRL group for plasma triglycerides and total cholesterol. As shown by a Mann-Whitney test, the GTE enrichment also reduced the plasma NEFA concentration compared to the DIAB group (−59%, *p* < 0.05).

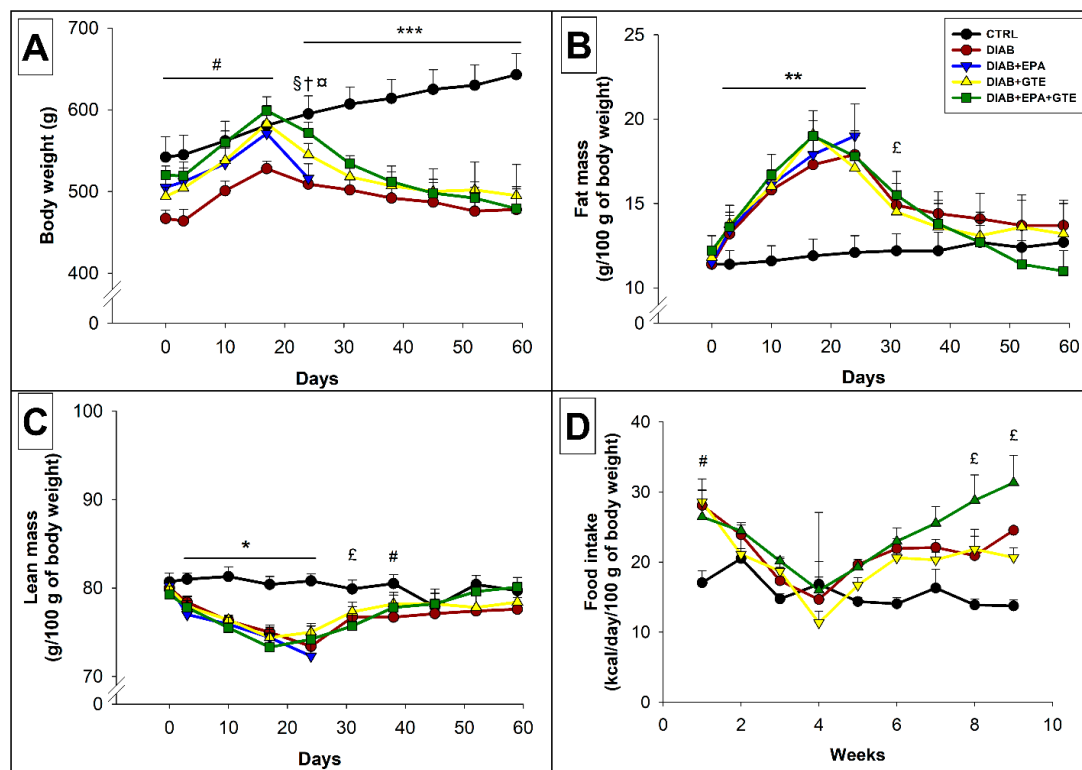


Figure 3. Morphological data and food intake. (A) Evolution of the body weight in the different groups; (B) Evolution of the fat mass in the different group; (C) Evolution of the lean mass in the different group; and (D) Rat food intake over the course of the study. CTRL: Control group; DIAB: Diabetic rats; GTE: Green tea extract enrichment; and EPA: Eicosapentaenoic acid enrichment. *: CTRL group different to the others groups; #: CTRL group different to the DIAB group; £: CTRL group different to the DIAB+EPA+GTE group; †: DIAB group different to the DIAB+GTE group; ‡: DIAB group different to the DIAB+EPA+GTE group; §: DIAB+GTE group different to the DIAB+EPA+GTE group. One symbol: $p < 0.05$; two symbols: $p < 0.01$; and three symbols: $p < 0.001$.

3.6. Cardiac Morphology and Mechanical Function

Diabetes increased cardiac weight (+23% in general against the CTRL group, $p < 0.001$), and the different enrichments had no impact (Table 4).

Myocardial collagen content did not show any significant changes following STZ injection. However, the combination of dietary EPA and GTE reduced this content compared to the DIAB animals (−24%, $p < 0.05$ by a Mann-Whitney test).

Regarding cardiac mechanical activity, diabetes did not lead to significant changes in coronary flow and developed pressure. However, when it was normalized to the coronary flow, the developed pressure was higher in the DIAB+GTE animals compared to the DIAB rats without food fortification (+61%, $p < 0.05$ by a Mann-Whitney test). The perfusion pressure was higher in the DIAB rodents than in those of the CTRL group (+68%, $p < 0.05$), whilst the perfusion pressures of the GTE and EPA+GTE groups were between those of the CTRL and DIAB groups.

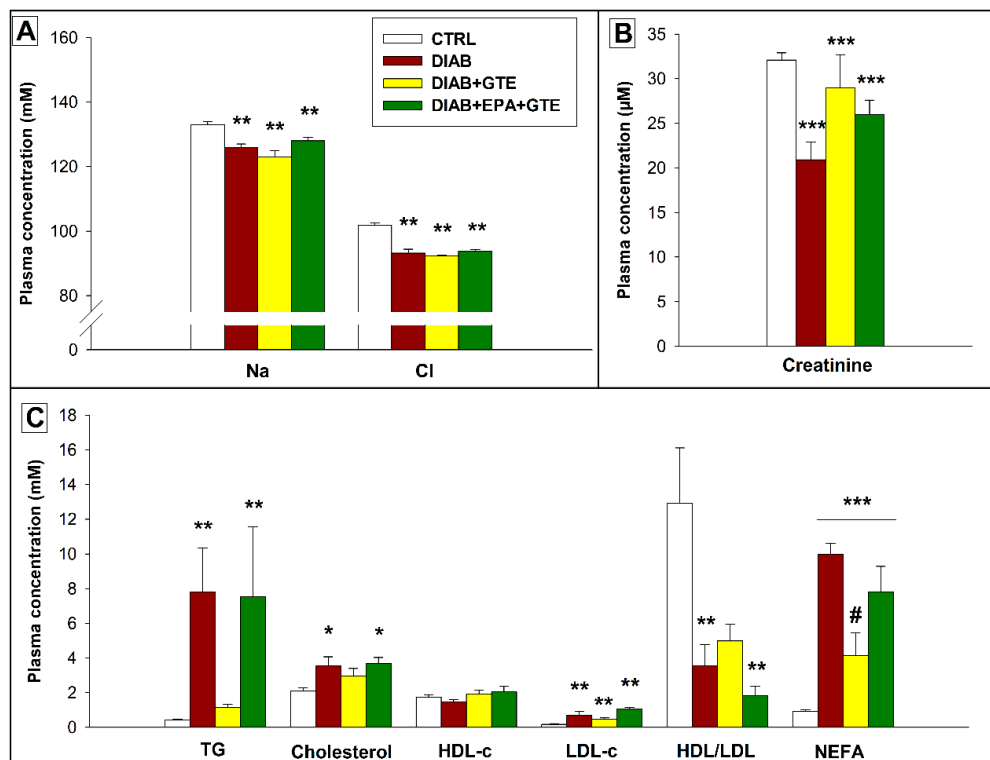


Figure 4. Plasma biochemical parameters. (A) Plasma ion diagram; (B) Plasma creatinine levels; and (C) Plasma lipid profiles. CTRL: Control group; DIAB: Diabetic rats; GTE: Green tea extract enrichment; and EPA: Eicosapentaenoic acid enrichment. Na: Sodium concentration; Cl: Chloride concentration; TG: Triglycerides; HDL-c: HDL-cholesterol; LDL-c: LDL-cholesterol; HDL/LDL: HDL-cholesterol to LDL-cholesterol ratio; and NEFA: Non-esterified fatty acids. * Different to the CTRL group. # Different to the DIAB group. One symbol (*): $p < 0.05$; two symbols (**): $p < 0.01$; and three symbols (***): $p < 0.001$.

Table 4. Cardiac morphological and functional parameters.

Cardiac Parameters	CTRL	DIAB	DIAB+GTE	DIAB+EPA+GTE
Heart mass (g/100 g of body weight)	0.26 ± 0.01	0.32 ± 0.01 ***	0.33 ± 0.01 ***	0.30 ± 0.01 ***
Collagen (µg/mg of proteins)	163 ± 5	170 ± 15	154 ± 24	129 ± 6 #
Coronary flow (mL/min/g of heart)	8.29 ± 0.38	9.40 ± 0.46	8.87 ± 0.76	9.38 ± 0.21
Developed pressure (mmHg)	66.7 ± 4.2	51.3 ± 10.3	73.0 ± 4.3	66.2 ± 10.1
Developed pressure/coronary flow (mmHg/mL/min/g of heart)	8.03 ± 0.34	5.76 ± 1.45	9.29 ± 1.17 #	7.03 ± 1.00
Heart rate (bpm)	368.0 ± 0.3	368.6 ± 0.2	368.6 ± 0.4	368.4 ± 0.2
RPP (bpm-mmHg)	24425 ± 1534	19021 ± 3795	26947 ± 1580	24377 ± 3721
dPdtmax (mmHg·s ⁻¹)	2458 ± 341	1532 ± 310	2067 ± 356	1988 ± 322
dPdtmin (mmHg·s ⁻¹)	-1497 ± 119	-1277 ± 280	-1749 ± 98	-1565 ± 201
Perfusion pressure (mmHg)	50.4 ± 6.0	84.8 ± 11.1 *	70.4 ± 5.7	67.04 ± 10.8

CTRL: Control group; DIAB: Diabetic rats; GTE: Green tea extract enrichment; and EPA: Eicosapentaenoic acid enrichment. *: Different to the CTRL group; #: Different to the DIAB group. One symbol (* or #): $p < 0.05$; two symbols (**): $p < 0.01$; and three symbols (***): $p < 0.001$.

3.7. Coronary Reactivity

The highest EDD (Figure 5A) was observed in the CTRL group. It was strongly decreased by diabetes (−55% in general at the highest injected Ach dose, $p < 0.001$). Interestingly, GTE enrichment

associated with EPA fortification increased EDD compared to the diabetic group without enrichment (+167% when the injected Ach dose was 40 pmoles, $p < 0.001$). The diabetes-induced decrease in EDD was mainly due to a decrease in ECVA (Figure 5B) which was close to zero in all of the diabetic groups, but also to a reduction of EID (−35% in general at the highest injected SN dose, $p < 0.05$, Figure 5C). The improved EDD in the DIAB+EPA+GTE group was related to an improved EID (+54% compared to the DIAB group when 500 pmoles of SN was injected, $p < 0.05$), but also to an enhancement of ECVA (+302% compared to the DIAB+GTE group when the injected Ach dose was 40 pmoles, $p < 0.05$). Conversely, GTE enrichment alone did not induce a significant improvement of EDD compared to the non-fortified animals.

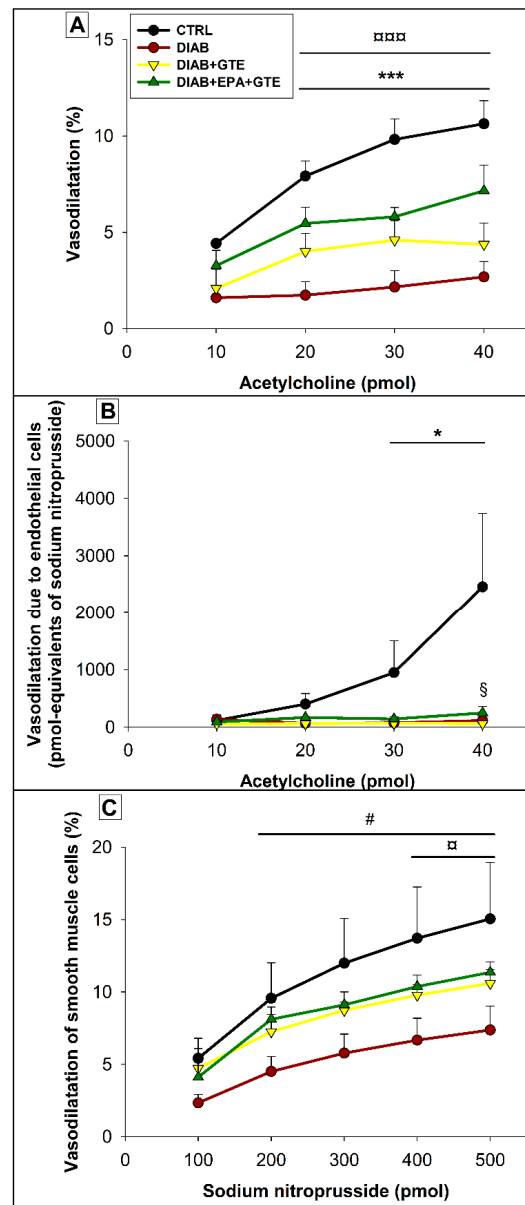


Figure 5. Coronary reactivity. (A) Endothelial-dependent vasodilatation due to the combined activities of endothelial and smooth muscle; (B) Endothelial cell vasodilation capacities; and (C) Endothelial-independent vasodilatation due the smooth muscle cells. CTRL: Control group; DIAB: Diabetic rats; GTE: Green tea extract enrichment; and EPA: Eicosapentaenoic acid enrichment. * CTRL group different to the others groups; #: CTRL group different to the DIAB group; □: DIAB group different to the DIAB+EPA+GTE group; and §: DIAB+GTE group different to the DIAB+EPA+GTE group. One symbol: $p < 0.05$; two symbols: $p < 0.01$; and three symbols: $p < 0.001$.

3.8. Inflammation of Myocardial Tissue

Myocardial inflammation was first investigated by examining the activation of the NF- κ B pathway. I κ B α is known to inhibit activation of the NF- κ B pathway, and the DIAB group displayed lower levels of this protein than the CTRL group (-56% , $p < 0.001$, Figure 6B). In contrast, GTE and EPA+GTE enrichments restored I κ B α to levels close to that of the CTRL group. Despite the observed modifications of I κ B α , diabetes induction and dietary fortifications did not change mRNA expression of the pro-inflammatory interleukins targeted in the study (IL-1 β , 6, and 10, Figure 6A).

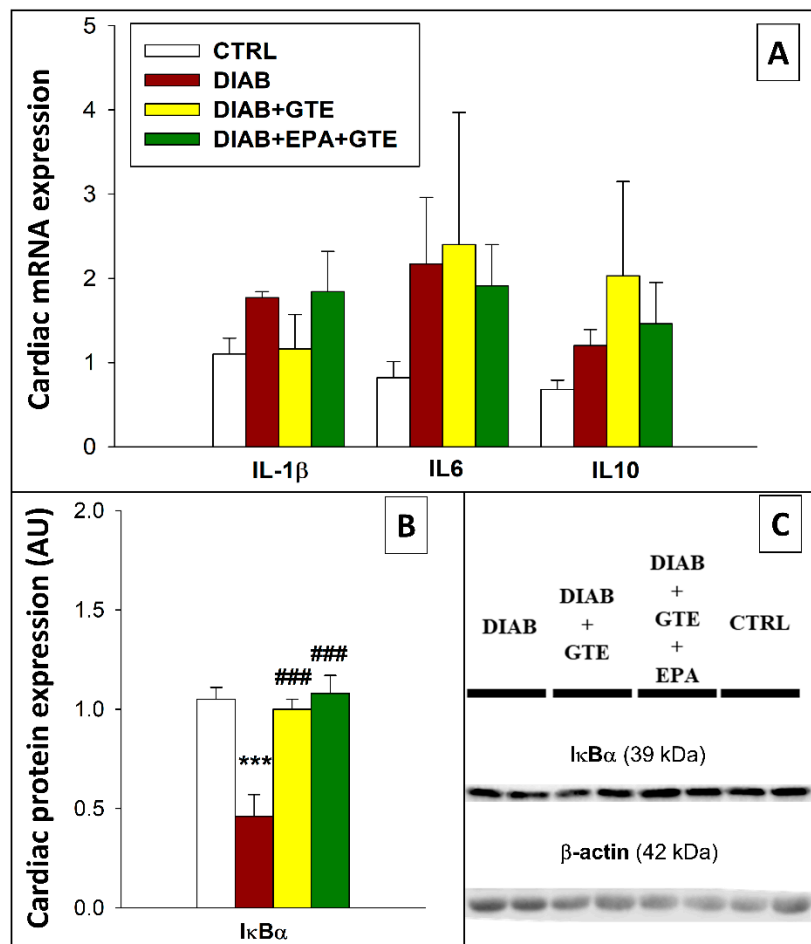


Figure 6. Inflammation parameters. (A) Inflammation-related mRNA expression; (B) Inflammation-related protein expression; and (C) Representative immunoblots. CTRL: Control group; DIAB: Diabetic rats; GTE: Green tea extract enrichment; and EPA: Eicosapentaenoic acid enrichment. *: Different to the CTRL group; #: Different to the DIAB group. One symbol: $p < 0.05$; two symbols: $p < 0.01$; and three symbols: $p < 0.001$.

3.9. Cardiac Oxidative Stress

Diabetes induction altered neither the gene expressions of catalase mRNA level, a cytosolic H₂O₂ scavenger, nor SOD2, a mitochondrial superoxide detoxifier (Figure 7). In contrast, when both EPA and GTE were added to the diet, increased catalase mRNA expression was found compared to the situations with or without GTE fortification ($+107\%$ and $+96\%$, $p < 0.001$). Diabetic rats fortified with GTE displayed reduced SOD2 mRNA expression compared to healthy animals with the normolipidic diet (-52% , $p < 0.05$). However, the rodents fed EPA associated with GTE ceased presenting this difference.

	CTRL	DIAB	DIAB+GTE	DIAB+EPA+GTE	MW	Immunoblots																
Cardiac mRNA:																						
Catalase	1.14 ± 0.12	1.28 ± 0.05	1.36 ± 0.15 \$\$\$	2.66 ± 0.38 ###		DIAB DIAB + GTE DIAB + GTE + EPA CTRL																
SOD2	1.11 ± 0.16	0.80 ± 0.09	0.53 ± 0.10 *	1.15 ± 0.24																		
Cardiac proteins:																						
GPX1	0.84 ± 0.05	0.92 ± 0.17	0.83 ± 0.08	0.86 ± 0.06	22 kDa																	
NOX1	2.4 ± 0.4	2.7 ± 0.4	1.2 ± 0.2 #	2.3 ± 0.3	65 kDa																	
SOD1	1.4 ± 0.2	1.4 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.7 ± 0.1	18 kDa																	
SOD2	1.1 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.3 ± 0.2	1.5 ± 0.2	22 kDa																	
Ac-SOD2	0.66 ± 0.06	0.95 ± 0.09 ***	0.89 ± 0.04 \$\$\$	1.39 ± 0.08 ###	24 kDa																	
Ac-SOD2/SOD2	0.61 ± 0.04	0.74 ± 0.02	0.80 ± 0.07 *	0.82 ± 0.07 *																		
Sirt1	1.8 ± 0.4	1.0 ± 0.3	1.3 ± 0.2	2.0 ± 0.5	120 kDa																	
Mitochondrial proteins:																						
Protein carbonylation	0.67 ± 0.08	1.53 ± 0.19 **	1.45 ± 0.19 **	1.64 ± 0.31 **		<table border="0"> <tr> <td>+</td><td>-</td><td>+</td><td>-</td><td>+</td><td>-</td><td>+</td><td>-</td> </tr> <tr> <td colspan="8"></td> </tr> </table>	+	-	+	-	+	-	+	-								
+	-	+	-	+	-	+	-															
Protein nitrosylation	0.75 ± 0.03	0.51 ± 0.09 *	1.02 ± 0.15 #	0.94 ± 0.12 #																		
GPX1	1.5 ± 0.1	0.9 ± 0.2	1.4 ± 0.2	1.2 ± 0.1	22 kDa																	
SOD1	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.2	1.5 ± 0.2	18 kDa																	
Sirt3	1.3 ± 0.2	1.2 ± 0.2	1.6 ± 0.4	1.8 ± 0.4	28 kDa																	
UCP3	0.7 ± 0.1	0.9 ± 0.3	1.2 ± 0.3	1.4 ± 0.3	34 kDa																	
Mitochondrial housekeeping protein: VDAC						32 kDa																
Cardiac housekeeping protein: β-actin						42 kDa																

Figure 7. Oxidative stress parameters. CTRL: Control group; DIAB: Diabetic rats; GTE: Green tea extract enrichment; EPA: Eicosapentaenoic acid enrichment; +: Sample processed to detect protein carbonylation; -: Negative control of protein carbonylation; and MW: Molecular weight. *: Different to the CTRL group; #: Different to the DIAB group; §: DIAB+GTE group different to the DIAB+EPA+GTE group. One symbol: $p < 0.05$; two symbols: $p < 0.01$; and three symbols: $p < 0.001$.

In the mitochondria, protein carbonylation was increased in all the diabetic groups (+130% in general compared to the CTRL group, $p < 0.01$, Figure 7). Protein nitrosylation was reduced by diabetes induction (-32% , $p < 0.05$), but restored with GTE and EPA+GTE enrichments. SOD1 and GPX1 expressions were unaffected by the different manipulations. Similarly, UCP3 and SIRT3 expressions were unchanged.

In the whole myocardium (Figure 7), NOX1 expression was unchanged by diabetes except in the GTE-enriched group where it was reduced (-56% , $p < 0.05$). No variations of SOD1 and SOD2 levels were found but diabetes led to a rise of SOD2 acetylation in DIAB and DIAB+GTE groups ($+44\%$ and $+35\%$, respectively, $p < 0.001$). The acetylation was even higher in the DIAB+EPA+GTE group compared to the other two diabetic groups ($+46\%$ and $+56\%$, $p < 0.001$). The SOD2 hyperacetylation led to an increased Ac-SOD2/total SOD2 ratio in the DIAB+GTE and DIAB+EPA+GTE groups compared to the CTRL one ($+31\%$ and $+34\%$, respectively, $p < 0.05$). In the DIAB group without fortification, the

ratio was not significantly increased. No difference was observed in the levels of myocardial GPX1 and SIRT1 proteins.

3.10. Energy Metabolism and Mitochondrial Pathways-Related Factors

Lysine acetylation of cardiac and mitochondrial proteins reflects the β -oxidation intensity. It was higher in the diabetic rats, particularly when their diet was enriched with GTE (+197% and +337% for the DIAB+GTE and DIAB+EPA+GTE groups, $p < 0.05$, Figure 8B,C). This occurred while CPT1 expression was unchanged.

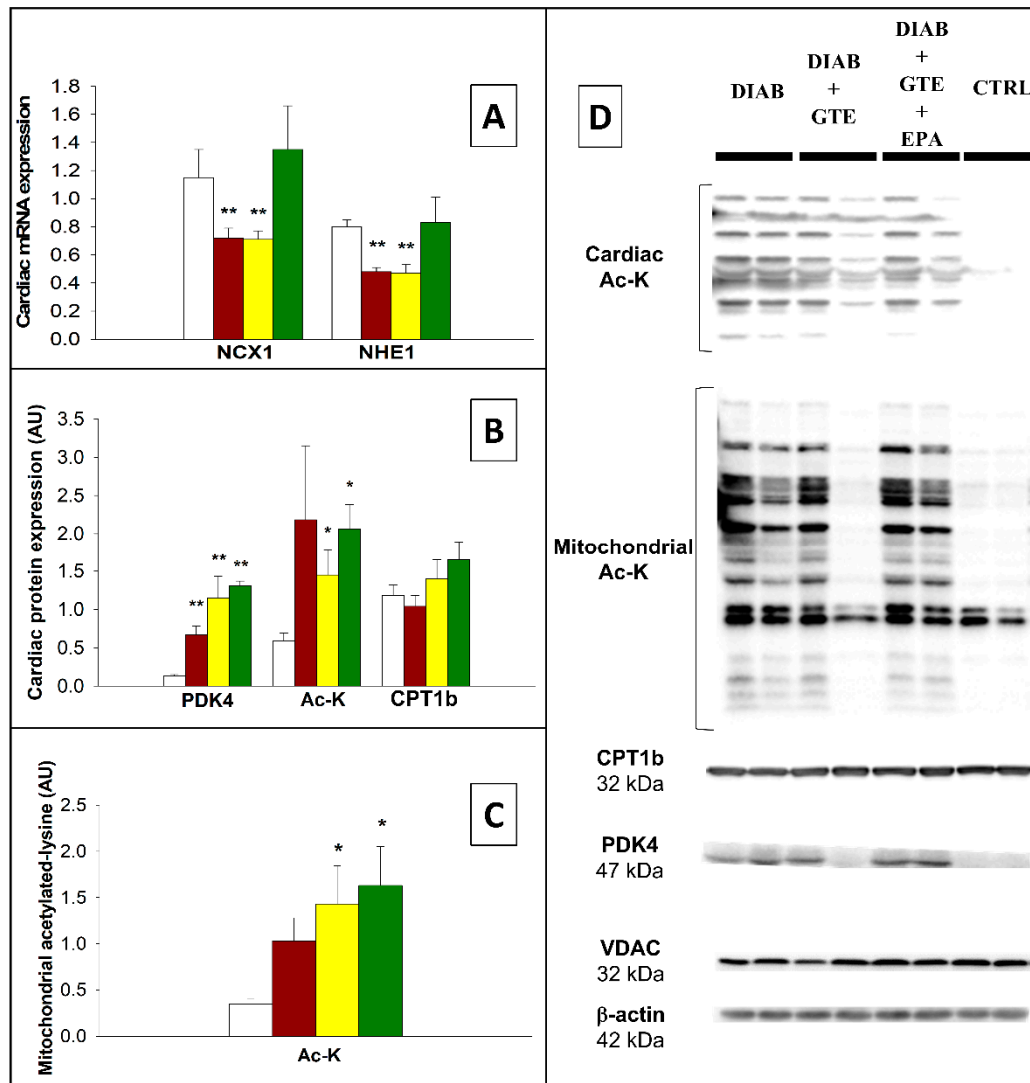


Figure 8. Factors related to the energy metabolism. (A) NCX1 and NHE1 mRNA expression; (B) Energy metabolism-related myocardial proteins; (C) Mitochondrial acetylated-lysine levels; and (D) Representative immunoblots. CTRL: Control group; DIAB: Diabetic rats; GTE: Green tea extract enrichment; and EPA: Eicosapentaenoic acid enrichment. *: Different to the CTRL group. One symbol: $p < 0.05$; two symbols: $p < 0.01$; and three symbols: $p < 0.001$.

Concerning glucose oxidation, the expression of the PDK4 protein, known to inhibit pyruvate conversion to acetylCoA, was increased by diabetes induction (+415% in general, $p < 0.01$, Figure 8B).

Finally, NCX1 and NHE1 connect metabolic acidosis with intracellular calcium, cardiac mechanical activity, and cellular death. Their gene expressions were decreased in the DIAB and DIAB+GTE

groups (−38% and −31% in general, $p < 0.01$), but restored close to the CTRL value by the EPA+GTE enrichment (Figure 8A).

4. Discussion

This study set out (i) to determine the impact of diabetes induced by the association of STZ injection with a HFD on cardiac function; (ii) to evaluate the effects of enrichments with EPA, GTE, and a combination of both on the consequences observed in this model; and (iii) to examine the mechanisms involved.

4.1. Experimental Model

A high dose or several low doses of STZ leads to type I diabetes [46]. In this study, we chose a single low-dose of STZ combined with a HFD to try to trigger type II diabetes (T2D). Several studies have shown that STZ-induced diabetes in combination with a HFD induces either insulin resistance or T2D (early or even late T2D) [47]. However, diabetes characterization was not always performed [48]. In all cases, the treatment always triggered diabetes mellitus. In our study, the glycemia and insulinemia after STZ injection confirmed diabetes induction, but we do not know if it is late T2D or a type I form, in view of the insulin deficiency. Indeed, we were unable to determine the homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA) index, since animal weakness did not allow starvation for several hours.

4.2. Animal Morphology and Survival Rate during Diabetes

HFD was provided to create an overweight condition with fat mass accumulation before the STZ injection [49,50]. Our data indicate that the HFD-induced body weight gain was mainly due to fat mass accumulation during this period. However, after diabetes induction the animals displayed a loss of fat mass compared to healthy animals. This decrease was particularly severe in the DIAB+EPA+GTE group. This is surprising since the animals of this group consumed the highest quantity of calories over the post-injection period. Energy wasting probably occurred in this group. Moreover, the lean mass was also decreased. The variation ranged from -5.4 ± 3.9 in the DIAB group to $-9.0 \pm 4.4\%$ in the DIAB+EPA+GTE one. Diabetic hyperglycemia with insulin deficiency is known to promote hyperosmolarity leading to plasmolysis and therefore tissue dehydration. The phenomenon is characterized by hypochloremia and hyponatremia in the case of diabetic acidosis [51]. Low levels of plasma sodium and chloride ions were observed in our study indicating that dehydration contributed to the loss of lean mass. Furthermore, this was also associated with a decreased plasma creatinine concentration which suggests muscle atrophy and sarcopenia.

The morphological data also highlight the deleterious effect of EPA during diabetes mellitus. Indeed, the DIAB+EPA rats displayed a radical increase in mortality, occurring a few days after the STZ injection, and accompanied with a severe drop in body weight (see Figure 3A). Dehydration can partly explain this loss, since these animals showed a clear decrease in skin elasticity. In 2015, Li et al. published a meta-analysis outlining the deleterious impact of $\omega 3$ PUFAs on the treatment of diabetes in caucasian patients [52]. The authors explained the phenomenon by the need to associate antioxidants with omega 3 PUFAs for the treatment of pathologies associated with high oxidative stress [53,54]. EPA is known to be highly susceptible to lipid peroxidation [55]. Our study reaches the same conclusion by showing the protective effect of GTE as an antioxidant in association with EPA. The simple combination of EPA with GTE did indeed allow the drop in body weight to be partially prevented, and thus improve the survival rate.

4.3. Cardiac Effects of the Various Interventions

Physiological Effects

The diabetes mellitus induced in the present study triggered cardiac hypertrophy irrespective of dietary fortifications. Diabetes in general, and especially type II diabetes, causes hypertension

in humans, and this has also been proven in rats [56,57]. Hypertension in turn leads to cardiac hypertrophy [58–60].

In our study, cardiac mechanical activity was assessed *ex vivo* by using a model of isolated heart perfused at constant coronary flow. By providing similar amounts of oxygen and substrates to the cells, this model allows the estimation of cardiomyocyte health. No significant differences were noticed except a GTE-related activation of cardiomyocytes in comparison with the diabetic situation without fortification. This can reflect an increased intracellular calcium concentration. Perfusion at constant flow does not reflect the *in vivo* situation in which the coronary flow is fixed according to the preload pressure. This is the reason why we determined the coronary reactivity, which was greatly decreased by diabetes, slightly improved by GTE and significantly enhanced by the combination of EPA and GTE. Increased coronary reactivity supports increased vascular irrigation when the heart is perfused at constant pressure. This suggests that the *in vivo* hearts of the DIAB+EPA+GTE rats were better perfused than both those of the DIAB rodents and those of the DIAB+GTE rats receiving intermediary quantities of blood. Since the heart acts as an engine, increasing perfusion improves contraction. Indeed, in a previous *ex vivo* study we noticed that doubling the coronary flow doubled the developed pressure. *In vivo*, contractile strength should be the highest in the DIAB+EPA+GTE group and the lowest in the DIAB one. These results fit well with the rate of fibrosis estimated as myocardial collagen. Indeed, cellular death and fibrosis levels were lowest in the DIAB+EPA+GTE group and highest in the DIAB group. Their levels were moderate in the DIAB+GTE group, but the developed pressure was activated: Calcium spikes were probably increased, but not enough to induce a high rate of cellular death. Our results indicate that cardiac health can be sequenced as follows: CTRL > DIAB+EPA+GTE > DIAB+GTE > DIAB. Oxidative stress, membrane lipid composition and metabolism were evaluated in order to understand the mechanisms of the observed effects on the heart.

4.4. Oxidative Stress

Oxidative stress plays a fundamental role in diabetes. In our study, the pathology led to high levels of mitochondrial protein carbonylation as described in the literature [61,62]. This was due to the high rate of SOD2 acetylation, which meant that superoxide anions were not detoxified to H₂O₂, and thus caused huge molecular damages to the mitochondria. Nitrosylation of mitochondrial proteins was reduced in the DIAB group compared to the CTRL one and restored above control in the two fortified groups. This reaction results from the interaction of nitric oxide (NO) and superoxide anions, which leads to the formation of peroxynitrites which react with tyrosine residues of cellular proteins. Our results show that NO formation was probably low in the high oxidative context of the DIAB group. In diabetes, NO synthase is uncoupled due to the decrease in the redox potential. This increases superoxide anion formation at the expense of NO [63,64]. In contrast, NO synthesis was probably high in the two fortified groups. This suggests lower oxidative stress. The similar rates of protein carbonylation in the three hyperglycemic groups might have resulted from a saturation of the sites susceptible to carbonylation. The information concerning the oxidative stress [(DIAB > (DIAB+GTE ≈ DIAB+EPA+GTE) > CTRL] and NO synthase activity [(DIAB+GTE ≈ DIAB+EPA+GTE) > DIAB] are confirmed by the inflammation status. During diabetes, the oxidative stress promotes inflammation by activating the NF-κB pathway through IκBα release and degradation. IκBα was decreased in the DIAB group while the intake of GTE, with or without EPA, prevented this decrease and therefore limited inflammation.

Changes in oxidative stress and NO availability can play a fundamental role in coronary reactivity, which depends on two types of vascular cells: Endothelial and smooth muscle cells. Endothelial cells release vasoactive agents (NO, prostacyclin, and thromboxane) which regulate the tonus of smooth muscle cells. In this work, as evidenced by the changes in EID and EDD, both types of vascular cells were damaged. An oxidative stress-related decrease in NO availability in the three diabetic groups perfectly explains the reduced ECVA compared to that of the CTRL group. A lower NADPH oxidase 1 myocardial expression was shown with GTE enrichment. NOX1 is expressed in endothelial,

smooth muscle, and adventitial cells of the vasculature. It promotes endothelial dysfunction and hypertrophy of smooth muscle cells [65] through release of superoxide anions. Its activity is stimulated in cases of hyperglycemia and hyperlipidemia [66]. The lipid-lowering effect of GTE has already been described [67,68], and it was confirmed in our study in the diabetic situation. As a consequence, NOX1 protein expression reduced, thus protecting both vascular cells and coronary reactivity. Moreover, we noticed a slight improvement of ECVA with EPA+GTE compared to those of the other two diabetic groups. Other vasoactive agents such as prostaglandins and leukotrienes may be responsible for the improved ECVA.

4.5. Fatty Acid Composition of Cardiac Phospholipids

Diabetes promoted the accumulation of long-chain SFAs and C18:2 n-6 while reducing the proportion of docosahexaenoic acid (DHA or C22:6 ω 3) and increasing the ω 6/ ω 3 ratio.

The influence of HFDs on cardiac function in non-diabetic subjects has been extensively studied by our group and other investigators. We observed an increased proportion of arachidonic acid in cardiac phospholipids at the expense of C18:2 ω 6 [49]. This suggests increased release of cyclooxygenase and lipoxygenase products. The changes in membrane lipid composition were associated with improved coronary reactivity, cardiac mechanical function, and mitochondrial energy metabolism [69], as well as reduced myocardial oxidative stress [54]. We confirmed the influence of abdominal obesity on the function of human atrial mitochondria (publication in process). In the present study, we associated STZ-induced hyperglycemia with HFDs and found opposite results. Indeed, the conversion from C18:2 ω 6 to C20:4 ω 6 decreased, suggesting reduced prostaglandin and leukotriene synthesis. This was associated with a deteriorated coronary reactivity. The reduced fluxes maybe a reaction of the heart to an excessive production of harmful vasoconstrictors synthesized from PUFAs in diabetic situations (e.g., thromboxane A2). Excess cellular calcium and/or oxidative stress may have shifted eicosanoid synthesis from vasodilators towards vasoconstrictors.

In contrast, dietary EPA reduced the proportion of long-chain ω 6 PUFAs (C22:4 ω 6 and C22:5 ω 6) and increased that of EPA. This is known to be beneficial for the heart [26,70]. Variations in LC-PUFAs of membrane phospholipids may impact cardiac vascular reactivity due to the vasoactive properties of the metabolites formed from ω 3 and ω 6 fatty acids [71,72]. An improved vascular reactivity due to ω 3 PUFAs has been observed in type II diabetes [73]. This is consistent with our results since we observed an improved EDD in the DIAB+EPA+GTE group compared to the DIAB group.

4.6. Energy Metabolism

In addition to its lipid-lowering properties, green tea also protects against lipid peroxidation [74], thus promoting the β -oxidation of fatty acids and providing the optimal substrate for mitochondria in this diabetes model. This avoids energy deficiency and the onset of heart failure. The rate of acetylated-lysine protein in myocardial tissue and mitochondria noticed in our study corresponded with a higher rate of β -oxidation in the GTE-enriched groups and with the results of other investigators [75]. This may be due to green tea EGCG, which is known to improve lipid transport and fatty acid β -oxidation in obesity and type II diabetes [76]. Alongside this, an increased protein expression of PDK4, an inhibitor of the pyruvate dehydrogenase, was observed in all diabetic animals. This increase indicates an inhibition of glucose oxidation. The shift from glucose oxidation toward fatty acid degradation is typical of myocardial insulin resistance and suggests that our STZ-treated and HFD-fed rodents had reached late T2D. In the longer term, this could harm cardiac health, as favoring lipid degradation at the expense of glucose oxidation is detrimental [77,78].

Some of our experimental groups did not display complete β -oxidation because diabetes mellitus provokes ketoacidosis. This results in cellular acidosis, which can be reinforced by excess anaerobic glycolysis, since pyruvate oxidation was partially blocked by diabetes. We measured NHE1 and NCX1 gene expressions in the present study. In physiological conditions, NCX1 contributes to calcium washout from the cardiomyocytes. However, cellular acidosis couples NCX1 activity to that of NHE1,

and proton exclusion favors increased cellular calcium, activation of the contractile machinery, and apoptosis in paroxysmal situations [79]. NHE1 and NCX1 gene expressions decreased in the DIAB and DIAB+GTE groups, suggesting that the cardiac cells prevented excessive activation of this axis because of acidosis. Inhibition of NHE1 has a cardio-protective effect by limiting NCX1-related calcium overload [80]. It has been shown that green tea epicatechin inhibits NHE1 in erythrocytes [81]. This probably limited excess intracellular calcium in the DIAB+GTE rats compared to the DIAB rodents. Cardiac pressure thus increased since calcium concentration remained high, but not high enough to induce cellular death. Moreover, as suggested by the NHE1 and NCX1 gene expressions, acidosis was not observed in the EPA+GTE-fortified rodents. Alongside this, coronary reactivity was quasi-normal and fibrosis was low. This suggests that calcium did not accumulate in cardiac cells in spite of the high degree of mitochondrial oxidative stress.

5. Conclusions

The combination of HFDs with STZ-induced diabetes in rodents triggered diabetes mellitus, probably corresponding to late T2D. This slightly decreased the survival rate of the animals. Most importantly, addition of EPA to the diet drastically increased the rate of mortality due to dehydration and catabolism. However, this phenomenon was counterbalanced by dietary GTE, probably because of its antioxidant properties. The rate of mortality was not correlated with cardiac function, since large variations in myocardial activities were noticed although no significant changes in survival rates were observed between the DIAB, DIAB+GTE and DIAB+EPA+GTE groups. Diabetes-induced deteriorations in cardiac function were related to the oxidative stress and modulation of cellular acidosis associated with changes in cellular calcium handling. Dietary GTE fortification improved cardiac function through two mechanisms: Improved NO production and probable epicatechin-related inhibition of NHE1. Further addition of EPA in the diet mainly suppressed acidosis and established a favorable PUFA profile in cardiac phospholipids. Finally, the exact mechanism by which EPA increases the mortality rate in the diabetic situation requires further examination.

Author Contributions: T.L., B.H., K.A., C.J., J.-P.R., D.B., V.S. and L.D. contributed to the technical part of the study. F.J. performed analyses of the diets. B.P., T.L. and L.D. performed the statistical analyses. T.L., K.A. and L.D. contributed to the study conception and design, analysis and interpretation of data. T.L. wrote the manuscript. L.D. reread and revised it, and gave approval to the final version for publication.

Funding: This work was supported by the French Federation of Cardiology (FFC) and The Surgical Association for the Development and Enhancement of the Techniques of Screening and Treatment of Cardiovascular Diseases (ADETEC).

Acknowledgments: The authors warmly thank the staff of the Experimental Unit of Animal Nutrition of the National Institute of Agronomical Research of Theix/Saint-Genès-Champanelle for animal care. They also wish to thank Thomas Hastings for English editing.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article. The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the National Institute of Agronomical Research, French Federation of Cardiology and society ADETEC.

Abbreviations

Ach: Acetylcholine; Ac-K: Acetylated lysine; ADETEC: Surgical association for the development and enhancement of the techniques of screening and treatment of cardiovascular diseases; ANOVA: Analysis of variance; ARRIVE: Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments; CaCl₂: Calcium chloride; cDNAs: Complementary desoxyribonucleic acid; CoA: Coenzyme A; CPT1b: Carnitine palmitoyltransferase 1B; CTRL: Control; DIAB: Diabetes; dP/dt max: Maximal rate of rise in the left ventricular developed pressure; dP/dt min: Maximal rate of decrease in the left ventricular developed pressure; ECVA: Endothelial cell vasodilatation activity; EDD: Endothelial-dependent dilatation; EGCG: Epigallocatechine gallate; EGTA: Ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid; EID: Endothelial-independent dilatation; EPA: Eicosapentaenoic acid; FFC: French federation of cardiology; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GPX1: Glutathione peroxidase 1; GTE: Green tea extract; HBA1c: Glycated hemoglobin; HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethane sulfonic acid; HFD: High fat diet; HOMA: Homeostatic model assessment of insulin resistance; HPRT1: Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; HRP: Horse radish peroxidase; HSE: Hugo Sachs Elektronik; H₂O₂: Hydrogen peroxide; IDF: International Diabetes Federation; IκBα: Nuclear factor of kappa light polypeptide

gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha; IL-1 β : Interleukin-1 β ; IL-6: Interleukin-6; IL-10: Interleukin-10; KCl: Potassium chloride; KH₂PO₄: Potassium dihydrogen phosphate; LC-PUFAs: Long-chain polyunsaturated fatty acids; LDL: Low-density lipoprotein; MgSO₄: Magnesium sulfate; MOPS: 3-morpholino-1-propanesulfonic acid; MRI: Magnetic resonance imaging; mRNA: Messenger ribonucleic acid; MUFAs: Monounsaturated fatty acids; NaCl: Sodium chloride; NADPH: Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NaHCO₃: Sodium bicarbonate; NCSS: Number Cruncher Statistical Software; NCX1: Sodium-calcium exchanger 1; NEFA: Non esterified fatty acid; NF- κ B: Nuclear factor kappa-B; NHE1: Sodium-proton exchanger 1; NO: Nitric oxide; NOX1: NADPH oxidase 1; p: Probability; PCR: Polymerase chain reaction; PDK4: Pyruvate dehydrogenase kinase 4; PVDF: Polyvinylidene fluoride; PUFA: Polyunsaturated fatty acid; qRT-PCR: Quantitative real time polymerase chain reaction; RNA: Ribonucleic acid; RPLP0: 60S acidic ribosomal protein P0; SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis; SEM: Standard error of the mean; SFAs: Saturated fatty acids; SIRT-3: Sirtuin-3; SN: Sodium nitroprusside; SOD: Superoxide dismutase; STZ: Streptozotocin; T2D: Type 2 diabetes; UCP3: Uncoupling protein 3; and VDAC: Voltage-dependent anion-selective channel.

References

1. IDF Diabetes Atlas—2017 Atlas. Available online: <https://diabetesatlas.org/resources/2017-atlas.html> (accessed on 24 August 2019).
2. Thomas, C.C.; Philipson, L.H. Update on diabetes classification. *Med. Clin. N. Am.* **2015**, *99*, 1–16. [[CrossRef](#)]
3. Nathan, D.M. The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Study at 30 Years: Overview. *Diabetes Care* **2014**, *37*, 9–16. [[CrossRef](#)]
4. King, P.; Peacock, I.; Donnelly, R. The UK Prospective Diabetes Study (UKPDS): Clinical and therapeutic implications for type 2 diabetes. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1999**, *48*, 643–648. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Jia, G.; Whaley-Connell, A.; Sowers, J.R. Diabetic cardiomyopathy: A hyperglycaemia- and insulin-resistance-induced heart disease. *Diabetologia* **2018**, *61*, 21–28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Diabetes Control and Complications Trial Research Group; Nathan, D.M.; Genuth, S.; Lachin, J.; Cleary, P.; Crofford, O.; Davis, M.; Rand, L.; Siebert, C. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* **1993**, *329*, 977–986. [[PubMed](#)]
7. Jia, G.; DeMarco, V.G.; Sowers, J.R. Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2016**, *12*, 144–153. [[CrossRef](#)]
8. Adeghate, E.; Singh, J. Structural changes in the myocardium during diabetes-induced cardiomyopathy. *Heart Fail. Rev.* **2014**, *19*, 15–23. [[CrossRef](#)]
9. Aragno, M.; Mastrocola, R.; Medana, C.; Catalano, M.G.; Vercellinato, I.; Danni, O.; Boccuzzi, G. Oxidative stress-dependent impairment of cardiac-specific transcription factors in experimental diabetes. *Endocrinology* **2006**, *147*, 5967–5974. [[CrossRef](#)]
10. Gordon, J.W.; Shaw, J.A.; Kirshenbaum, L.A. Multiple facets of NF- κ B in the heart: To be or not to NF- κ B. *Circ. Res.* **2011**, *108*, 1122–1132. [[CrossRef](#)]
11. Mariappan, N.; Elks, C.M.; Sriramula, S.; Guggilam, A.; Liu, Z.; Borkhsenius, O.; Francis, J. NF-kappaB-induced oxidative stress contributes to mitochondrial and cardiac dysfunction in type II diabetes. *Cardiovasc. Res.* **2010**, *85*, 473–483. [[CrossRef](#)]
12. Adameova, A.; Dhalla, N.S. Role of microangiopathy in diabetic cardiomyopathy. *Heart Fail. Rev.* **2014**, *19*, 25–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Gao, H.; Yang, Q.; Dong, R.; Hou, F.; Wu, Y. Sequential changes in autophagy in diabetic cardiac fibrosis. *Mol. Med. Rep.* **2016**, *13*, 327–332. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Ahn, C.; Kang, J.H.; Jeung, E.B. Calcium homeostasis in diabetes mellitus. *J. Vet. Sci.* **2017**, *18*, 261–266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Zhang, Y.; Wang, Y.; Yanni, J.; Qureshi, M.A.; Logantha, S.J.R.J.; Kassab, S.; Boyett, M.R.; Gardiner, N.J.; Sun, H.; Howarth, F.C.; et al. Electrical Conduction System Remodeling in Streptozotocin-Induced Diabetes Mellitus Rat Heart. *Front. Physiol.* **2019**, *10*, 826. [[CrossRef](#)]
16. Skyler, J.S. Primary and secondary prevention of Type 1 diabetes. *Diabet. Med.* **2013**, *30*, 161–169. [[CrossRef](#)]
17. Ley, S.H.; Hamdy, O.; Mohan, V.; Hu, F.B. Prevention and management of type 2 diabetes: Dietary components and nutritional strategies. *Lancet* **2014**, *383*, 1999–2007. [[CrossRef](#)]
18. Demaison, L.; Moreau, D.; Vergely-Vandriessse, C.; Grégoire, S.; Degois, M.; Rochette, L. Effects of dietary polyunsaturated fatty acids and hepatic steatosis on the functioning of isolated working rat heart under normoxic conditions and during post-ischemic reperfusion. *Mol. Cell. Biochem.* **2001**, *224*, 103–116. [[CrossRef](#)]

19. McLennan, P.L.; Abeywardena, M.Y.; Dallimore, J.A.; Raederstorff, D. Dietary fish oil preserves cardiac function in the hypertrophied rat heart. *Br. J. Nutr.* **2012**, *108*, 645–654. [[CrossRef](#)]
20. Charnock, J.S.; Sundram, K.; Abeywardena, M.Y.; McLennan, P.L.; Tan, D.T. Dietary fats and oils in cardiac arrhythmia in rats. *Am. J. Clin. Nutr.* **1991**, *53*, 1047S–1049S. [[CrossRef](#)]
21. Kazemian, P.; Kazemi-Bajestani, S.M.R.; Alherbish, A.; Steed, J.; Oudit, G.Y. The use of ω -3 poly-unsaturated fatty acids in heart failure: A preferential role in patients with diabetes. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **2012**, *26*, 311–320. [[CrossRef](#)]
22. Eclov, J.A.; Qian, Q.; Redetzke, R.; Chen, Q.; Wu, S.C.; Healy, C.L.; Ortmeier, S.B.; Harmon, E.; Shearer, G.C.; O'Connell, T.D. EPA, not DHA, prevents fibrosis in pressure overload-induced heart failure: Potential role of free fatty acid receptor 4. *J. Lipid Res.* **2015**, *56*, 2297–2308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Calder, P.C. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: From molecules to man. *Biochem. Soc. Trans.* **2017**, *45*, 1105–1115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Sergiel, J.P.; Martine, L.; Raederstorff, D.; Grynberg, A.; Demaison, L. Individual effects of dietary EPA and DHA on the functioning of the isolated working rat heart. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **1998**, *76*, 728–736. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Calder, P.C. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1851*, 469–484. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Demaison, L.; Sergiel, J.P.; 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 ischemia. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1227*, 53–59. [[CrossRef](#)]
27. Pinel, A.; Morio-Liondore, B.; Capel, F. n-3 Polyunsaturated fatty acids modulate metabolism of insulin-sensitive tissues: Implication for the prevention of type 2 diabetes. *J. Physiol. Biochem.* **2014**, *70*, 647–658. [[CrossRef](#)]
28. Bhardwaj, P.; Khanna, D. Green tea catechins: Defensive role in cardiovascular disorders. *Chin. J. Nat. Med.* **2013**, *11*, 345–353. [[CrossRef](#)]
29. Zhang, C.; Qin, Y.Y.; Wei, X.; Yu, F.F.; Zhou, Y.H.; He, J. Tea consumption and risk of cardiovascular outcomes and total mortality: A systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Eur. J. Epidemiol.* **2015**, *30*, 103–113. [[CrossRef](#)]
30. Kim, S.J.; Li, M.; Jeong, C.W.; Bae, H.B.; Kwak, S.H.; Lee, S.H.; Lee, H.J.; Heo, B.H.; Yook, K.B.; Yoo, K.Y. Epigallocatechin-3-gallate, a green tea catechin, protects the heart against regional ischemia-reperfusion injuries through activation of RISK survival pathways in rats. *Arch. Pharm. Res.* **2014**, *37*, 1079–1085. [[CrossRef](#)]
31. Ellinger, S.; Müller, N.; Stehle, P.; Ulrich-Merzenich, G. Consumption of green tea or green tea products: Is there an evidence for antioxidant effects from controlled interventional studies? *Phytomedicine* **2011**, *18*, 903–915. [[CrossRef](#)]
32. Sharifzadeh, M.; Ranjbar, A.; Hosseini, A.; Khanavi, M. The Effect of Green Tea Extract on Oxidative Stress and Spatial Learning in Streptozotocin-diabetic Rats. *Iran. J. Pharm. Res. IJPR* **2017**, *16*, 201–209. [[PubMed](#)]
33. Vinson, J.A.; Zhang, J. Black and green teas equally inhibit diabetic cataracts in a streptozotocin-induced rat model of diabetes. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 3710–3713. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Anderson, R.A.; Polansky, M.M. Tea enhances insulin activity. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 7182–7186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Waltner-Law, M.E.; Wang, X.L.; Law, B.K.; Hall, R.K.; Nawano, M.; Granner, D.K. Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, represses hepatic glucose production. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 34933–34940. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Shimizu, M.; Kobayashi, Y.; Suzuki, M.; Satsu, H.; Miyamoto, Y. Regulation of intestinal glucose transport by tea catechins. *BioFactors* **2000**, *13*, 61–65. [[CrossRef](#)]
37. Babu, P.V.A.; Sabitha, K.E.; Shyamaladevi, C.S. Therapeutic effect of green tea extract on oxidative stress in aorta and heart of streptozotocin diabetic rats. *Chem. Biol. Interact.* **2006**, *162*, 114–120. [[CrossRef](#)]
38. Babu, P.V.A.; Liu, D. Green tea catechins and cardiovascular health: An update. *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 1840–1850. [[CrossRef](#)]
39. Vinson, J.A.; Teufel, K.; Wu, N. Green and black teas inhibit atherosclerosis by lipid, antioxidant, and fibrinolytic mechanisms. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 3661–3665. [[CrossRef](#)]

40. Liu, J.; Tang, Y.; Feng, Z.; Liu, J.; Liu, J.; Long, J. (−)-Epigallocatechin-3-gallate attenuated myocardial mitochondrial dysfunction and autophagy in diabetic Goto-Kakizaki rats. *Free Radic. Res.* **2014**, *48*, 898–906. [[CrossRef](#)]
41. Kilkenny, C.; Browne, W.J.; Cuthill, I.C.; Emerson, M.; Altman, D.G. Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research. *J. Pharmacol. Pharmacother.* **2010**, *1*, 94–99. [[CrossRef](#)]
42. Srinivasan, K.; Viswanad, B.; Asrat, L.; Kaul, C.L.; Ramarao, P. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol. Res.* **2005**, *52*, 313–320. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Demaison, L.; Moreau, D.; Clauw, F.; Vergely, C.; Rochette, L. Mitochondrial basis of the anti-arrhythmic action of lidocaine and modulation by the n-6 to n-3 PUFA ratio of cardiac phospholipids. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **2013**, *27*, 373–386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Folch, J.; Lees, M.; Sloane Stanley, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **1957**, *226*, 497–509. [[PubMed](#)]
45. Capel, F.; Acquaviva, C.; Pitois, E.; Laillet, B.; Rigaudière, J.P.; Jouve, C.; Pouyet, C.; Gladine, C.; Comte, B.; Vianey Saban, C.; et al. DHA at nutritional doses restores insulin sensitivity in skeletal muscle by preventing lipotoxicity and inflammation. *J. Nutr. Biochem.* **2015**, *26*, 949–959. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Radenković, M.; Stojanović, M.; Prostran, M. Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2016**, *78*, 13–31. [[CrossRef](#)]
47. Suman, R.K.; Ray Mohanty, I.; Borde, M.K.; Maheshwari, U.; Deshmukh, Y.A. Development of an Experimental Model of Diabetes Co-Existing with Metabolic Syndrome in Rats. *Adv. Pharmacol. Sci.* **2016**, *2016*, 9463476. [[CrossRef](#)]
48. Skovsø, S. Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. *J. Diabetes Investig.* **2014**, *5*, 349–358. [[CrossRef](#)]
49. Mourmoura, E.; Chaté, V.; Couturier, K.; Laillet, B.; Vial, G.; Rigaudière, J.P.; Morio, B.; Malpuech-Brugère, C.; Azarnoush, K.; Demaison, L. Body adiposity dictates different mechanisms of increased coronary reactivity related to improved in vivo cardiac function. *Cardiovasc. Diabetol.* **2014**, *13*, 54. [[CrossRef](#)]
50. Yang, X.F.; Qiu, Y.Q.; Wang, L.; Gao, K.G.; Jiang, Z.Y. A high-fat diet increases body fat mass and up-regulates expression of genes related to adipogenesis and inflammation in a genetically lean pig. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **2018**, *19*, 884–894. [[CrossRef](#)]
51. Engelking, L.R. Chapter 88—Diabetes Mellitus (Metabolic Acidosis and Potassium Balance). In *Textbook of Veterinary Physiological Chemistry*, 3rd ed.; Engelking, L.R., Ed.; Academic Press: Boston, MA, USA, 2015; pp. 568–575, ISBN 978-0-12-391909-0.
52. Li, D. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and non-communicable diseases: Meta-analysis based systematic review. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* **2015**, *24*, 10–15.
53. Guichardant, M.; Calzada, C.; Bernoud-Hubac, N.; Lagarde, M.; Véricel, E. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and oxygenated metabolism in atherothrombosis. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1851*, 485–495. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Leger, T.; Hininger-Favier, I.; Capel, F.; Geloën, A.; Rigaudière, J.P.; Jouve, C.; Pitois, E.; Pineau, G.; Vaysse, C.; Chardigny, J.M.; et al. Dietary canolol protects the heart against the deleterious effects induced by the association of rapeseed oil, vitamin E and coenzyme Q10 in the context of a high-fat diet. *Nutr. Metab.* **2018**, *15*, 15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Dyal, S.C. Methodological issues and inconsistencies in the field of omega-3 fatty acids research. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* **2011**, *85*, 281–285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Wang, P.; Zhang, L.; Gong, Y.; Zhang, H.; Wang, X.; Li, Y. Impacts of systemic hypertension and left ventricular hypertrophy on outcome of cardiopulmonary resuscitation and therapeutic hypothermia in a cardiac arrest model of rat. *Shock* **2016**, *45*, 434–440. [[CrossRef](#)]
57. Liu, C.; Yang, C.X.; Chen, X.R.; Liu, B.X.; Li, Y.; Wang, X.Z.; Sun, W.; Li, P.; Kong, X.Q. Alamandine attenuates hypertension and cardiac hypertrophy in hypertensive rats. *Amino Acids* **2018**, *50*, 1071–1081. [[CrossRef](#)]
58. Wang, Z.; do Carmo, J.M.; Aberdein, N.; Zhou, X.; Williams, J.M.; da Silva, A.A.; Hall, J.E. Synergistic Interaction of Hypertension and Diabetes in Promoting Kidney Injury and the Role of Endoplasmic Reticulum Stress. *Hypertension* **2017**, *69*, 879–891. [[CrossRef](#)]
59. Khan, S.S.; Quaggin, S.E. Therapies on the Horizon for Diabetic Kidney Disease. *Curr. Diabetes Rep.* **2015**, *15*, 111. [[CrossRef](#)]

60. Montezano, A.C.; Dulak-Lis, M.; Tsiropoulou, S.; Harvey, A.; Briones, A.M.; Touyz, R.M. Oxidative Stress and Human Hypertension: Vascular Mechanisms, Biomarkers, and Novel Therapies. *Can. J. Cardiol.* **2015**, *31*, 631–641. [CrossRef]
61. Nath, S.; Ghosh, S.K.; Choudhury, Y. A murine model of type 2 diabetes mellitus developed using a combination of high fat diet and multiple low doses of streptozotocin treatment mimics the metabolic characteristics of type 2 diabetes mellitus in humans. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2017**, *84*, 20–30. [CrossRef]
62. Dennis, K.E.; Hill, S.; Rose, K.L.; Sampson, U.K.A.; Hill, M.F. Augmented cardiac formation of oxidatively-induced carbonylated proteins accompanies the increased functional severity of post-myocardial infarction heart failure in the setting of type 1 diabetes mellitus. *Cardiovasc. Pathol.* **2013**, *22*, 473–480. [CrossRef]
63. Thum, T.; Fraccarollo, D.; Schultheiss, M.; Froese, S.; Galuppo, P.; Widder, J.D.; Tsikas, D.; Ertl, G.; Bauersachs, J. Endothelial nitric oxide synthase uncoupling impairs endothelial progenitor cell mobilization and function in diabetes. *Diabetes* **2007**, *56*, 666–674. [CrossRef] [PubMed]
64. Luo, S.; Lei, H.; Qin, H.; Xia, Y. Molecular mechanisms of endothelial NO synthase uncoupling. *Curr. Pharm. Des.* **2014**, *20*, 3548–3553. [CrossRef] [PubMed]
65. Konior, A.; Schramm, A.; Czesnikiewicz-Guzik, M.; Guzik, T.J. NADPH Oxidases in Vascular Pathology. *Antioxid. Redox Signal.* **2014**, *20*, 2794–2814. [CrossRef] [PubMed]
66. Jansen, F.; Yang, X.; Franklin, B.S.; Hoelscher, M.; Schmitz, T.; Bedorf, J.; Nickenig, G.; Werner, N. High glucose condition increases NADPH oxidase activity in endothelial microparticles that promote vascular inflammation. *Cardiovasc. Res.* **2013**, *98*, 94–106. [CrossRef]
67. Lee, M.S.; Kim, C.T.; Kim, Y. Green tea (–)-epigallocatechin-3-gallate reduces body weight with regulation of multiple genes expression in adipose tissue of diet-induced obese mice. *Ann. Nutr. Metab.* **2009**, *54*, 151–157. [CrossRef]
68. Kao, Y.H.; Chang, H.H.; Lee, M.J.; Chen, C.L. Tea, obesity, and diabetes. *Mol. Nutr. Food Res.* **2006**, *50*, 188–210. [CrossRef]
69. Mourmoura, E.; Rigaudière, J.P.; Couturier, K.; Hiner, I.; Laillet, B.; Malpuech-Brugère, C.; Azarnoush, K.; Demaison, L. Long-term abdominal adiposity activates several parameters of cardiac energy function. *J. Physiol. Biochem.* **2016**, *72*, 525–537. [CrossRef]
70. Ruiz-Gutierrez, V.; Molina, M.T.; Vázquez, C.M. Comparative Effects of Feeding Different Fats on Fatty Acid Composition of Major Individual Phospholipids of Rat Hearts. *Ann. Nutr. Metab.* **1990**, *34*, 350–358. [CrossRef]
71. Limbu, R.; Cottrell, G.S.; McNeish, A.J. Characterisation of the vasodilation effects of DHA and EPA, n-3 PUFAs (fish oils), in rat aorta and mesenteric resistance arteries. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0192484. [CrossRef]
72. Patterson, E.; Wall, R.; Fitzgerald, G.F.; Ross, R.P.; Stanton, C. Health Implications of High Dietary Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids. Available online: <https://www.hindawi.com/journals/jnme/2012/539426/> (accessed on 26 August 2019).
73. Mustad, V.A.; Demichele, S.; Huang, Y.S.; Mika, A.; Lubbers, N.; Berthiaume, N.; Polakowski, J.; Zinker, B. Differential effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on metabolic control and vascular reactivity in the type 2 diabetic ob/ob mouse. *Metabolism* **2006**, *55*, 1365–1374. [CrossRef]
74. Skrzydlewska, E.; Ostrowska, J.; Farbiszewski, R.; Michalak, K. Protective effect of green tea against lipid peroxidation in the rat liver, blood serum and the brain. *Phytomedicine* **2002**, *9*, 232–238. [CrossRef]
75. Fukushima, A.; Lopaschuk, G.D. Acetylation control of cardiac fatty acid β -oxidation and energy metabolism in obesity, diabetes, and heart failure. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *1862*, 2211–2220. [CrossRef] [PubMed]
76. Casanova, E.; Salvadó, J.; Crescenti, A.; Gibert-Ramos, A. Epigallocatechin Gallate Modulates Muscle Homeostasis in Type 2 Diabetes and Obesity by Targeting Energetic and Redox Pathways: A Narrative Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 532. [CrossRef] [PubMed]
77. Al-Biltagi, M.A.M.; Abo-Elezz, A.A.E.; Abd-Elhafez, M.A.; Mabrouk, M.M.; Suliman, G.A. Beneficial Effects of Omega-3 Supplement to the Enteral Feeding in Children with Mild to Moderate Sepsis. *J. Intensive Care Med.* **2017**, *32*, 212–217. [CrossRef] [PubMed]
78. Singer, P.; Theilla, M.; Fisher, H.; Gibstein, L.; Grozovski, E.; Cohen, J. Benefit of an enteral diet enriched with eicosapentaenoic acid and gamma-linolenic acid in ventilated patients with acute lung injury. *Crit. Care Med.* **2006**, *34*, 1033–1038. [CrossRef] [PubMed]

79. Yang, D.; Yang, D. Role of Intracellular Ca²⁺. Available online: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/678456/> (accessed on 27 August 2019).
80. Karmazyn, M.; Sostaric, J.V.; Gan, X.T. The myocardial Na⁺/H⁺ exchanger: A potential therapeutic target for the prevention of myocardial ischaemic and reperfusion injury and attenuation of postinfarction heart failure. *Drugs* **2001**, *61*, 375–389. [[CrossRef](#)]
81. Matteucci, E.; Rizvi, S.I.; Giampietro, O. Erythrocyte sodium/hydrogen exchange inhibition by (–) epicatechin. *Cell Biol. Int.* **2001**, *25*, 771–776. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Publication n°3

Early sepsis does not stimulate reactive oxygen species production and does not reduce cardiac function despite an increased inflammation status.

Après l'étude de la fonction cardiaque dans des situations de stress oxydant de niveau extrême, absent dans l'obésité mais sévère et chronique dans le diabète sucré, nous nous sommes intéressés aux effets d'un statut oxydant intermédiaire sur la fonction cardiaque. Pour cela, le sepsis précoce nous a semblé un modèle attractif au vu de l'évolution de cette pathologie de la phase hyperdynamique vers la phase hypodynamique (Flynn, Chokkalingam Mani, et Mather 2010).

Une étude a donc été mise en place à l'aide un modèle de sepsis précoce obtenu par une ligature cœcale à 1,5 cm de l'apex du cæcum suivie de 2 perforations de l'organe dans la zone ligaturée. Trente rats Wistar ont été comparés au même nombre d'animaux opérés fictivement. La fonction cardiaque a été évaluée dans des conditions standard *in vivo* à l'aide d'une sonde de pression Millar et *ex vivo* grâce à un système de cœur isolé perfusé selon la méthode de Langendorff. Plusieurs paramètres impliqués dans le stress oxydant et l'inflammation ont été déterminés dans le plasma et le cœur.

Après 48h, le sepsis précoce est accompagné d'une augmentation de l'inflammation au vu des taux plasmatiques et myocardiques de TNF- α et d'IL-1 β . La fonction cardiaque est légèrement stimulée par le sepsis dans les situations *in vivo* et *ex vivo*. De plus, l'activité mécanique du coeur perfusé montre une corrélation positive avec le débit de perfusion. En effet, le passage d'un débit de 12 mL/min à 24 mL/min double les valeurs de pression développée du ventricule gauche et de la consommation en O₂ du myocarde. Les modifications induites par le sepsis sont associées à des niveaux inchangés de stress oxydant. Cependant, plusieurs paramètres indiquent une production cardiaque des ROS plus faible dans le groupe soumis à un sepsis.

En conclusion, malgré le développement de l'inflammation, le sepsis précoce n'a pas augmenté la production d'oxygène réactif et n'a pas réduit la fonction myocardique. Le modèle de sepsis précoce par ligature et perforation cœcale a donc été validé.

ORIGINAL RESEARCH

Early sepsis does not stimulate reactive oxygen species production and does not reduce cardiac function despite an increased inflammation status

Thibault Léger¹, Alice Charrier¹, Clarisse Moreau¹, Isabelle Hininger-Favier², Evangelia Mourmoura², Jean-Paul Rigaudière¹, Elodie Pitois¹, Damien Bouvier³, Vincent Sapin³, Bruno Pereira⁴, Kasra Azarnoush^{1,5} & Luc Demaison¹

1 INRA, UMR 1019 Nutrition Humaine, Clermont-Ferrand Cedex 1, France

2 Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée, INSERM U1055, Université Joseph Fourier, Grenoble, France

3 Department of Medical Biochemistry and Molecular Biology, CHU Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France

4 Department of Clinical Research and Innovation, CHU Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France

5 Heart Surgery Department, G. Montpied Hospital, Clermont-Ferrand University Hospital, Clermont-Ferrand, France

Keywords

Contractility, heart, oxidative stress, sepsis.

Correspondence

Luc Demaison, INRA, UMR 1019 Nutrition Humaine, BP321, 58 rue Montalembert, 63009 Clermont-Ferrand Cedex 1, France.
Tel: (+33) 4 73 60 82 52
Fax: (+33) 4 73 60 82 55
E-mail: luc.demaison@clermont.inra.fr

Funding Information

This work was supported by 2 grants attributed by the Fédération Française de Cardiologie and society ADETEC of patients with a previous cardiac surgery.

Received: 26 January 2017; Revised: 6 March 2017; Accepted: 8 March 2017

doi: 10.14814/phy2.13231

Physiol Rep, 5 (13), 2017, e13231,
doi: 10.14814/phy2.13231

Abstract

If it is sustained for several days, sepsis can trigger severe abnormalities of cardiac function which leads to death in 50% of cases. This probably occurs through activation of toll-like receptor-9 by bacterial lipopolysaccharides and overproduction of proinflammatory cytokines such as TNF- α and IL-1 β . In contrast, early sepsis is characterized by the development of tachycardia. This study aimed at determining the early changes in the cardiac function during sepsis and at finding the mechanism responsible for the observed changes. Sixty male Wistar rats were randomly assigned to two groups, the first one being made septic by cecal ligation and puncture (sepsis group) and the second one being subjected to the same surgery without cecal ligation and puncture (sham-operated group). The cardiac function was assessed in vivo and ex vivo in standard conditions. Several parameters involved in the oxidative stress and inflammation were determined in the plasma and heart. As evidenced by the plasma level of TNF- α and gene expression of IL-1 β and TNF- α in the heart, inflammation was developed in the sepsis group. The cardiac function was also slightly stimulated by sepsis in the in vivo and ex vivo situations. This was associated with unchanged levels of oxidative stress, but several parameters indicated a lower cardiac production of reactive oxygen species in the septic group. In conclusion, despite the development of inflammation, early sepsis did not increase reactive oxygen species production and did not reduce myocardial function. The depressant effect of TNF- α and IL-1 β on the cardiac function is known to occur at very high concentrations. The influence of low- to moderate-grade inflammation on the myocardial mechanical behavior must thus be revisited.

Introduction

Sepsis, a general infection of the organism characterized by “blood poisoning”, is mainly due to bacterial contaminations. It strikes 30 million people worldwide every year and it is in constant progression in contrast with other pathologies such as cancer and cardiovascular diseases, whose incidence rates remain stable over time. Despite

the medical improvements in the most developed countries, 30% of patients die from this pathology. Infants, elderlies, and people with deficient immune system (diabetes, AIDS, cancer, kidney, and liver diseases) are the most vulnerable. Severe sepsis is extremely expensive for health systems. Indeed, the duration of hospitalization is 2–3 weeks and is often followed by organ failure, which must be treated. A study performed by the Interpharma

laboratory has been carried out in Switzerland in 2001 in order to estimate the costs linked to sepsis. In this study, Schmid *et al.* (2004) count approximately 10,000 cases of sepsis treated in Switzerland each year with 60 percent being severe sepsis. The costs for each patient reach 14,000 CHF, leading to global costs of 1 billion 400 million CHF. This amount of money includes only costs during hospitalization: the other costs resulting from possible complications and ambulatory cares are not taken into consideration. Moreover, the direct costs corresponding to the costs triggered during the stay in care units depict only 30 percent of global costs. Indirect costs related to productivity loss (sick leave, early retirement, and premature death) reach 100,000 CHF per patient with 95% being due to premature death.

Severe sepsis induces a general inflammation of the organism, abnormal blood clotting and systemic hypotension (Schouten *et al.* 2008). In most severe cases, when the hypotension is not resuscitated with crystalloid solution perfusion, the illness provokes a septic shock, which generally leads to death. Sepsis provokes multi-organ ravages with the heart being responsible of death in 50% of cases (Smeding *et al.* 2012). The up-to-date measurement techniques of cardiac function (echography, MRI) do not reveal important modifications of this parameter during sepsis, except a decrease in diastolic function followed by a reduction of systolic function in the sickest patients (Hunter and Doddi 2010; Flynn *et al.* 2010). The most evident abnormality of the cardiovascular function is a decrease in arterial pressure associated with an initial compensatory stimulation of the heart rate (Cheung *et al.* 2015). The activation of the cardiac pump has for a long period been made responsible for the exhaustion of cardiomyocytes and the cardiac failure associated with the septic shock. Moreover, the systemic hypotension and associated increase in plasma fibrinogen (reduction of blood fluidity) suggests organ hypo-perfusion and ischemia as the cause of the multi-organ ravages. This hypothesis has however been recently modulated by the study of Antonucci *et al.* (2014) who demonstrated area of local ischemia in the myocardium of septic patients especially when the hypotension was severe. A more recent hypothesis has however emerged: bacterial lipopolysaccharides inhibit the contractility of isolated cardiomyocytes through a stimulation of the NF κ B pathway (Avlas *et al.* 2011; Hobai *et al.* 2015). In polymicrobial sepsis, this would occur through a stimulation of Toll-like receptor 9 which is known to trigger cardiac failure (Lohner *et al.* 2013) and death (Plitas *et al.* 2008). The phenomenon occurs through cellular death (VÍctor *et al.* 2009). According to the literature, sepsis-related cardiac disorders are due to the production of proinflammatory cytokines that are known to depress cardiac function (Ferrari 1999; Bujak and Frangiannis

2009). However, this effect is observed only at very high cytokine concentrations and may not have clinical significance (Ferrari 1999). Moreover, cardiac mitochondria are important in the etiology of sepsis. Indeed, this pathology triggers a reduction of the oxidative phosphorylation associated with an important oxidative stress detected through a decrease in the aconitase/fumarase ratio (Mason and Stefan 2008). This is however in contradiction with the initial sepsis-induced stimulation of the heart rate, since more energy is necessary to satisfy the needs of the cardiomyocytes.

This study aimed at determining the changes in the cardiac function during the early phase of sepsis in relation with the inflammatory status. We also investigated whether this was associated with an oxidative stress in plasma and heart. To perform this study, sepsis was induced in the rat by cecal ligation and puncture and it was maintained for 24 h. The cardiac function was then determined *in vivo* with a Millar pressure gauge inserted into the cavity of the left ventricle and *ex vivo* in the isolated heart perfused in standard conditions. The inflammatory status was determined in the systemic and myocardial compartments by evaluating the amount of TNF- α by ELISA and the cardiac levels of TNF- α and IL-1 β mRNAs, respectively. The oxidative stress, measured in the same compartments, was determined through the evaluation of protein thiol residues, total antioxidant defenses (FRAP), glutathione peroxidase activity and GSH to GSSG ratio.

Methods

Ethical approval

All experiments followed the European Union recommendations concerning the care and use of laboratory animals for experimental and scientific purposes. All animal work was approved by the local board of ethics for animal experimentation (Comité d'éthique pour l'expérimentation animale Auvergne) and notified to the research animal facility of our laboratory (authorization n° APAFIS#2213-2016082409264678 v2).

Experimental animals and surgical procedure

Sixty male Wistar rats (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) were housed two per cage in our animal facility at 4 months of age. Half of them were subjected to cecal ligation and puncture in order to induce severe sepsis and the other half was sham-operated.

Cecal ligation and puncture were performed according to Toscano *et al.* (2011). Briefly, the animals were

anesthetized with isoflurane (induction 4%, maintenance 2%). After shaving the fur, the external abdominal wall was disinfected with alcoholic betadine and a horizontal incision was performed in the wall at the level of the cecum in order to reach the abdominal cavity and expose the cecum. A ligation of the cecum was carried out at 1.5 cm of the apex of the organ. Two perforations were performed through the cecum wall at 1 cm interval on the upper face of the organ with a 20 gauge needle and a soft pressure was applied on the cecum in order to facilitate externalization of digestive matter at the outer surface of the organ. The cecum was then returned into the abdominal cavity and buprenorphine (0.05 mg/kg body weight) was injected subcutaneously in the neck. The peritoneum was closed with 6.0 silk sutures and the skin with metal clips. Sham-operated animals were treated identically as compared to septic animals except that the cecum was not subjected to ligation and puncture. After the surgery, isoflurane anesthesia was stopped and the rats were placed one per cage in the animal facility. The waking occurred after 3 to 5 min and rats were maintained in their cage during 24 h. One rat died during anesthesia and two septic animals died during the 24 h post-surgery period.

Evaluation of body composition

The animal body weight and body composition were determined just before the surgical procedure and at the end of the 24 h post-operative period. Body composition was evaluated by nuclear magnetic resonance using an adequate spectrometer (EchoMRI LL, Houston, TX). The system allowed the estimation of fat, adipose and aqueous masses in living animals. At the end of the 24 h post-operative period, the animals were sacrificed and the weights of hind leg muscles as well as those of abdominal and epididymal fats were measured. Abdominal fat was calculated as the sum of visceral and peri-renal fats.

Estimation of in vivo cardiac function

In vivo cardiac function was determined using a Millar pressure gauge (Harvard Apparatus, Les Ulis, France) introduced into the left ventricle. After anesthesia with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (20 mg/kg) and heparinization of the rats (500 IU/kg), the gauge was introduced into the right carotid artery and immediately inserted into the left ventricle cavity. After a 10-min period allowing stabilization of cardiac function, the left ventricle developed pressure, dP/dt_{max} , dP/dt_{min} and heart rate were monitored. The aortic systolic, diastolic, and mean pressures were then determined by inserting the gauge into the aorta. The presented data represent the

means of 100 cardiac cycles per rat for 30 rats per group. After the removal of the gauge, the right carotid was bound. Blood was collected from the abdominal aorta and centrifuged (1800 g, 10 min, 4°C) for plasma preparation. Once obtained, the plasma was distributed in different tubes, immediately frozen at the temperature of liquid nitrogen and stored at -80°C until different biochemical determinations were performed.

Determination of ex vivo cardiac function

Cardiac function was estimated using the non-recirculating Langendorff's method in standardized conditions. Briefly, just after estimation of the in vivo cardiac function and blood collection, the heart was rapidly collected and placed in cold (4°C) saline buffer until cessation of beating. It was then immediately perfused by the aorta at 37°C with a Krebs-Heinselett buffer composed of (in mmol/L) NaCl (119), KCl (4,8), MgSO_4 (1,6), NaHCO_3 (22), KH_2PO_4 (1,2), CaCl_2 (1,8), D-glucose (11) and sodium hexanoate (0.5), pH 7.4. The perfusion buffer was constantly oxygenated with carbogen (95% O_2 -5% CO_2). The perfusion was carried out within the 1st min after heart collection in order to avoid problems of cellular damages and preconditioning. The pulmonary artery was then cannulated for collection of coronary effluents. The heart was electrically paced from the 5th min to the end of perfusion at a rate of 370 beats/min. The perfusion flow was progressively raised at a rate of 12 mL/min during the first 5 min of perfusion and kept constant until the 30th min of perfusion. At the 30th min of perfusion, the perfusion flow was fixed at a value of 24 mL/min in order to maximally activate cardiac function and it was kept constant until the 40th min of perfusion. At the beginning of perfusion, a latex balloon related to a pressure gauge and an amplifier was inserted into the left ventricle. It was inflated until the diastolic pressure reached 10 mmHg. This allowed the evaluations of systolic, diastolic, and developed pressure as well as dP/dt_{max} , dP/dt_{min} and heart rate. The rate pressure product was the product between heart rate and left ventricular developed pressure. The use of perfectly standardized perfusion conditions allowed the evaluation of the contractility and relaxation through the measurements of dP/dt_{max} and dP/dt_{min} , respectively. A pressure gauge was also inserted just before the aortic cannula in order to estimate the perfusion pressure. In conditions of perfusion at fixed coronary flow, the perfusion pressure corresponds to the coronary pressure and changes in coronary pressure reveals modifications of coronary volume (coronary dilatation, coronary constriction and/or obliteration of coronary micro-vessels). The parameters of cardiac function were evaluated at the 30th min of perfusion (coronary flow = 12 mL/

min), at the 34th min of perfusion (coronary flow = 24 mL/min when the perfusion fluid reached temperature stabilization) and at the 40th min of perfusion (coronary flow = 24 mL/min). All the parameters of cardiac function were recorded and analyzed with a computer using the HSE software (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Germany). The linear correlations between the metabolic efficiency and perfusion pressure as well as those between the dp/dt_{max} and perfusion pressure were calculated at each fixed coronary flow (12 and 24 mL/min). At the 30th and 40th min of perfusion, samples of arterial and venous perfusion fluid were anaerobically collected for determination of oxygen partial pressures with a blood gas analyzer (Radiometer, Neuilly-Plaisance, France). Cardiac oxygen consumption was determined by subtracting the venous oxygen partial pressure to the arterial one and by multiplying the difference by the coronary flow. The cardiac metabolic efficiency was calculated as the ratio between the rate pressure product and the oxygen consumption.

Gene expression

Gene expression of interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were measured in cardiac homogenates. RNA extraction was performed using TRIzol[®] (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions. Chloroform was added (0.2 mL/mL of TRIzol[®]), and samples were mixed and centrifuged for 15 min at 12,000 g and 4°C. Aqueous phase containing RNA was collected, mixed with isopropanol to precipitate RNA, and centrifuged (12,000g, 4°C, 15 min). After centrifugation, the pellet was washed with ethanol 70% (v/v), dried, and suspended in water. RNA quantification and integrity were verified by measuring the ratio of optical density at 260 and 280 nm and by agarose gel migration, respectively. Two micrograms of total RNA was used for reverse transcription. The products of reverse transcription were used for reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) to evaluate gene expression. TaqMan low density array was used using 384-well format plates on a 7900HT Fast Real Time PCR system (Applied Biosystems). Gene expression was performed using specific primers (sequences available on request) and Rotor-Gene SYBR Green PCR master mix on a Rotor-Gene Q System (Qiagen, Courtaboeuf, France). mRNA quantification was assayed using the ddCT method. β -actin was used as the housekeeping gene.

Other biochemical determinations

Plasma TNF- α and triglycerides concentrations were determined using commercially available kits (ThermoFisher,

Courtaboeuf, France). Plasma creatinine was determined spectrophotometrically using an enzymatic assay kit (Sigma-Aldrich, L'Isle d'Abeau, France). Several parameters of the oxidative stress (protein thiol residues, total antioxidant defenses (FRAP), glutathione peroxidase activity, GSH and GSSG) were determined as already described previously (Mourmoura et al. 2013).

Statistical analyses

Results are presented as mean \pm S.E.M. The morphological and biochemical data as well as the results of the in vivo cardiac function were contrasted across the two groups by one-way analysis of variance (ANOVA). Measures related to the ex vivo cardiac function were treated with repeated-measures ANOVA to test the effect of sepsis (external factor), that of the perfusion time (internal factor) and their interaction (heart as subject factor). When required, group means were contrasted with a Fisher's LSD test.

Analysis of the correlations between the different parameters of the isolated perfused heart were two-sided, with a type I error set at $\alpha = 0.05$. Quantitative data were presented as the mean \pm standard deviation (SD) or the median (interquartile range) according to statistical distribution (assumption of normality assessed by using the Shapiro-Wilk test). The relationships between quantitative data were studied using correlation coefficients (Pearson or Spearman according to statistical distribution). Then, to take into account between and within subject variability (due to several measures for a same animal), random-effects for correlated measures were performed rather than usual statistical tests, which would not be appropriate due to the fact that the hypothesis of independence data was not verified. A probability (P) less than 0.05 was considered significant. The statistical analysis was performed using Stata software, version 13 (StataCorp, College Station, TX, US).

Results

Inflammation status

The level of TNF- α was increased from 10.8 ± 0.9 in the sham group to 20.4 ± 5.2 pg/mL in the sepsis group ($P < 0.05$), confirming the development of an inflammatory reaction in the sepsis group. The septic heart also displayed an increased inflammation status (Fig. 1) with raised mRNAs for TNF- α (+115%, $P < 0.001$) and IL-1 β (+100%, $P < 0.001$) even after the ex vivo perfusion. Plasma triglycerides were also increased (0.198 ± 0.010 vs. 0.333 ± 0.016 g/L in the sham-operated and sepsis groups, $P < 0.001$).

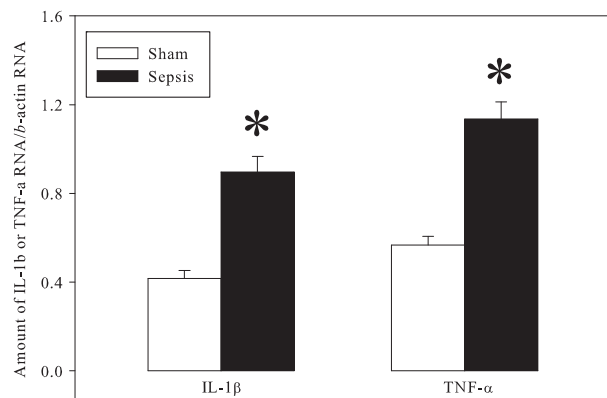


Figure 1. Gene expression of IL-1 β and TNF- α in the perfused heart. The results represent the means and S.E.M. of 30 animals per group. Sham: sham-operated animals; Sepsis: septic animals. *: significantly different.

Plasma and cardiac oxidative stress

Despite the sepsis-induced augmentation of the inflammatory status, the plasma and heart oxidative stress were not increased (Table 1). Plasma glutathione oxidase activity was reduced by sepsis (−11%) and the myocardial GSH to GSSG ratio was increased (+34%), suggesting that the production of reactive oxygen species was reduced in these two compartments.

Morphological data

The animal weights as well as fat, lean, and aqueous masses were similar before and 24 h after the surgical procedure (Table 2). The evaluations of organ weights were performed only 24 h after the surgery since such determinations necessitated animal sacrifice. The weights of peri-renal, visceral, abdominal and epididymal adipose tissues as well as those of the different hind leg muscles (quadriceps, extensor digitorus longus, gastrocnemius, plantaris, soleus and tibialis) and heart were not modulated by sepsis.

The surgery-induced changes in body composition are presented in Figure 2. Sepsis tended to reduce the loss of animal weight, but the difference was not significant. The sham-operation induced a significant increase in fat mass disappearance compared to sepsis (+276%). In contrast, sepsis favored the loss of lean mass (+51%) compared to sham-operation. The loss of aqueous mass was not affected by the type of surgery.

In vivo cardiac function

Evaluation of aortic pressures (Table 3) shows that sepsis tended to decrease the aortic systolic, diastolic and mean

Table 1. Plasma and cardiac oxidative stress.

Organ	Biochemical parameters	Sham	Sepsis
Plasma	Thiols (μ moles/gprot)	2.84 \pm 0.07	2.98 \pm 0.07
	FRAP (μ moles/gprot)	7.2 \pm 0.2	7.4 \pm 0.4
	GPX (U/gprot)	137 \pm 3	122 \pm 3 ¹
Heart	Thiols (μ moles/gprot)	84 \pm 3	84 \pm 3
	FRAP (μ moles/gprot)	118 \pm 4	116 \pm 4
	GPX (U/gprot)	1476 \pm 32	1434 \pm 25
	GSH (μ moles/gprot)	120 \pm 3	120 \pm 2
	GSSG (μ moles/gprot)	2.2 \pm 0.2	1.6 \pm 0.2
	GSH/GSSG	67 \pm 6	90 \pm 7 ¹

The results represent a mean and S.E.M. of 30 animals in each group. Sham, sham-operated animals; Sepsis, septicemic animals; FRAP, total antioxidant activity; GPX, glutathione peroxidase activity; GSH, reduced glutathione; GSSG, oxidized glutathione; gprot, g of proteins; U, unit.

¹Significantly different.

pressures, but the differences did not reach significance. The left ventricle developed pressure, contractility (dP/dt_{max}) and relaxation (dP/dt_{min}) were not modulated by sepsis. Conversely, the heart rate was significantly augmented (+11%).

Ex vivo cardiac function

The function of the isolated hearts was evaluated in standard conditions (Fig. 3) at two different fixed coronary flows (12 mL/min until the 30th min and 24 mL/min from the 30th to the 40th min of perfusion). The left ventricle developed pressure, whose changes were similar to those of the rate pressure product since all the hearts were electrically paced at a rate of 370 beats/min, was strongly increased (+88%) by the augmentation of coronary flow. Similar results were observed for contractility (+78%), relaxation (+73%) and coronary pressure (+151%).

Sepsis did not alter the left ventricle developed pressure compared to the sham-operation whatever the fixed coronary flow. This was not the case for contractility. Indeed, sepsis increased the value of this parameter at the 34th min of perfusion (+17%) at a coronary flow rate of 24 mL/min. However, the difference disappeared for a longest perfusion period. A similar pattern was observed for relaxation with a +14% increase at the 34th min of perfusion. However, this was different for the perfusion pressure. Similar when the flow was fixed at 12 mL/min, this parameter was decreased by sepsis for the highest coronary flow (−10 and −12% at the 34th and 40th min of perfusion). This occurred while the heart dry weight was unchanged by sepsis (318 \pm 6 and 321 \pm 7 mg for the sham and sepsis groups).

Table 2. Morphological characteristics of the animals.

	Sham		Sepsis	
	Pre-op.	Post-op.	Pre-op.	Post-op.
Animal weight (g)	575 ± 13	559 ± 13	564 ± 10	552 ± 10
Fat mass (g/100 g bw)	14.3 ± 0.6	14.1 ± 0.6	14.1 ± 0.6	14.3 ± 0.7
Lean mass (g/100 g bw)	77.4 ± 0.6	77.5 ± 0.6	77.6 ± 0.6	76.2 ± 0.7
Aqueous mass (g/100 g bw)	55.7 ± 0.5	56.1 ± 0.5	55.7 ± 0.5	55.9 ± 0.5
Peri-renal AT (g/100 g bw)	nd	1.41 ± 0.06	nd	1.45 ± 0.06
Visceral AT (g/100 g bw)	nd	1.68 ± 0.06	nd	1.86 ± 0.08
Abdominal AT (g/100 g bw)	nd	3.11 ± 0.11	nd	3.28 ± 0.13
Epididymal AT (g/100 g bw)	nd	1.33 ± 0.05	nd	1.40 ± 0.05
Quadriceps (mg/100 g bw)	nd	609 ± 20	nd	610 ± 16
EDL (mg/100 g bw)	nd	41.3 ± 0.6	nd	39.6 ± 0.7
Gastrocnemius (mg/100 g bw)	nd	428 ± 6	nd	436 ± 7
Plantaris (mg/100 g bw)	nd	88.1 ± 1.7	nd	86.7 ± 2.3
Soleus (mg/100 g bw)	nd	44.3 ± 1.4	nd	43.3 ± 1.4
Tibialis (mg/100 g bw)	nd	151 ± 2	nd	148 ± 2
Hind leg muscles (mg/100 g bw)	nd	769 ± 10	nd	760 ± 12
Heart (mg dw/100 g bw)	nd	58 ± 1	nd	58 ± 2

The results represent the means and S.E.M. of 30 animals per group. Sham, sham-operated animals; Sepsis, septicemic animals; Pre-op., pre-operative situation; Post-op., post-operative situation 24 h after the surgery; dw, dry weight; bw, body weight; AT, adipose tissue; EDL, extensor digitorus longus; nd, not determined since the weight was not measurable without sacrificing the animals. No significant differences were observed for all the data.

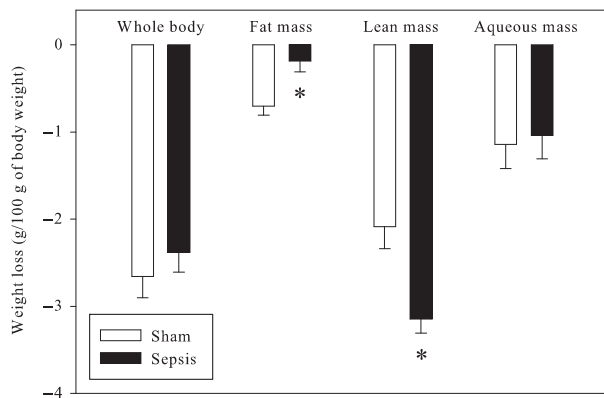


Figure 2. Body mass changes induced by the sham-operation and cecal ligation and puncture in rodents. The results represent the means and S.E.M. of 30 animals per group. Sham: sham-operated animals; Sepsis: septic animals. *: significantly different.

Myocardial oxygen consumption was also determined at the 30th and 40th min of perfusion (Fig. 4). Following the stimulation of cardiac function, the oxygen consumption was increased by the augmentation of coronary flow (+90%). No sepsis-induced difference was observed at the lowest coronary flow, but a slight but significant reduction (-3%) was noticed at 24 mL/min. However, the cardiac metabolic efficiency (ratio between the rate pressure

Table 3. Cardiovascular parameters in the in vivo situation.

Parameter	Sham	Sepsis
Aortic systolic pressure (mmHg)	91 ± 3	84 ± 2
Aortic diastolic pressure (mmHg)	63 ± 3	56 ± 3
Mean aortic pressure (mmHg)	76 ± 3	70 ± 2
Left ventricle developed pressure (mmHg)	104 ± 3	96 ± 2
Heart rate (beats/min)	246 ± 5	273 ± 7 ¹
dP/dt _{max} (mmHg/s)	5279 ± 212	5268 ± 288
dP/dt _{min} (mmHg/s)	4342 ± 235	4148 ± 193

The results represent a mean and S.E.M. of 30 animals in each group. Sham, sham-operated animals; Sepsis, septicemic animals; dP/dt max, contraction; dP/dt min, relaxation.

¹Significantly different.

product and the oxygen consumption) was never significantly altered.

Relationships between different parameters of the ex vivo cardiac function

The relationships between the perfusion pressure and metabolic efficiency for the four groups studied are presented in Figure 5A. Although the slopes of the linear regression lines were reduced when the coronary flow was increased from 12 to 24 mL/min (-60%), the cecal

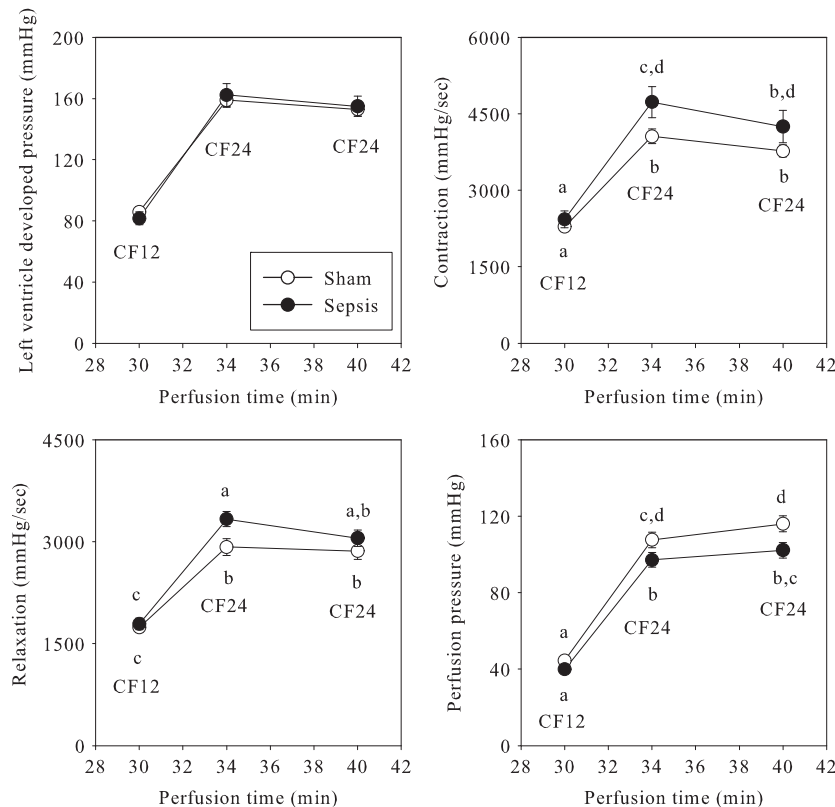


Figure 3. Cardiac mechanical function in ex vivo standardized conditions. The results represent the means and S.E.M. of 30 animals per group. Sham: sham-operated animals; Sepsis: septic animals; CF12 and CF24: coronary flow fixed at the value of 12 or 24 mL/min, respectively. a, b, c, d: a mean without a common letter in a same panel indicate a significant difference.

ligation and puncture did not affect these parameters. The cross-interaction between the effects of the coronary flow and sepsis was not significant.

The correlations linking the perfusion pressure with the dP/dt_{max} (contractility) are shown in Figure 5B. The slopes of the lines were significantly increased when the coronary flow rate was augmented to 24 mL/min (+24%) and when sepsis was induced (+85%). Interestingly, a significant cross-interaction was noticed. When the coronary flow rate was fixed at 12 mL/min, the line was less steep in the sepsis group, but when the flow was increased to 24 mL/min, the slope was strongly increased by the pathology (+205%) whereas that of the sham-operated group was reduced.

Renal function

Plasma creatinine was increased by sepsis (+17%, Fig. 6).

Discussion

This study aimed at determining the changes in the cardiac function during the early phase of sepsis in

relationship with the inflammatory status and at investigating whether it is associated with an oxidative stress in plasma and heart. The cardiac function was evaluated in the in vivo situation, but also ex vivo in a model of isolated rat heart perfused in standard conditions. The cecal ligation and puncture augmented the inflammatory status of the plasma and heart as evidenced by the increased amount of $TNF-\alpha$ in the plasma and the increased gene expression of $TNF-\alpha$ and $IL-1\beta$ in the myocardium. However, this did not increase the oxidative stress of the two compartments. On the contrary, this last parameter was reduced as suggested by the reduced glutathione oxidase activity of the plasma and the augmented GSH to GSSG ratio of the heart. All these modifications were associated with an activation of the heart in the in vivo and ex vivo situations.

Limitations of the study

In our study, the body composition of the animals was not modified by the cecal ligation and puncture (CLP) in comparison with the sham group. The duration of the post-surgery period (1 day) was probably too short in

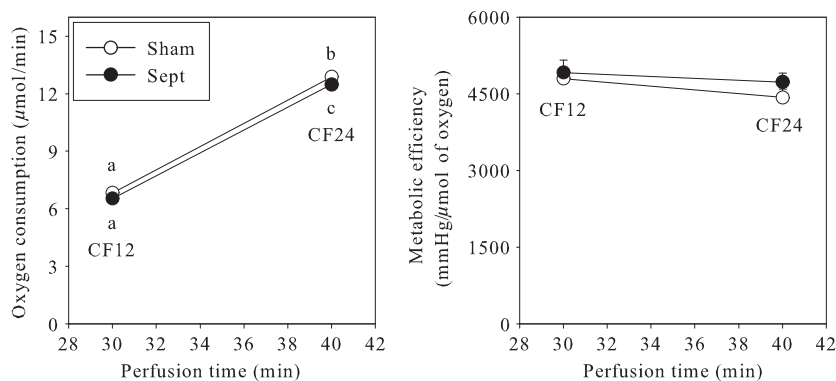


Figure 4. Cardiac oxidative metabolism in ex vivo standardized conditions. The results represent the means and S.E.M. of 30 animals per group. Sham: sham-operated animals; Sepsis: septic animals; CF12 and CF24: coronary flow fixed at the value of 12 or 24 mL/min, respectively. a, b, c: a mean without a common letter in a same panel indicate a significant difference.

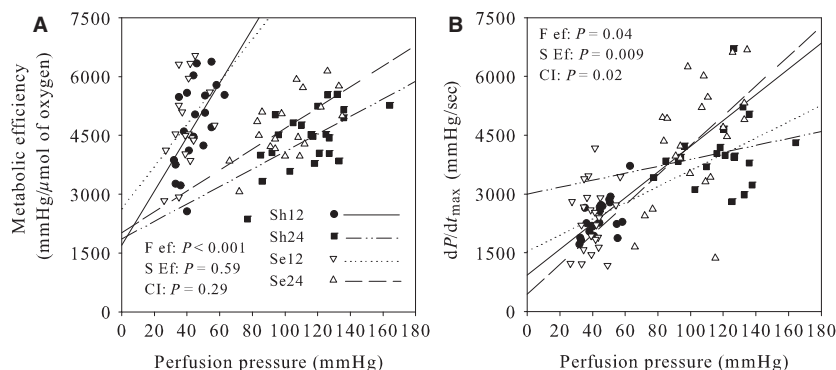


Figure 5. Correlations between the perfusion pressure and metabolic efficiency (panel A) as well as the perfusion pressure and dP/dt_{max} (panel B) of the isolated perfused hearts. The linear regression lines for panel A are: ME = 69 PPERF + 1692 ($P < 0.001$), ME = 22.3 PPERF + 1861 ($P < 0.001$), ME = 54.12 PPERF + 2630 ($P = 0.07$) and ME = 2658 PPERF + 2014 ($P < 0.001$) with 0.47, 0.21, 0.14 and 0.54 for correlation coefficients for the Sh12, Sh24, Se12 and Se24 groups. ME and PPERF are the metabolic efficiency and perfusion pressure. Those for panel B are: MAX = 21.45 PPERF + 1469 ($P = 0.201$), MAX = 13.74 PPERF + 2514 ($P = 0.213$), MAX = 23.34 PPERF + 1469 ($P = 0.141$) and MAX = 41.84 PPERF + 77 ($P = 0.002$) with 0.63, 0.51, 0.34 and 0.55 for correlation coefficients where MAX is the dP/dt_{max} . Sh12: hearts of sham-operated animals perfused at a flow rate of 12 mL/min; Sh24: hearts of sham-operated animals perfused at a flow rate of 24 mL/min; Se12: hearts of septic animals perfused at a flow rate of 12 mL/min; Se24: hearts of septic animals perfused at a flow rate of 24 mL/min; F ef: flow effect; S ef: sepsis effect; CI: cross-interaction.

order to allow any significant change in the fat and lean masses. However, another factor played an important role: the sham-operated animals were deeply affected by their surgery (opening of the abdominal wall and externalization of the cecum without ligation and puncture). During the post-surgery period, these animals did not eat and drink a lot (data not shown), which led to a small and not significant loss of body weight of similar amplitude as that estimated in the sepsis group (−2.8 and −2.1 g/100 g of body weight in the sham-operated and sepsis group, respectively). Injection of lipopolysaccharides or living bacteria versus vehicle would have been another alternative in order to better visualize the effect of sepsis on the body composition, but the cecal ligation

and puncture remains better to simulate an in vivo situation. An important result of the body composition confirmed the development of sepsis in our septic group: the loss of lean mass was significantly ampler compared with the sham-operated group, suggesting cachexia, which is supposed to occur during sepsis (Londhe and Guttridge 2015). Furthermore, the renal function was damaged as evidenced by the increased concentration of plasma creatinine. The colon ascendens stent peritonitis (CASP) is also an interesting model to simulate an in vivo situation: it allows a constant delivery of bacteria into the abdominal cavity in contrast with the CLP model which is more transitory on this viewpoint. CASP is thus more severe than CLP with a high inflammatory reaction (Maier et al.

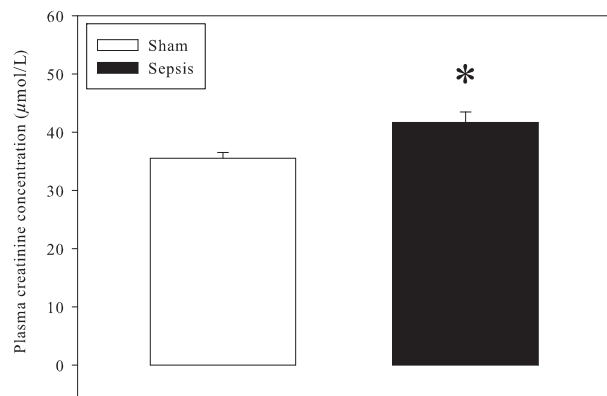


Figure 6. Plasma creatinine levels. The results represent the means and S.E.M. of 30 animals per group. Sham: sham-operated animals; Sepsis: septic animals. *: significantly different.

2004). However, it is less adapted to the study of the hyperdynamic phase of sepsis and its consequences on the cardiac function and it was thus rejected of our experimental design.

Another limitation of our study lies in the use of a particular model of isolated heart perfusion. In general, isolated hearts are perfused at fixed pressure (59–74 mmHg) against a column of water of constant height. In these conditions, the coronary flow is determined as a function of the coronary bed resistances. The flow decreases slightly but gradually with the perfusion time indicating a progressive increase in the coronary bed resistances. After a 30-min perfusion, the flow generally reaches approximately 11–13 mL/min for the size of the hearts used in this study. This is why we decided to perfuse the heart at a fixed coronary flow of 12 mL/min. In our study, the nutritional fluid was constantly perfused at this rate with the aid of a peristaltic pump. At the beginning of the perfusion, the flow was gradually increased (during 5 min) to 12 mL/min in order to not destroy the endothelial cells. This is not the case for the perfusion at constant pressure via a column of water, since the coronary flow is abruptly increased to its maximum. Under these conditions, the coronary flow is very high. As measured with a flow gauge, it reaches values higher than 20 mL/min, which can alter endothelial cells and contribute to the progressive vasoconstriction encountered in this kind of perfusion. In our experiment, we implanted a pressure gauge near the aorta in order to measure the coronary pressure. We noticed that the coronary bed resistances did not increase during the 30-min perfusion (data not shown) as it could have been expected by the decreased coronary flow with the perfusion at constant pressure. It is likely that the perfusion at a constant flow rate of 12 mL/min preserved the endothelial cells and prevented the vasoconstriction resulting from cell damages.

However, the coronary pressures were low (45 ± 2 and 40 ± 2 mmHg for the sham and sepsis groups, respectively). In addition to maintaining the vascular cells healthy, this kind of perfusion allowed the upholding of a perfectly constant mechanical activity of the isolated heart during the 30-min perfusion, which suggests that cardiomyocytes were also maintained in healthy conditions.

Inflammation

Our results showed that cecal ligation and puncture increased the inflammatory status of the animals. It was observed in the systemic circulation through an augmented plasma level of TNF- α . Bacterial lipopolysaccharides link to Toll-like receptors (TLR) and activate the NF κ B pathway. In cultured skeletal muscle cells, high doses of lipopolysaccharides (500 pmoles/mL) elicit the expression of several inflammatory cytokines such as IL-6 and MCT-1 (Frost *et al.* 2003; Frisard *et al.* 2010); lower doses (50 pmoles/mL) stimulate glucose oxidation and inhibit fatty acid degradation without triggering the expression of proinflammatory cytokines. These last conditions lead to the accumulation of triglycerides and lactate (Frisard *et al.* 2010) in the plasma of septic subjects. In our study, it is likely that skeletal muscle inflammation occurred, since the loss of lean mass was higher in the septic group compared to the sham-operated animals. Indeed, inflammation is known to induce loss of skeletal muscle mass (Londhe and Guttridge 2015).

In the heart, we observed that the cecal ligation and puncture increased the expression of TNF- α and IL-1 β . TNF- α is the main cytokine synthesized during endotoxemia and is considered to be responsible for the expression of IL-1 β , IL-2 and IL-6 (Ferrari 1999). It has several cardio-vascular effects: at high doses, it reduces myocardial contraction through a mechanism involving an increased nitric oxide production. It also triggers hypotension, reduced systemic vascular resistances and biventricular dilatation (Sedger and McDermott 2014). The depressant effect of TNF- α on the cardiac mechanical function occurs through an inhibition of the L-type calcium channels and calcium release by the sarcoplasmic reticulum (Ferrari 1999). However, it also happens through oxidative stress and cardiomyocytes apoptosis (Tartaglia *et al.* 1993). IL-1 β is also cardio-depressant, pro-apoptotic and triggers hypertrophy (Bujak and Frangogiannis 2009). It would also play a central role in sepsis-induced contractile dysfunction.

Cardiac mechanical function

Sepsis is usually known to depress cardiac function (Hunter and Doddi 2010). In humans, changes are difficult to

estimate, since the measurements are performed in inactive patients whose cardiac activity is low. They are initiated by a decrease in diastolic function, a status that progresses toward systolic function reduction with the worsening of sepsis (Flynn *et al.* 2010). In our study, the sepsis that was performed did not deteriorate cardiac function. On the contrary, it slightly improved it. This was observed *in vivo* through an increased heart rate at similar rates of contraction and relaxation. The arterial pressures were slightly reduced by sepsis to a level which was however not significant. This could increase the heart rate and cardiac output by baroreflex resetting. However, an improved cardiac function was also noticed *ex vivo* when the heart rate of the isolated heart was fixed via electrical pacing and the stretching exerted on myocardial fibers was controlled by the latex balloon inflation and was similar for each heart. Under these circumstances, the contractility and relaxation were slightly improved. The differences did not appear when the cardiac mechanical work was low. However, the increase in coronary flow from 12 to 24 mL/min increased the cardiac work and exacerbated the sepsis-induced changes of cardiac contractility and relaxation. These results were validated by the study of the correlations between perfusion pressure and contractility (dP/dt_{max}). The correlation coefficients of the regression lines were statistically analyzed as functions of coronary flow and surgical procedure. A significant cross-interaction was observed. For the low coronary flow (12 mL/min), the regression line for the sepsis group was less steep than that for the sham-operated group. For the high coronary flow (24 mL/min), this was the contrary. The relation between the perfusion pressure and the contractility fits probably a Michaelis-Menten curve. Our results show that the curves are shifted for the sepsis and sham-operated groups. Interestingly, the curve seems to have reached a status near saturation for the sham-operated group when the coronary flow was fixed at 24 mL/min. This was not the case for the sepsis group for which the slope continued to climb abruptly. The differences might be due to the changes in coronary pressure which did not reach obviously a maximum for the septic group. It suggests that with a coronary flow set at values higher than 24 mL/min, the differences in contractility between the two groups would have been even ampler. It appears thus difficult to know whether the sepsis-induced increase in cardiac function observed in the *in vivo* situation was due only to a baroreflex resetting or to an increased intrinsic myocardial contractility. Both phenomena could be involved. However, the improved *ex vivo* cardiac function observed in our study reflects probably the fact that sepsis was of low severity.

Despite the increased cardiac mechanical work observed with sepsis at a high coronary flow, the oxygen

consumption was reduced. Yet, the differences were not sufficient to improve significantly the cardiac metabolic efficiency (rate pressure product to oxygen consumption ratio). This result is confirmed by the fact that sepsis had no effect on the correlations between perfusion pressure and metabolic efficiency. Interestingly, the sepsis-induced improvement of the cardiac mechanical function was associated with a significant reduction of the coronary perfusion pressure, suggesting the involvement of vasodilatation agents such as nitric oxide. Sepsis is known to stimulate the protein expression of the inducible form of nitric oxide (NO) synthase, which could increase cellular NO release.

The slightly improved cardiac work observed with sepsis in our study was associated with an increased inflammatory status of the circulation and heart. The high levels of TNF- α and IL-1 β mRNAs should have depressed the cardiac mechanical activity (Schulz *et al.* 1995). This was not the case. We evaluated thus the oxidative stress in plasma and heart. In plasma, the amount of protein thiol residues was not modified by sepsis. The total antioxidant defenses (FRAP) were unchanged, but the glutathione peroxidase activity was decreased, suggesting that no oxidative stress occurred. Similarly, in the heart no oxidative stress occurred, but the high GSH/GSSG ratio suggests that less reactive oxygen species (ROS) were detoxified by the glutathione peroxidase. We were not able to evaluate the ROS production directly in our study, since measurements should have been done in the beating heart. One solution in order to estimate correctly the cardiac ROS production and mechanical function in parallel would have been to determine the release of ascorbyl radicals in the coronary effluents by electronic paramagnetic resonance, as we did it in the past (Demaison *et al.* 2001). However, this technology is no longer available for us. Three different mechanisms could explain the differences: (1) a stimulation of the cardiac mechanical function at the early phase of sepsis could be responsible for the lower ROS production. Indeed, a higher energy utilization by the contractile machinery necessitates a higher ATP production, an activation of the oxidative phosphorylation and a dissipation of the $\Delta\Psi$. Yet, it is well known that the lowest the $\Delta\Psi$, the lowest the mitochondrial ROS generation; (2) a lower ROS production not related to the increased cardiac mechanical function, but due to other organelles or enzymes. Albayrak *et al.* (2011) have shown that sepsis increases cardiac catalase and myeloperoxidase activities in the ovariectomized rat. This would increase the GSH to GSSG ratio and would preserve the cellular NADPH. Indeed, re-reduction of GSSG to GSH is performed by the glutathione reductase which consumes NADPH. This would also preserve the NADH which is in equilibrium with NADPH. More NADH would thus be

available for the energy synthesis through the oxidative phosphorylation and this would allow the stimulation of cardiac mechanical function. Ávila *et al.* (2016) reported that the productions of OH[•] and H₂O₂ by isolated rat papillary muscle were increased and the contractility was reduced by increasing ferrous iron concentrations. This deleterious effect was reversed by catalase; (3) a stimulation of the NADH production through an activation of the intermediary metabolism which would feed both the oxidative phosphorylation and re-reduction of GSSG. This would explain the increased mechanical work and GSH to GSSG ratio in spite of similar or even increased ROS production. However, it would also necessitate a stimulation of the oxidative metabolism. Yet, the cardiac oxygen consumption was reduced by the sepsis in our study. The last explanation is thus not plausible. Conversely, the first two explanations are possible and we can conclude that the observed changes in cardiac function were due to a lower ROS production. However, we are unable to know if the lower ROS production was due to the stimulation of the cardiac mechanical function and $\Delta\Psi$ dissipation or to another mechanism independent of the oxidative phosphorylation. The two mechanisms could affect differently the NADH to NAD⁺ ratio. Unfortunately, we did not measure the NADH to NAD⁺ ratio in our study due to lack of biological material. Further studies in isolated mitochondria could help to better understand the observed effects.

The decreased ROS production is in complete contradiction with what is known about sepsis in the literature. Indeed, sepsis and inflammation are generally associated with oxidative stress (Huet *et al.* 2011). Septic cardiac mitochondria also display a high oxidative stress as evidenced by a low aconitase to fumarase ratio (Mason and Stofan 2008). In our study, we did not measure the protein expression of TNF- α and IL-1 β in the heart: their level could be only slightly affected and the effect of a low-intensity inflammation on this organ is not well documented. The fact that our septic heart displayed a lower ROS production despite the increased level of proinflammatory cytokine mRNAs might be due to the 40-min perfusion protocol which possibly washed out the deleterious molecules present in the systemic circulation without succeeding in clearing the excess TNF- α and IL-1 β mRNAs. The protein expression for these interleukins might be stopped by the perfusion itself. However, the increased cardiac function was also observed *in vivo*, indicating that the isolation and perfusion did not impact the behavior of the hearts. The effects on the parameters of the oxidative status also occurred in the *in vivo* situation as evidenced by the lower glutathione peroxidase activity necessary to maintain a similar oxidative stress in the plasma.

In conclusion, early sepsis triggered a slight stimulation of the cardiac mechanical function in the *in vivo* and *ex vivo* situations despite an increased inflammation status. The phenomenon was associated with a slight reduction of ROS production which can explain the vasodilatation of the coronary bed. However, our results cannot determine whether this reduced ROS production resulted from the activation of the mechanical activity and $\Delta\Psi$ dissipation or from $\Delta\Psi$ -independent superoxide generation in various organelles and enzymes. To the best of our knowledge, it is the first time that sepsis has been associated with increased inflammation and reduced ROS production. This might be due to the fact that sepsis was at its early phase in our experiment and triggered only a low- to moderate-grade inflammation. On the contrary, a more severe sepsis could further increase the inflammatory status, augment the oxidative stress and reduce the cardiac mechanical function. In any case, the effects of a low-grade inflammation on the cardiac function should be revisited in order to determine whether it can affect beneficially the oxidative stress and cardiac function.

Conflict of Interests

None declared.

References

- Albayrak, A., M. H. Uyanik, F. Odabasoglu, Z. Halici, A. Uyanik, Y. Bayir, *et al.* 2011. The effects of diabetes and/or polymicrobial sepsis on the status of antioxidant enzymes and pro-inflammatory cytokines on heart, liver, and lung of ovariectomized rats. *J. Surg. Res.* 169:67–75.
- Antonucci, E., E. Fiaccadori, K. Donadello, F. S. Taccone, F. Franchi, and S. Scolletta. 2014. Myocardial depression in sepsis: from pathogenesis to clinical manifestations and treatment. *J. Crit. Care* 29:500–511.
- Ávila, R. A., M. A. Silva, J. V. Peixoto, I. Kassouf-Silva, R. T. Fogaça, and L. Dos Santos. 2016. Mechanisms involved in the *in vitro* contractile dysfunction induced by different concentrations of ferrous iron in the rat myocardium. *Toxicol. In Vitro* 36:38–45.
- Avlas, O., R. Fallach, A. Shainberg, E. Porat, and E. Hochhauser. 2011. Toll-like receptor 4 stimulation initiates an inflammatory response that decreases cardiomyocytes contractility. *Antioxid. Redox Signal.* 15:1895–1909.
- Bujak, M., and N. G. Frangogiannis. 2009. The role of IL-1 in the pathogenesis of heart disease. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)* 57:165–176.
- Cheung, W. K., L. S. Chau, I. I. Mak, M. Y. Wong, S. L. Wong, and A. F. Tiwari. 2015. Clinical management for patients admitted to a critical care unit with severe sepsis or septic shock. *Intensive Crit. Care Nurs.* 31:359–365.

- Demaison, L., D. Moreau, C. Vergely-Vandriessse, S. Grégoire, M. Degois, and L. Rochette. 2001. Effects of dietary polyunsaturated fatty acids and hepatic steatosis on the functioning of isolated working rat heart under normoxic conditions and during post-ischemic reperfusion. *Mol. Cell Biochem.* 224:103–116.
- Ferrari, R. 1999. The role of TNF in cardiovascular disease. *Pharmacol. Res.* 40:97–105.
- Flynn, A., B. Chokkalingam Mani, and P. J. Mather. 2010. Sepsis-induced cardiomyopathy: a review of pathophysiologic mechanisms. *Heart Fail. Rev.* 15:605–611.
- Frisard, M. I., R. P. McMillan, J. Marchand, K. A. Wahlberg, Y. Wu, K. A. Voelker, et al. 2010. Toll-like receptor 4 modulates skeletal muscle substrate metabolism. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298:E988–E998.
- Frost, R. A., G. J. Nystrom, and C. H. Lang. 2003. Lipopolysaccharide and proinflammatory cytokines stimulate interleukin-6 expression in C2C12 myoblasts: role of the Jun NH2-terminal kinase. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 285:R1153–R1164.
- Hobai, I. A., J. C. Morse, D. A. Siwik, and W. S. Colucci. 2015. Lipopolysaccharide and cytokines inhibit rat cardiomyocyte contractility in vitro. *J. Surg. Res.* 193:888–901.
- Huet, O., L. Dupic, A. Harrois, and J. Duranteau. 2011. Oxidative stress and endothelial dysfunction during sepsis. *Front. Biosci. (Landmark Ed)* 16:1986–1995.
- Hunter, J. D., and M. Doddi. 2010. Sepsis and the heart. *Br. J. Anaesth.* 104:3–11.
- Lohner, R., M. Schwederski, C. Narath, J. Klein, G. D. Duerr, A. Torno, et al. 2013. Toll-like receptor 9 promotes cardiac inflammation and heart failure during polymicrobial sepsis. *Mediators Inflamm.* 2013:261049.
- Londhe, P., and D. C. Guttridge. 2015. Inflammation induced loss of skeletal muscle. *Bone* 80:131–142.
- Maier, S., T. Traeger, M. Entleutner, A. Westerholt, B. Kleist, N. Hüser, et al. 2004. Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis. *Shock* 21:505–511.
- Mason, K. E., and D. A. Stofan. 2008. Endotoxin challenge reduces aconitase activity in myocardial tissue. *Arch. Biochem. Biophys.* 469:151–156.
- Mourmoura, E., G. Vial, B. Laillet, J. P. Rigaudière, I. Hinger-Favier, H. Dubouchaud, et al. 2013. Preserved endothelium-dependent dilatation of the coronary microvasculature at the early phase of diabetes mellitus despite the increased oxidative stress and depressed cardiac mechanical function ex vivo. *Cardiovasc. Diabetol.* 12:49.
- Plitas, G., B. M. Burt, H. M. Nguyen, Z. M. Bamboat, and R. P. DeMatteo. 2008. Toll-like receptor 9 inhibition reduces mortality in polymicrobial sepsis. *J. Exp. Med.* 205:1277–1283.
- Schmid, A., J. Pugin, J. C. Chevrollet, S. Marsch, S. Ludwig, R. Stocker, et al. 2004. Burden of illness imposed by severe sepsis in Switzerland. *Swiss Med. Wkly* 134:97–102.
- Schouten, M., W. J. Wiersinga, M. Levi, and T. van der Poll. 2008. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J. Leukoc. Biol.* 83:536–545.
- Schulz, R., D. L. Panas, R. Catena, S. Moncada, P. M. Olley, and G. D. Lopaschuk. 1995. The role of nitric oxide in cardiac depression induced by interleukin-1 beta and tumour necrosis factor-alpha. *Br. J. Pharmacol.* 114:27–34.
- Sedger, L. M., and M. F. McDermott. 2014. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. *Cytokine Growth Factor Rev.* 25:453–472.
- Smeding, L., F. B. Plötz, A. B. Groeneveld, and M. C. Kneyber. 2012. Structural changes of the heart during severe sepsis or septic shock. *Shock* 37:449–456.
- Tartaglia, L. A., M. Rothe, Y. F. Hu, and D. V. Goeddel. 1993. Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signaled by the p55 TNF receptor. *Cell* 73:213–216.
- Toscano, M. G., D. Ganea, and A. M. Gamero. 2011. Cecal ligation puncture procedure. *J. Vis. Exp.* 51:2860.
- Víctor, V. M., J. V. Espulgues, A. Hernández-Mijares, and M. Rocha. 2009. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis: a potential therapy with mitochondria-targeted antioxidants. *Infect. Disord. Drug Targets* 9:376–389.

Publication n°4

Antioxidant and Cardioprotective Effects of EPA on Early Low-Severity Sepsis through UCP3 and SIRT3 Upholding of the Mitochondrial Redox Potential.

Le sepsis cause encore la mort, souvent par insuffisance cardiaque et dysfonction mitochondriale (Antonucci et al. 2014). Les AGPI ω 3 sont connus pour protéger contre le dysfonctionnement cardiaque et la létalité induits par le sepsis (Martin et Stapleton 2010). Cependant, le régime occidental présente un apport grandement insuffisant en ω 3 (Micha et al. 2014).

Cette étude visait à déterminer : i) si un sepsis précoce de faible sévérité altère la fonction mitochondriale cardiaque chez les animaux nourris avec un régime de type occidental, ii) si l'administration d'EPA protège le myocarde contre les effets délétères du sepsis, iii) puis étudier les mécanismes responsables de ces effets.

Pour cela, 40 rates Wistar ont été réparties en quatre groupes en fonction de l'opération subie et du régime alimentaire suivi pendant 4 semaines. La chirurgie est soit fictive soit consiste en une ligature cæcale à 1 cm de l'apex de l'organe suivie d'une double perforation cæcale afin de déclencher un sepsis précoce de faible sévérité. L'alimentation des rates correspond soit à un régime carencé en ω 3 afin de simuler un régime de type occidental soit à un régime enrichi en EPA. La fonction mécanique cardiaque *in vivo* a été examinée grâce à l'imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM) et des mitochondries ont été prélevées pour déterminer leur activité fonctionnelle (respiration mitochondriale, production d'ATP et libération de ROS). Le stress oxydant a été évalué ainsi que plusieurs facteurs impliqués dans la régulation du métabolisme des espèces réactives de l'oxygène.

Le sepsis induit des dysfonctionnements au niveau des mitochondries cardiaques avant l'apparition d'anomalies contractiles chez les rats nourris selon un régime de type occidental.

Ils sont caractérisés par un stress oxydant et une perturbation de la phosphorylation oxydative. L'EPA et/ou ses produits d'élongation, DPA et DHA, exercent un fort effet cardio-protecteur en maintenant la fonction mitochondriale, en inhibant ou retardant l'initiation de l'inflammation et en préservant le métabolisme énergétique. L'effet anti-inflammatoire induit par les AGPI ω 3 est dû à une moindre production des ROS mitochondriaux, probablement liée à une augmentation de l'expression de la protéine découplante UCP3 et de la déacétylase Sirt3. Ces effets se manifestent déjà dans la situation physiologique par des changements dans les expressions d'ARNm qui pré-conditionnent le myocarde. En effet, un métabolisme énergétique connu pour son aspect cardio-protecteur s'installe lors de l'ingestion chronique d'AGPI ω 3. Il correspond à une forte oxydation du glucose et à une faible β -oxydation des acides gras, reflétés par un taux d'ARNm de la PDK4 et un niveau d'acétylation de la lysine faibles. Tous ces résultats permettent d'expliquer la résistance au sepsis.

D'autres études sont donc nécessaires pour déterminer si l'administration à long terme d'AGPI ω 3 présente également des propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires. De plus, des études futures sur les mitochondries cardiaques humaines sont maintenant nécessaires pour confirmer la protection observée chez le rat au début du sepsis.

Research Article

Antioxidant and Cardioprotective Effects of EPA on Early Low-Severity Sepsis through UCP3 and SIRT3 Upholding of the Mitochondrial Redox Potential

Thibault Leger,¹ Kasra Azarnoush,^{1,2} Amidou Traoré,³ Lucie Cassagnes,⁴
Jean-Paul Rigaudière,¹ Chrystèle Jouve,¹ Guilhem Pagès,³ Damien Bouvier,⁵
Vincent Sapin ,⁵ Bruno Pereira,⁶ Jean-Marie Bonny ,³ and Luc Demaison ¹

¹Université Clermont Auvergne, INRA, UNH, Unité de Nutrition Humaine, CRNH Auvergne, 63000 Clermont-Ferrand, France

²Heart Surgery Department, Gabriel Montpied Hospital, Clermont-Ferrand University Hospital, Clermont-Ferrand, France

³INRA, QuaPA UR370, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

⁴Université Clermont Auvergne, CHU Clermont-Ferrand, CNRS, SIGMA Clermont, Institut Pascal, Clermont-Ferrand, France

⁵Department of Medical Biochemistry and Molecular Biology, CHU Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France

⁶Department of Clinical Research and Innovation, CHU Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France

Correspondence should be addressed to Luc Demaison; luc.demaison@inra.fr

Received 23 January 2019; Accepted 17 March 2019; Published 26 August 2019

Academic Editor: Vladimir Jakovljevic

Copyright © 2019 Thibault Leger et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Sepsis still causes death, often through cardiac failure and mitochondrial dysfunction. Dietary ω 3 polyunsaturated fatty acids are known to protect against cardiac dysfunction and sepsis lethality. This study set out to determine whether early low-severity sepsis alters the cardiac mitochondrial function in animals fed a Western-type diet and whether dietary eicosapentaenoic acid (EPA) administration protects the myocardium against the deleterious effects of sepsis and if so to seek possible mechanisms for its effects. Rats were divided into two groups fed either an ω 3 PUFA-deficient diet (“Western diet,” DEF group) or an EPA-enriched diet (EPA group) for 5 weeks. Each group was subdivided into two subgroups: sham-operated rats and rats subjected to cecal ligation and puncture (CLP). *In vivo* cardiac mechanical function was examined, and mitochondria were harvested to determine their functional activity. Oxidative stress was evaluated together with several factors involved in the regulation of reactive oxygen species metabolism. Sepsis had little effect on cardiac mechanical function but strongly depressed mitochondrial function in the DEF group. Conversely, dietary EPA greatly protected the mitochondria through a decreased oxidative stress of the mitochondrial matrix. The latter was probably due to an increased uncoupling protein-3 expression, already seen in the sham-operated animals. CLP rats in the EPA group also displayed increased mitochondrial sirtuin-3 protein expression that could reinforce the upholding of oxidative phosphorylation. Dietary EPA preconditioned the heart against septic damage through several modifications that protect mitochondrial integrity. This preconditioning can explain the cardioprotective effect of dietary EPA during sepsis.

1. Introduction

Sepsis, due to bacterial contamination, affects 30 million people every year and is a leading cause of lethality worldwide, with some 6 million annual deaths [1]. Owing to poorer hygiene, the incidence of sepsis is higher in low- and middle-income countries, with a particular risk for people with vulnerable immune systems (neonates, elderly persons,

pregnant women, hospitalized persons, and patients with AIDS, liver cirrhosis, cancer, kidney disease, diabetes, etc.). However, sepsis is also very frequent in industrialized countries and is a cost burden on their healthcare systems when it evolves toward septic shock [2].

Septic shock has been defined by Bone [3] as sepsis with persistent hypotension (systolic arterial pressure lower than 90 mmHg) despite adequate vascular filling, associated with

abnormal tissue perfusion (lactic acidosis, oliguria, and disturbed consciousness). It is often observed in the course of resistance to antibiotic therapy and triggers life-threatening multiorgan dysfunctions. In 2010, approximately 15% of French patients diagnosed with sepsis developed septic shock, and even though the incidence of mortality has gradually decreased with new therapeutic advances, it remains high, with a rate of 39.5% [4]. Of the survivors, 42% of patients displayed at least one comorbidity. Importantly, cardiac failure accounts for approximately 50% of deaths [5], the heart being one of the preferred targets of the infection. However, except for a stimulation of the heart rate occurring in the early phase of sepsis [6], changes in cardiac mechanical function are detected only in the sickest patients using the most recent techniques (echography, MRI): they are first characterized by an impaired diastolic function, which evolves toward a reduced systolic function in the most severe cases [7, 8].

Therapeutic approaches must be applied soon after sepsis is triggered, with little knowledge of the subsequent disease severity. Determination of cardiac function is not an accurate way to estimate illness seriousness. It would be useful to have a cardiac parameter that is rapidly affected even in low-severity sepsis; a chosen therapy could then be appraised by how efficiently it upheld this parameter in physiological ranges.

The most recent hypothesis that offered to explain the cardiac disturbances encountered in sepsis involves bacterial lipopolysaccharides. These bind to Toll-like receptors which activate the NF- κ B pathway. NF- κ B migrates to the nucleus and triggers an acute inflammatory response. The cytokines released, mainly tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β), depress mitochondrial function through a mechanism that involves severe oxidative stress and possibly calcium overload [9]. The oxidative stress inhibits energy production through suppression of the Krebs cycle aconitase [10] and reactivates the inflammatory response in a vicious cycle [11]. This leads to opening of the permeability transition pore, deenergization of the mitochondria, hypocontractility [12, 13], and cell death through apoptosis and/or necrosis [14, 15]. The mitochondria are definitely an important target in the etiology of sepsis [16].

Omega-3 (ω 3) polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are known to be cardioprotective in several pathophysiological situations including ischemia/reperfusion [17, 18], hypertrophy [19], and cardiac arrhythmias [20] through preservation of mitochondrial integrity [17, 18]. Eicosapentaenoic acid (C20:5 *n*-3 or EPA) is the best known of these [21, 22]. Omega-3 fatty acids are scant in Western diet, which is too rich in the proinflammatory ω 6 PUFAs [23]. Animal studies using ω 3 PUFA supplements clearly show that these fatty acids are protective during sepsis [24–26]. However, the mechanism of this protection is not yet properly documented and may involve the mitochondrial function.

This study set out to (i) determine whether the function of cardiac mitochondria is prematurely modified—before the occurrence of contractile dysfunctions—in early low-severity sepsis induced by cecal ligation and puncture in rats fed a Western diet, (ii) find out whether dietary eicosapenta-

enoic acid (C20:5 *n*-3 or EPA) protects the integrity of these organelles, and (iii) seek a potential mechanism responsible for observed effects. For this purpose, rats were fed either a diet deficient in ω 3 PUFAs to model a typical Western diet or one enriched with EPA. Several features of the myocardial function were assessed: *in vivo* cardiac mechanical function, mitochondrial metabolism (rates of oxygen consumption, ATP production, and reactive oxygen release), fatty acid composition of cardiac phospholipids, and several parameters related to oxidative stress and inflammation. We hypothesized that (i) early low-severity sepsis causes increased inflammation and disruption of mitochondrial integrity in rats fed the Western-type diet and (ii) dietary EPA protects cardiac mitochondria through a decreased matrix oxidative stress related to increased UCP3 and SIRT3 protein expressions.

2. Materials and Methods

2.1. Ethical Approval. All the experiments followed the European Union recommendations for the care and use of laboratory animals for experimental and scientific purposes. All the animal work was approved by the local board of ethics for animal experimentation (Comité d'éthique pour l'expérimentation animale, Auvergne) and notified to the research animal facility of our laboratory (authorization no. APAFIS#2213-2016082409264678 v2). The research complied with the ARRIVE guidelines on animal research [27].

2.2. Experimental Rats and Diet. Forty 4-month-old female Wistar rats (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France) were maintained four per cage under controlled lighting, humidity, and temperature conditions. After one week of acclimatization, the rats were randomly allocated to two diet groups for 4 weeks. Each diet contained (in % *w/w*) casein 20, L-cysteine 0.3, lipid 5, starch 42.4, maltodextrin 12.7, sucrose 10, cellulose 5, a mineral mixture 3.5, a vitamin mixture 1, and choline 0.1. The lipid fraction contained approximately 2.25% of linoleic acid (C18:2 ω 6 or LA). The fatty acid composition of the two diets is presented in Table 1. The first group of rats was fed a ω 3 PUFA-deficient diet (DEF). In the second group, 0.625% of the monounsaturated fatty acids (MUFAs) was replaced by eicosapentaenoic acid (C20:5 ω 3 or EPA) giving a ω 6/ ω 3 PUFA ratio of 3.

2.3. Surgical Procedure. After the period of feeding, each diet group was subdivided into two equal subgroups. In the first subgroup, the cecum was externalized from the abdominal cavity and immediately repositioned (Sham subgroups); in the second, the cecum was ligated and punctured to induce sepsis (Sept subgroups). The cecal ligation and puncture (CLP) was performed according to Toscano et al. [28]. Briefly, the rats were anesthetized with isoflurane (induction 4%, maintenance 2%). After fur shaving, the external abdominal wall was disinfected with alcoholic betadine and a horizontal incision was made in the ventral wall at the level of the cecum to reach the abdominal cavity. The cecum was externalized and laid on the disinfected external abdominal wall. The cecum was ligated at 1 cm from the apex of the

TABLE 1: Fatty acid composition of the diets (%).

	DEF	EPA
C14:0	0.1	0.1
C16:0	6.5	5.7
C18:0	2.7	3.0
C20:0	0.1	0.1
C24:0	0.1	0.1
SFAs	9.5	9.0
C16:1 ω 7	0.1	0.1
C18:1 ω 9	40.8	26.6
C18:1 ω 7	0.9	0.8
C20:1 ω 9	0.1	0.4
MUFAs	42.0	27.9
C18:2 ω 6	47.1	44.7
C20:2 ω 6	nd	0.2
C20:3 ω 6	nd	0.1
C20:4 ω 6	nd	0.8
ω 6 PUFAs	48.1	46.9
C18:3 ω 3	0.1	0.1
C20:4 ω 3	nd	0.4
C20:5 ω 3	nd	15.5
ω 3 PUFAs	0.1	15.6
ω 6/ ω 3	481	3

SFA: saturated fatty acid; MUFA: monounsaturated fatty acid; PUFA: polyunsaturated fatty acid; nd: not detected.

organ to trigger low-intensity sepsis. Two perforations were then made through the wall of the ligated cecum lining 0.5 cm apart on the upper face of the organ with a 20-gauge needle. Soft pressure was applied to the ligated part of the cecum to facilitate externalization of digesta on the outside of the organ. The cecum was reinserted immediately afterwards into the abdominal cavity, and buprenorphine (0.05 mg/kg of the body weight) was injected subcutaneously into the neck. The peritoneum was then closed with 6.0 silk sutures and the skin with sutures and metal clips. After the operation, anesthesia was stopped and the rats were placed one per cage in the animal facility where they woke 3–5 min after isoflurane withdrawal. The rats were then maintained in their cage for 48 h. The same diets as those given just before the surgical intervention were maintained during the postsurgery period.

To ensure that sepsis was induced, cardiac contractility was evaluated by MRI (see paragraph below). We observed that CLP tended to stimulate myocardial contractility ($p = 0.08$) similarly in both groups (cross-interaction between the effect of the diet and that of CLP = 0.99). This indicates clearly that animals of both groups were in the initial hyperdynamic phase of sepsis [6].

2.4. Cardiac MRI. At the end of the 48 h postsurgical period, *in vivo* cardiac function and morphology were assessed by nuclear magnetic resonance imaging (MRI). Anesthesia was induced in an anesthetic box using 5% isoflurane in a 30/70% air/oxygen mixture. The animals were then

positioned prone in a rat cradle (Equipement Vétérinaire Minerve, Esternay, France) and maintained at 1.5–2% isoflurane at 1 liter/minute air/oxygen flow throughout the MRI experiments. The cradle was designed for positioning of the rat in the magnet. A tooth and ear bar secure system was installed along with lines for the delivery and scavenging of anesthetic gases, temperature control, and respiratory and electrocardiogram (ECG) monitoring. Temperature was maintained using a flow of heated air through the cradle. The ECG signal was not measured during cardiac imaging but was recorded in a few animals before electrode withdrawal and positioning in the magnet to estimate the heart rate for retrospective image reconstruction.

During cardiac MRI, high-resolution cine magnetic resonance imaging (cine-MRI) was carried out with a Bruker 117/16 BioSpec instrument equipped with an 11.7 T (500 MHz) horizontal magnet interfaced with an Avance III console running Paravision 6.0 software and a shielded BGA 9S gradient (Bruker BioSpin, Ettlingen, Germany). A 72 mm inner diameter quadrature volume coil (Bruker BioSpin, Ettlingen, Germany) was used for radiofrequency (RF) transmission and MRI signal reception. The MRI protocol for assessing myocardial function was modeled on the human short-axis left ventricular (LV) framework [29]. The navigator-based self-gated fast low-angle shot (IntraGate FLASH) bright blood sequence was used for cine imaging of the heart. Ten to 12 contiguous 1 mm slices were acquired to cover the heart from the base to the apex.

For the image analysis, the navigator slice was positioned parallel to the image slice, centered to the heart and crossing the lungs to maximize its sensitivity to cardiorespiratory movements. The imaging parameters were as follows: repetition time (TR)/echo time (TE) 6/2.5 ms, flip angle (FA) 8 degrees, field of view (FOV) 5 × 5 cm, matrix 256 × 256, and slice thickness 1 mm. Four hundred repetitions were performed during acquisition of the whole raw dataset, and 16 movie frames were reconstructed using the Bruker IntraGate reconstruction algorithm, which was fed with the heart rate value (~400 bpm) recorded prior to the MRI and the mean animal respiratory frequency as estimated parameters.

Image analysis was performed using the free Segment v2.1 R5960 software [30]. Images were first converted into DICOM format before loading into Segment software for segmentation using the built-in “alternative left ventricular tool” algorithm. For each rat, end-diastolic volume (EDV) and end-systolic volume (ESV) were first identified by the global maximum and minimum left ventricle (LV) cavity volumes, respectively, to make sure that all the slices were in phase. Semiautomatic segmentation of the LV was then performed as described elsewhere [31]. Briefly, a point was first seeded in the center of the LV blood pool, from which the algorithm fits a deformable model that expands toward the endocardial border to include the LV blood pool across the various short-axis slices. Manual adjustments were performed as required afterward mainly for the epicardial border in general and for the endocardial border where the papillary muscles appear separated from the myocardium. Stroke volume (SV = EDV – ESV), ejection fraction (EF = SV/EDV), and cardiac output (CO = SV × heart rate)

were calculated from the end-diastolic and end-systolic volumes. The EDV time curve was then used to derive the contraction and relaxation rates.

2.5. Preparation of Isolated Mitochondria. At the end of the cardiac MRI, about 200 mg of the apical heart was freeze clamped in liquid nitrogen and stored at -80°C for later analysis. The mitochondria were extracted as previously described [17]. Atria and the remaining aorta were cut off from the heart. The myocardium was shredded with scissors in a cold isolation buffer A composed of mannitol 220 mM, sucrose 70 mM, MOPS 5 mM, and EGTA 2 mM, pH 7.4 at 4°C , fatty acid-free serum albumin 0.2%. The shreds of the myocardium were rinsed several times on a filter and homogenized with a Polytron blender (0.4 s, rheostat = 3) and a Potter-Elvehjem tissue grinder containing 15 ml of isolation buffer A. After centrifuging ($800 \times g$, 10 min, 4°C), the supernatant with subsarcolemmal mitochondria was kept in ice. The pellet was resuspended in a cold isolation buffer B composed of KCl 100 mM, MOPS 50 mM, and EGTA 2 mM, pH 7.4 at 4°C , fatty acid-free serum albumin 0.2%. A protease (subtilisin 0.02%) was added for 1 min to digest myofibrils at ice temperature, and the whole was then homogenized with a tissue grinder (300 rpm, 3 to 4 transitions). Immediately afterward, subtilisin action was stopped by adding isolation buffer (30 ml) and centrifuging ($8000 \times g$, 10 min, 4°C). The supernatant was discarded and the pellet was resuspended in isolation buffer B. The homogenate was then centrifuged ($800 \times g$, 10 min, 4°C), and the resulting supernatant with intermyofibrillar mitochondria was collected and filtered with the other supernatant. Mitochondria were then washed by centrifuging ($8000 \times g$, 10 min, 4°C). The pellet of mitochondria was suspended in cold isolation buffer C composed of KCl 100 mM, MOPS 50 mM, and EGTA 1 mM, pH 7.4 at 4°C , recentrifuged ($8000 \times g$, 10 min, 4°C), and finally resuspended at a concentration of approx. 15 mg/ml.

2.6. Respiration Measurements. The rate of mitochondrial oxygen consumption was measured at 30°C in an incubation chamber (Oxytherm OXYT1, Hansatech, King's Lynn, England) with a Clark-type O_2 electrode filled with 1 ml of incubation medium (KCl 125 mM, Tris-HCl 20 mM, KH_2PO_4 10 mM, and EGTA 1 mM, pH 7.2 at 30°C , fatty acid-free bovine serum albumin 0.15%). All measurements were made using mitochondria (0.2 mg of mitochondrial protein/ml) incubated with either glutamate (5.5 mM)-malate (2.5 mM), palmitoylcarnitine (20 μM)-malate (2.5 mM), or succinate (5.5 mM)-rotenone (2 μM) as substrates (state 2), in the presence of ADP 100 mM (state 3) and afterwards with the addition of oligomycin 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (state 4). The pH of each substrate was strictly fixed at 7.4 at 30°C . The incubation medium was maintained at 30°C and constantly stirred with a built-in electromagnetic stirrer and bar flea. Coupling of the oxidative phosphorylation was assessed by the state 3 to state 4 respiration rate ratio, which measures the degree of control exerted on oxidation by phosphorylation (respiratory control ratio or RCR). Amplex[®] Red (1 μM) and horseradish peroxidase (5 U/ml) were added to the medium at the

beginning of the respiration measurement to maintain the same experimental conditions as those used in the measurement of H_2O_2 release.

2.7. Mitochondrial Reactive Oxygen Species Release. The rate of mitochondrial reactive oxygen species release was evaluated in the same conditions as the respiration measurements. It followed the linear increase in fluorescence (excitation at 560 nm and emission at 584 nm) due to enzymatic oxidation of Amplex[®] Red by H_2O_2 in the presence of horseradish peroxidase modified to kinetically follow the rate of production of reactive oxygen species by isolated mitochondria on a fluorometer (Xenius XC, SAFAS, Monaco). Reaction conditions were 0.20 mg of mitochondrial protein/ml, 5 U/ml of horseradish peroxidase, and 1 μM of Amplex[®] Red with the same substrates and concentrations as in the respiration measurements.

2.8. Gene Expression. Total RNA was extracted from 50 mg of heart powder using TRIzol[®] (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions. Chloroform was added (0.2 ml/ml of TRIzol[®]), and samples were mixed and centrifuged for 15 min at $12000 \times g$ at 4°C . An aqueous phase containing ribonucleic acid (RNA) was collected, mixed with isopropanol to precipitate RNA, and centrifuged ($12000 \times g$, 4°C , 15 min). After centrifuging, the pellet was washed with ethanol 70% (vol/vol), dried, and suspended in water. RNA quantification and integrity were verified by measuring the ratio of optical densities at 260 nm and 280 nm and by agarose gel migration, respectively. cDNAs were synthesized from 2 μg of total RNA using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit from Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific, Asnières-sur-Seine, France). The products of reverse transcription were used for quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) using specific primers and Rotor-Gene SYBR Green PCR master mix on a Rotor-Gene Q system (QIAGEN, Courtaboeuf, France). Messenger RNA (mRNA) was quantified using the standard curve of native cDNA and serial dilutions. The cardiac mRNA expressions were determined for hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1), sirtuin-3 (SIRT3), cytosolic Cu-Zn superoxide dismutase (SOD1), mitochondrial manganese-dependent superoxide dismutase (SOD2), interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), hexokinase 2 (HK2), phosphofructokinase-2 (PFK2), pyruvate kinase muscle-type (PKm), M and H lactate dehydrogenases (LDH M and H), and pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4). Primer sequences and PCR conditions are presented in Table 2. Some housekeeping genes were tested (β -actin and hypoxanthine phosphoribosyltransferase); β -actin was finally chosen for its intergroup stability.

2.9. Western Blot Analysis. Tissues were ground three times in a mini bead beater in the presence of a lysis buffer made of HEPES 50 mM, sodium chloride 150 mM, EDTA 10 mM, anhydrous sodium tetrabasic pyrophosphate 10 mM, β -glycerophosphate 25 mM, sodium fluoride 100 mM, and anhydrous glycerol 1.086 M supplemented with phosphatase inhibitors (Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France).

TABLE 2: Real-time PCR primers used in this study.

Gene	Sequence (5'-3')
β -Actin	(F) TCTGTGTGGATTGGTGGCTCTA (R) CTGCTTGCTGATCCACATCTG
HIF-1	(F) AAGCACTAGACAAAGCTCACCTG (R) TTGACCATATCGCTGTCCAC
HK2	(F) GAGCTACCACGCACCCTAC (R) CACCCTTACTCGGAGCACAC
HPRT	(F) TTGCTGACCTGCTGGATTAC (R) AGTTGAGAGATCATCTCCAC
IL-1 β	(F) CACCTTCTTTTCCTTCATCTTTG (R) GTCGTTGCTTGTCTCTCCTTGTA
LDHH	(F) ACCCCGTGTCTACAATGGTG (R) GGTTGATGACGCTGGTCAGT
LDHM	(F) TGAAGTCTCTGAACCCGCAG (R) CGTATGCACTGTCAACCACC
PKD4	(F) CACACCTTACCACATGCTC (R) CGTGAATTGTCCATCACAGG
PFK2	(F) TTGCGAGGAAAGCAGTTTGC (R) ACACGCCAGCATCAATCTCA
PKm	(F) GTCAATCCACAGACCCCTG (R) CCACTTGGTGAGCACTCCTG
SIRT3	(F) TGCTACTCATTCTTGGGACCTC (R) CTGTACCGATTGAGACAAGCTG
SOD1	(F) CAGGACCTCATTTTAATCCTCAC (R) TGCCAGGTCTCCAACAT
SOD2	(F) CCGAGGAGAAGTACCACGAG (R) GCTTGATAGCCTCCAGCAAC
TNF- α	(F) GCCTCTTCTCATTCTCTGCTC (R) GAGCCATTGGGAACCTTCT

(F): forward; (R): reverse.

Successive centrifugations were performed and the supernatants were collected. Proteins were quantified using a bicinchoninic acid assay kit (Thermo Fisher Scientific, Asnières-sur-Seine, France). For protein immunoblotting, 25 μ g of proteins was loaded for separation by SDS-PAGE electrophoresis and transferred on PVDF membranes. Membranes were then immunoblotted with the appropriate antibody to detect the nuclear factor of the kappa light polypeptide gene enhancer in B-cell inhibitor alpha (1κ B α) (1:1000, Cell Signaling #9242), voltage-dependent anion-selective channel (VDAC) (1:1000, Cell Signaling #4866), sirtuin-3 (SIRT3) (1:500, Santa Cruz #sc-365175), uncoupling protein-3 (UCP3) (1:200, Santa Cruz #sc-31387), nitrosylated tyrosine (1:1000, Thermo Scientific #32-1900), acetylated lysine (1:1000, Cell Signaling #9441), and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 α) (1:5000, Santa Cruz #sc-13067). Antibody binding was detected using HRP-conjugated secondary antibodies and ECL Western blotting substrate (Thermo Fisher Scientific, Asnières-sur-Seine, France). Immunoblots were visualized using a chemiluminescence imaging system (MF-ChemiBIS, DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalem, Israel) and quantified using Multi Gauge V3.2 software. For detection of nitrosylated proteins, protein extraction was performed according to the manufacturer's instructions. Several

housekeeping proteins including α -tubulin (1:1000, Sigma #8203) and GAPDH (0.2 μ g/ml, Sigma #G9545) were tested, but none was stable across the four subgroups. However, protein densitometry to Ponceau red was stable. It was thus decided to normalize all the relevant proteins with this parameter.

2.10. Lipid Analysis. Total lipids were extracted from cardiac tissues according to Folch et al. [32]. Lipid extracts (approx. 50 mg) were prepared using 4 ml chloroform-methanol (2:1 v/v) and 1 ml 0.9% NaCl. After phospholipid separation on Sep-Pak cartridges, fatty acid methyl esters were prepared and separated by gas chromatography as previously described [33].

2.11. Cardiac Oxidative Stress. Mitochondrial SOD was assayed using a commercially available kit (Bertin Pharma, Montigny-le-Bretonneux, France).

2.12. Statistical Analysis. Results are presented as mean \pm SEM. The data underwent a two-way analysis of variance (ANOVA) describing the effects of the diets and of sepsis and the cross-interaction between them. When necessary, the means were compared using Fisher's least significant difference (LSD) test. A probability lower than 0.05 was considered significant. Statistical analysis was performed using the NCSS 2007 software (NCSS LLC, Kaysville, UT).

3. Results

3.1. General Data. The body weights of the animals before surgery were similar in the four subgroups (243 \pm 5, 245 \pm 7, 266 \pm 7, and 250 \pm 7 g for the DEF Sham, DEF Sept, EPA Sham, and EPA Sept, respectively). The surgery tended to decrease these variables, but the observed changes were not significant (data not shown). Since a large part of the myocardium was used for mitochondrial preparation, the heart weights of these rats were not determined.

3.2. Fatty Acid Composition of Cardiac Phospholipids. The fatty acid composition of membrane phospholipids plays a crucial role in the regulation of cardiac and mitochondrial function because of not only its involvement in prostanoid synthesis but also its engagement in the modulation of enzymatic activities through changes in membrane fluidity.

The EPA-rich diet did not notably modify the proportions of saturated fats in cardiac membranes (Table 3), but it decreased those of the monounsaturated fatty acid C18:1 ω 9 (-22% and -16% in the Sham and Sept subgroups, $p < 0.001$). Although the proportions of total PUFAs were unchanged, their profile was considerably altered by the diets. PUFAs of the ω 6 series were reduced by the EPA-rich diet (-19% and -22% for the Sham and Sept subgroups, $p < 0.001$), and those of the ω 3 family were correspondingly increased (+124 and +145%, $p < 0.001$). Arachidonic acid (ArA or C20:4 ω 6) and its first metabolites (C22:4 ω 6 and C22:5 ω 6) were thus decreased, and EPA, C22:5 ω 3, and C22:6 ω 3 were greatly increased ($p < 0.001$ for all the comparisons).

TABLE 3: Fatty acid composition of cardiac phospholipids.

Fatty acid	DEF Sham	DEF Sept	EPA Sham	EPA Sept
C14:0	0.13 ± 0.03	0.11 ± 0.02	0.12 ± 0.01	0.10 ± 0.01
C15:0	0.15 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.14 ± 0.01	0.13 ± 0.02
C16:0	10.3 ± 0.2 ^b	10.2 ± 0.4 ^b	10.7 ± 0.4 ^{ab}	11.2 ± 0.1 ^a
C17:0	0.18 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.18 ± 0.01
C18:0	22.3 ± 0.2	22.4 ± 0.1	22.2 ± 0.3	21.9 ± 0.1
C20:0	0.16 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.16 ± 0.01
C22:0	0.27 ± 0.01	0.28 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.26 ± 0.02
C24:0	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01
SFA	33.7 ± 0.3	33.7 ± 0.4	34.0 ± 0.2	34.2 ± 0.2
C16:1 ω7	0.20 ± 0.01	0.23 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.23 ± 0.01
C18:1 ω9	4.1 ± 0.2 ^a	3.7 ± 0.1 ^a	3.2 ± 0.1 ^b	3.1 ± 0.2 ^b
C18:1 ω7	2.8 ± 0.1	2.9 ± 0.1	2.6 ± 0.1	2.6 ± 0.1
<i>trans</i> -MUFA	0.18 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.19 ± 0.01
C22:1 ω9	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1
MUFA	7.6 ± 0.1 ^a	7.3 ± 0.2 ^a	6.7 ± 0.3 ^b	6.4 ± 0.2 ^b
C18:2 ω6	17.6 ± 0.5 ^{ab}	17.4 ± 0.6 ^a	19.0 ± 0.3 ^b	18.5 ± 0.6 ^{ab}
C20:2 ω6	0.18 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.16 ± 0.01
C20:3 ω6	0.25 ± 0.01 ^a	0.27 ± 0.01 ^a	0.32 ± 0.01 ^b	0.32 ± 0.01 ^b
C20:4 ω6	22.5 ± 0.5 ^a	23.3 ± 0.5 ^a	18.6 ± 0.8 ^b	17.3 ± 0.3 ^b
C22:4 ω6	1.86 ± 0.08 ^a	1.68 ± 0.05 ^b	0.29 ± 0.02 ^c	0.33 ± 0.02 ^c
C22:5 ω6	5.1 ± 0.3 ^a	4.6 ± 0.2 ^b	0.2 ± 0.1 ^c	0.1 ± 0.1 ^c
ω6 PUFA	47.4 ± 0.6 ^a	47.3 ± 0.7 ^a	38.6 ± 0.8 ^b	36.7 ± 0.4 ^b
C18:4 ω3	0.08 ± 0.02 ^a	0.14 ± 0.01 ^b	0.11 ± 0.01 ^{ab}	0.12 ± 0.02 ^{ab}
C20:5 ω3	nd ^a	nd ^a	0.79 ± 0.08 ^b	0.77 ± 0.04 ^b
C22:5 ω3	0.7 ± 0.1 ^a	0.7 ± 0.1 ^a	4.3 ± 0.3 ^b	4.6 ± 0.1 ^b
C22:6 ω3	6.6 ± 0.6 ^a	6.6 ± 0.4 ^a	11.4 ± 0.4 ^b	12.9 ± 0.6 ^c
ω3 PUFA	7.4 ± 0.6 ^a	7.5 ± 0.4 ^a	16.6 ± 0.6 ^b	18.4 ± 0.5 ^c
Total PUFA	54.8 ± 0.2	54.9 ± 0.4	55.2 ± 0.4	55.1 ± 0.3
ω6/ω3	6.6 ± 0.7 ^a	6.4 ± 0.4 ^a	2.4 ± 0.1 ^b	2.0 ± 0.1 ^b

The means correspond to the average of 5 rats. DEF Sham: rats fed the ω3 fatty acid-deficient diet with fictitious surgery; DEF Sept: rats fed the ω3 fatty acid-deficient diet with cecal ligation and puncture; EPA Sham: rats fed the EPA-rich diet with fictitious surgery; EPA Sept: rats fed the EPA-rich diet with cecal ligation and puncture; SFA: saturated fatty acids, MUFA: monounsaturated fatty acids; PUFA: polyunsaturated fatty acids; nd: not detected; a, b: means without a common letter on each line are significantly different.

Sepsis triggered certain modifications of the phospholipid fatty acid profile that affected only PUFAs. In the DEF group, the infectious disease reduced the first metabolites of ArA (−10% and −10% for C22:4ω6 and C22:5ω6, $p < 0.05$). In the EPA group, the pathology increased the proportion of total ω3 PUFAs, mainly C22:6ω3 (+11 and +13%, $p < 0.05$).

3.3. Sepsis-Induced Myocardial Inflammation. Bacterial lipopolysaccharides link to Toll-like receptors and activate the NF-κB pathway. This activation is characterized by the release and degradation of IκBα as well as migration of the

NF-κB moiety to the nucleus and induction of the proinflammatory cytokine expression. The reduction of IκBα was determined in the myocardial tissues of the four subgroups of animals (Figure 1(c)). Dietary EPA did not alter its value in sham-operated animals but increased it after sepsis (+103%, $p < 0.001$) compared to Sept animals fed the DEF diet.

Figure 1 also depicts the effects of dietary EPA and sepsis on cardiac TNF-α and IL-1β mRNA expressions. Gene expression of TNF-α (Figure 1(d)) was not affected by sepsis but depended on the dietary PUFA ingested: it was significantly decreased by dietary EPA (−33% and −56% in the

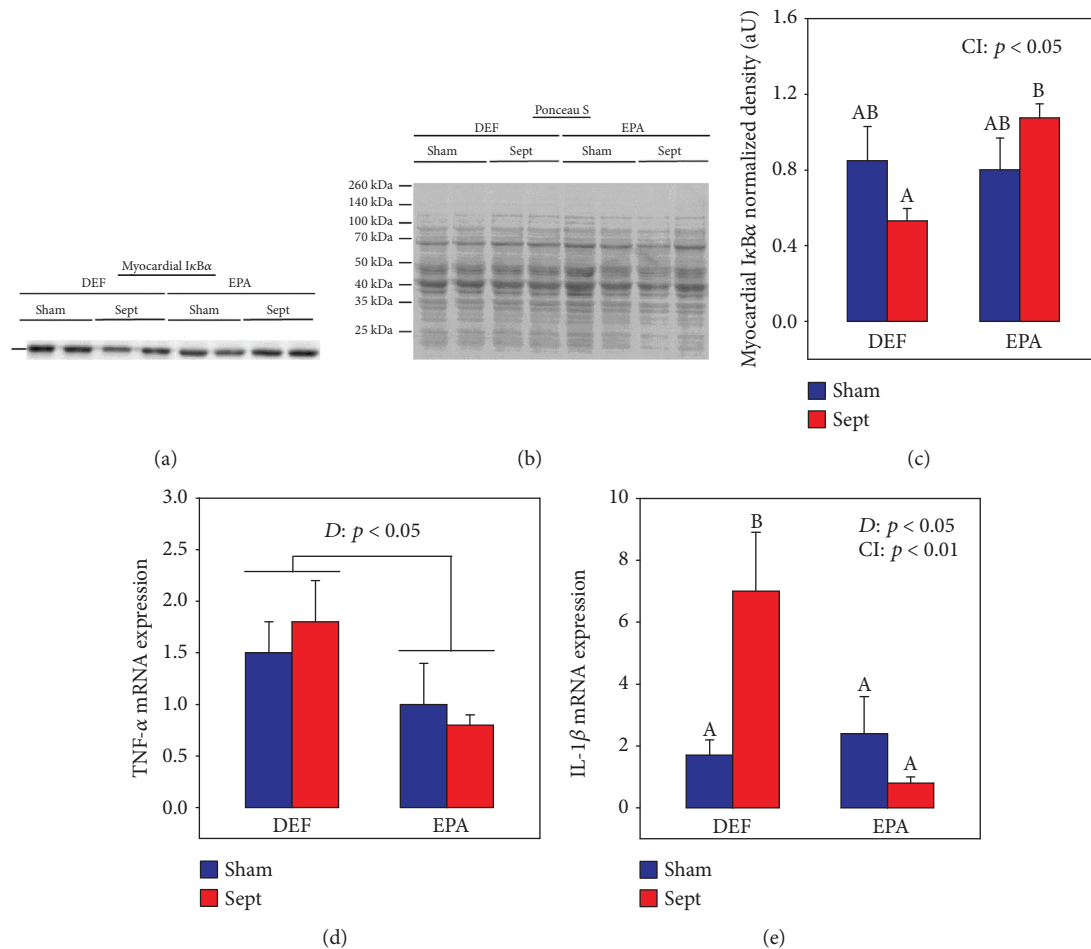


FIGURE 1: Cardiac inflammation parameters: (a) representative immunoblots of myocardial IκBα; (b) protein densitometry to Ponceau S of the corresponding samples; (c) quantification of myocardial IκBα; (d) TNF-α mRNA expression; (e) IL-1β mRNA expression. The means are a consortium of 8 rats 48 h after the surgery. DEF: rats fed the ω3 polyunsaturated fatty acid-deficient diet; EPA: rats fed the eicosapentaenoic acid-enriched diet; Sham: sham-operated rats; Sept: septic rats; D: diet effect; CI: cross-interaction between the effect of the diet and that of sepsis; A, B: histogram bars on the same panel without a common letter are significantly different.

Sham and Sept subgroups, $p < 0.05$ in general). IL-1β mRNA expression (Figure 1(e)) behaved differently: it was considerably increased by CLP in the DEF group (+530%, $p < 0.01$), but not at all in the EPA group (−67%, NS, CI: $p < 0.01$).

3.4. MRI Study. The *in vivo* cardiac morphology and function were determined by MRI (Table 4) to know whether these parameters were sensitive enough to the effects of the early low-severity sepsis and EPA treatment. Cardiac morphology estimated by the end-diastolic and end-systolic volumes was minimally affected by the diets and surgery. This was also the case for the cardiac function parameters, including ejection fraction, heart rate, cardiac output, and relaxation. However, an interesting tendency was noted for contraction: sepsis tended to increase the contraction rate in both diet groups (+14% and +13% for the DEF and EPA groups, $p = 0.085$): no diet effect was noted, however.

3.5. Mitochondrial Function. Cardiac mitochondria were immediately harvested after sacrifice to evaluate their energy

metabolism and reactive oxygen species release (Table 5) to determine whether the function of these organelles was modified by sepsis and dietary EPA. The main modifications were observed when glutamate/malate was used as substrate. In the DEF groups, sepsis reduced the state 3 respiration rate (−42%, $p < 0.01$), respiratory control ratio (RCR) (−31%, $p < 0.01$), and rate of ATP production (−37%, $p < 0.05$). Although the basal rates of H₂O₂ release during states 3 and 4 of the respiration were unchanged, the ratios of H₂O₂ release to the state 3 respiration rate and of H₂O₂ release to the rate of ATP production were greatly increased by sepsis (+70 and +128%, respectively, $p < 0.05$). Interestingly, none of these parameters (state 3 respiration rate, RCR, H₂O₂ release/state 3 respiration rate, and H₂O₂ release/rate of ATP production) were altered by sepsis in the EPA-fed rats.

When succinate/rotenone or palmitoylcarnitine/malate was used as substrates, the same trends were observed for the rates of state 3 respiration and ATP production but the differences were not significant. However, for the H₂O₂

TABLE 4: *In vivo* cardiac morphology and function.

	DEF Sham	DEF Sept	EPA Sham	EPA Sept	ANOVA
EDV	298 ± 26	326 ± 20	347 ± 27	306 ± 20	
ESV	92 ± 8	113 ± 8	119 ± 15	95 ± 9	CI: $p < 0.05$
SEV	194 ± 16	231 ± 13	228 ± 16	211 ± 14	
EF	65 ± 2	65 ± 4	66 ± 3	69 ± 2	
HR	371 ± 6	366 ± 12	355 ± 7	374 ± 8	
CO	229 ± 6	217 ± 24	227 ± 7	236 ± 11	
CR	0.22 ± 0.02	0.25 ± 0.01	0.23 ± 0.02	0.26 ± 0.02	S: $p = 0.085$
RR	0.18 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.19 ± 0.02	0.19 ± 0.02	

The means represent the average of 8 rats. DEF Sham: rats fed the $\omega 3$ fatty acid-deficient diet with fictitious surgery; DEF Sept: rats fed the $\omega 3$ fatty acid-deficient diet with cecal ligation and puncture; EPA Sham: rats fed the EPA-rich diet with fictitious surgery; EPA Sept: rats fed the EPA-rich diet with cecal ligation and puncture; EDV: end-diastolic volume (μ l); ESV: end-systolic volume (μ l); SEV: systolic ejection volume (μ l/beat); EF: ejection fraction (%); HR: heart rate (beats/min); CO: cardiac output (ml/min/g of wet weight); CR: contraction rate (cm^2/s); RR: rate of relaxation (cm^2/s); ANOVA: analysis of variance. The two-way analysis of variance describes the effects of the diets, those of sepsis (S), and the cross-interaction between these two factors (CI).

release normalized to the rates of state 3 respiration or ATP production, the differences generally remained significant like those observed with glutamate/malate as substrates.

3.6. Glycolytic Enzyme mRNA Expressions. High glucose oxidation and low fatty acid degradation are often associated with a cardioprotective metabolic profile [34, 35]. Table 6 summarizes the mRNA expression of several glycolytic enzymes in order to estimate glucose metabolism. Sham-operated rats fed the different diets had the same glycolytic enzyme mRNA expressions except for that of pyruvate kinase, which was reduced by the EPA diet (-30% , $p < 0.05$ by one-way analysis of variance). Pyruvate dehydrogenase kinase 4 gene expression was also decreased by the EPA diet (-62% , $p < 0.05$ by one-way analysis of variance). Sepsis had little effect on the glycolytic enzyme mRNA expression in the DEF diet-fed rats: it tended only to increase the hexokinase 2 gene expression ($+41\%$, $p = 0.058$ by one-way analysis of variance). Conversely, it strongly decreased the expression of several enzymes in the EPA diet-fed rats: phosphofructokinase 2 (-41% , $p < 0.05$), pyruvate kinase (-61% , $p < 0.01$), and muscle (-37% , $p < 0.01$) and cardiac (-60% , $p < 0.01$) lactate dehydrogenases. The hexokinase 2 and pyruvate dehydrogenase kinase 4 mRNA expressions were also decreased (-50% and 77% , respectively, $p < 0.01$ by one-way analysis of variance). Mitochondrial acetylated lysine reflects the rate of β -oxidation [36]. In sham-operated animals, acetylated lysine expression (Figure 2) was decreased by dietary EPA (-66% , $p < 0.001$). Sepsis reduced lysine acetylation in the DEF group (-48% , $p < 0.01$) but increased it in the EPA group ($+102\%$, $p < 0.05$).

3.7. Oxidative and Nitrosative Stresses. The oxidative stress was further evaluated in the whole myocardium by determining SOD mRNA expressions. The cytosolic SOD1 (Figure 3(a)) was increased in the EPA subgroups ($+58$ and $+54\%$ for the Sham and Sept subgroups, $p < 0.05$ in general) compared with the DEF subgroups but was not affected by sepsis. By contrast, the gene expression of the mitochondrial SOD 2 (Figure 3(b)) was reduced by the

EPA-rich diet (-59% , $p < 0.001$) but this was significant only in the Sept subgroup (-76% , $p < 0.001$). This parameter was not affected by sepsis in the DEF group. The total mitochondrial SOD activity (Figure 3(c)) was not influenced by the diets but was increased by sepsis ($+19\%$ for the DEF plus EPA groups, $p < 0.05$).

Nitrosylation intensity of mitochondrial proteins is presented in Figure 4. Sham-operated animals of the EPA group displayed a lower degree of nitrosylation (-55% , $p < 0.05$) than their counterparts fed the DEF diet. Sepsis reduced this parameter in the DEF group (-26%) but increased it in the EPA group ($+51\%$, CI: $p < 0.001$). Finally, septic rats in the EPA diet group displayed a higher degree of mitochondrial protein nitrosylation ($+54\%$, $p < 0.01$) than the DEF-fed rats.

3.8. HIF-1 and SIRT-3 Gene Expressions. Reactive oxygen species (ROS) in the mitochondrial matrix are known to regulate the expressions of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and sirtuin-3 (SIRT3) [37]. Since mitochondria of the DEF group seemed to overproduce ROS, the gene expressions of these two proteins were thus evaluated in the whole myocardium. HIF-1 mRNA expression (Figure 5(a)) was affected by both the diet and the type of surgery. The presence of EPA in the diet strongly reduced the gene expression of this parameter (-40% and -44% for the Sham and Sept subgroups, $p < 0.01$). Sepsis had also a lowering effect (-29% and -33% for the DEF and EPA groups, $p < 0.05$).

SIRT3 mRNA expression (Figure 5(b)) evolved differently with an increasing effect of dietary EPA ($+61$ and $+51\%$ for the Sham and Sept subgroups, $p < 0.05$) and no significant influence of sepsis.

3.9. Mitochondrial Uncoupling Protein-3 (UCP3), Sirtuin-3 (SIRT3), and Myocardial Voltage-Dependent Anion Channel (VDAC) Expressions. UCP3 is known to modulate mitochondrial oxidative and nitrosative stresses [38]. Figure 6(c) shows UCP3 expression in the mitochondria. Dietary EPA greatly increased the expression of this protein irrespective of the surgery ($+207\%$, $p < 0.05$). Sepsis did not influence the expression of this protein.

TABLE 5: Mitochondrial function.

Substrate	Parameter	DEF Sham	DEF Sept	EPA Sham	EPA Sept
GM	State 3	84 ± 7 ^a	49 ± 7 ^b	67 ± 5 ^{ab}	87 ± 6 ^a
	State 4	13 ± 1 ^a	10 ± 1 ^a	11 ± 1 ^{ab}	15 ± 1 ^a
	RCR	6.5 ± 0.2 ^a	4.5 ± 0.5 ^b	6.3 ± 0.2 ^a	6.0 ± 0.1 ^a
	ATP	379 ± 49 ^a	239 ± 58 ^b	411 ± 47 ^a	416 ± 35 ^a
	ATP/O	2.3 ± 0.2	2.6 ± 0.6	3.1 ± 0.3	2.4 ± 0.2
	ROS state 3	81 ± 5	87 ± 7	79 ± 9	80 ± 7
	ROS state 4	113 ± 7	123 ± 12	126 ± 18	119 ± 14
	ROS/state 3	1.0 ± 0.1 ^a	1.7 ± 0.2 ^b	1.1 ± 0.2 ^a	0.9 ± 0.1 ^a
	ROS/state 4	9.7 ± 0.9 ^{ab}	12.6 ± 2.1 ^a	10.8 ± 0.8 ^{ab}	8.4 ± 1.0 ^b
	ROS/ATP	0.25 ± 0.04 ^a	0.57 ± 0.18 ^b	0.21 ± 0.03 ^a	0.20 ± 0.03 ^a
SR	State 3	129 ± 13	101 ± 13	120 ± 12	137 ± 16
	State 4	52 ± 3	46 ± 4	49 ± 3	46 ± 2
	RCR	2.5 ± 0.1	2.2 ± 0.1	2.5 ± 0.1	2.7 ± 0.2
	ATP	293 ± 42 ^{ab}	208 ± 33 ^b	321 ± 21 ^a	290 ± 19 ^{ab}
	ATP/O	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.2 ± 0.1
	ROS state 3	139 ± 6	146 ± 6	140 ± 6	143 ± 8
	ROS state 4	174 ± 7	175 ± 11	173 ± 10	181 ± 15
	ROS/state 3	1.2 ± 0.1 ^a	1.6 ± 0.2 ^b	1.2 ± 0.1 ^a	1.1 ± 0.1 ^a
	ROS/state 4	3.4 ± 0.2	3.9 ± 0.3	3.4 ± 0.1	3.3 ± 0.1
	ROS/ATP	0.60 ± 0.13 ^{ab}	0.82 ± 0.13 ^a	0.44 ± 0.03 ^b	0.48 ± 0.02 ^b
PM	State 3	111 ± 10	93 ± 14	124 ± 14	129 ± 15
	State 4	12 ± 1	11 ± 2	10 ± 1	11 ± 1
	RCR	9.1 ± 0.4 ^a	8.6 ± 0.9 ^a	13 ± 1 ^b	12 ± 1 ^b
	ATP	616 ± 69	507 ± 103	621 ± 68	656 ± 46
	ATP/O	2.6 ± 0.2	2.6 ± 0.3	2.6 ± 0.35	2.73 ± 0.2
	ROS state 3	56 ± 5	57 ± 7	64 ± 11	59 ± 8
	ROS state 4	90 ± 9	88 ± 11	98 ± 17	82 ± 8
	ROS/state 3	0.5 ± 0.1 ^a	0.7 ± 0.1 ^b	0.5 ± 0.1 ^a	0.5 ± 0.1 ^a
	ROS/state 4	7.6 ± 0.8	8.3 ± 1.0	9.8 ± 1.2	8.2 ± 0.9
	ROS/ATP	0.10 ± 0.02 ^{ab}	0.14 ± 0.03 ^c	0.10 ± 0.01 ^{ac}	0.09 ± 0.01 ^{ab}

The means correspond to the average of 8 animals. DEF Sham: animals fed the ω 3 fatty acid-deficient diet with the fictitious surgery; DEF Sept: animals fed the ω 3 fatty acid-deficient diet with the cecal ligation and puncture; EPA Sham: animals fed the EPA-rich diet with the fictitious surgery; EPA Sept: animals fed the EPA-rich diet with the cecal ligation and puncture; GM: glutamate/malate; SR: succinate/rotenone; PM: palmitoylecarnitine/malate; state 3: state 3 respiration rate (nmoles O₂/min/mg of proteins); state 4: state 4 respiration rate (nmoles O₂/min/mg of proteins); RCR: respiratory control ratio; ATP: rate of ATP production (nmoles of ATP/min/mg of proteins); ATP : O: ratio between the production of ATP and the state 3 respiration rate (nmoles of ATP/nmoles of O₂); ROS state 3 and ROS state 4: H₂O₂ release during the state 3 and state 4 respirations (pmoles/min/mg of proteins); ROS/state 3: ratio between H₂O₂ release during state 3 and oxygen consumption during state 3 (pmoles of H₂O₂/nmoles of O₂); ROS/state 4: ratio between H₂O₂ release during state 4 and oxygen consumption during state 4 (pmoles of H₂O₂/nmoles of O₂); ROS/ATP: ratio between H₂O₂ release during state 3 and rate of ATP production (pmoles of H₂O₂/nmole of ATP); a, b, c: means without a common letter for the same parameter are significantly different.

Mitochondrial sirtuin-3 protein expression (Figure 6(f)) was influenced by the diet and type of surgery. In the sham-operated subgroups, its content was lower when the diet was enriched with EPA (−39%, $p < 0.05$). Sepsis induced opposite effects on this parameter according to the dietary conditions (CI: $p < 0.05$). To examine this significant cross-interaction more closely, a one-way analysis of variance

describing the effect of sepsis was performed in each dietary group: in the DEF group, the effect of sepsis was not significant (−25%, NS), but in the EPA group, sepsis significantly increased the amount of the protein (+60%, $p < 0.05$).

The myocardial content of mitochondria was evaluated by estimating the protein content of the mitochondrial voltage-dependent anion channel (VDAC) in the whole

TABLE 6: Glycolytic enzyme mRNA expressions in the myocardium.

	DEF Sham	DEF Sept	EPA Sham	EPA Sept	ANOVA
HK2	1.20 ± 0.12 ^{ab}	1.69 ± 0.22 ^a	1.03 ± 0.15 ^{ab}	0.52 ± 0.05 ^b	<i>D</i> : $p < 0.001$ <i>CI</i> : $p < 0.01$
PFK2	2.36 ± 0.28 ^a	1.97 ± 0.22 ^{ab}	2.35 ± 0.27 ^a	1.38 ± 0.24 ^b	<i>S</i> : $p < 0.05$
PKm	0.94 ± 0.07 ^a	0.80 ± 0.11 ^{ab}	0.66 ± 0.10 ^b	0.26 ± 0.03 ^c	<i>D</i> : $p < 0.001$ <i>S</i> : $p < 0.01$
LDHM	0.91 ± 0.02 ^a	0.98 ± 0.16 ^a	0.87 ± 0.07 ^a	0.55 ± 0.05 ^b	<i>D</i> : $p < 0.05$
LDHH	1.54 ± 0.16 ^{ab}	1.76 ± 0.30 ^b	1.10 ± 0.19 ^a	0.44 ± 0.08 ^c	<i>D</i> : $p < 0.001$ <i>CI</i> : $p < 0.05$
PDK4	0.68 ± 0.14 ^a	0.52 ± 0.07 ^{ac}	0.26 ± 0.06 ^{bc}	0.06 ± 0.01 ^b	<i>D</i> : $p < 0.001$

The means represent the average of 8 rats. DEF Sham: rats fed the $\omega 3$ fatty acid-deficient diet with fictitious surgery; DEF Sept: rats fed the $\omega 3$ fatty acid-deficient diet with cecal ligation and puncture; EPA Sham: rats fed the EPA-rich diet with fictitious surgery; EPA Sept: animals fed the EPA-rich diet with the cecal ligation and puncture; HK2: hexokinase 2; PFK2: phosphofructokinase 2 inhibiting the phosphofructokinase 1; PKm: pyruvate kinase muscle type; LDHM: muscular lactate dehydrogenase catalyzing the transformation of pyruvate to lactate; LDHH: cardiac lactate dehydrogenase catalyzing the transformation of lactate to pyruvate; PDK4: pyruvate dehydrogenase kinase 4 inhibiting the pyruvate dehydrogenase by phosphorylation; ANOVA: analysis of variance. The two-way analysis of variance describes the effects of the diets (*D*), those of sepsis (*S*), and the cross-interaction between these two factors (*CI*); a, b, c: means without a common letter for the same parameter are significantly different.

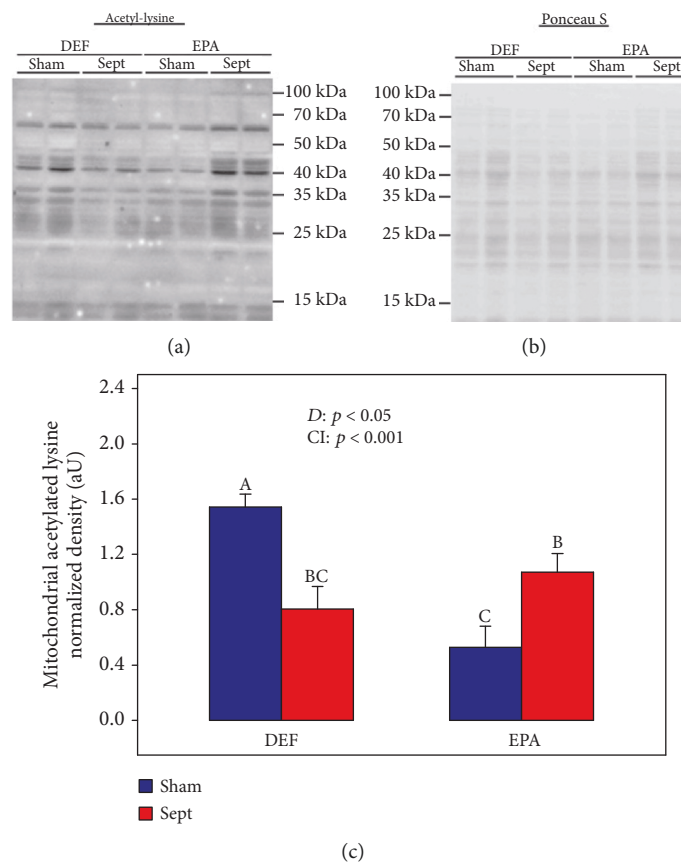


FIGURE 2: Degree of acetylation of mitochondrial proteins: (a) representative immunoblots; (b) protein densitometry to Ponceau S of the corresponding samples; (c) quantification of protein acetylation. The means are the average of 8 rats. DEF: rats fed the $\omega 3$ polyunsaturated fatty acid-deficient diet; EPA: rats fed the eicosapentaenoic acid-enriched diet; Sham: sham-operated rats; Sept: septic rats; *D*: diet effect; *CI*: cross-interaction; A, B, C: histogram bars on the same panel without a common letter are significantly different.

organ and isolated organelles. In the myocardial tissue (Figure 6(i)), VDAC was increased by the EPA-rich diet (+43% in general, $p < 0.01$). The increase in the Sham rats

was low (+8%, NS) but was more marked in the CLP group (+87%, $p < 0.01$). The significant cross-interaction indicated that VDAC tended to be decreased by sepsis in the DEF

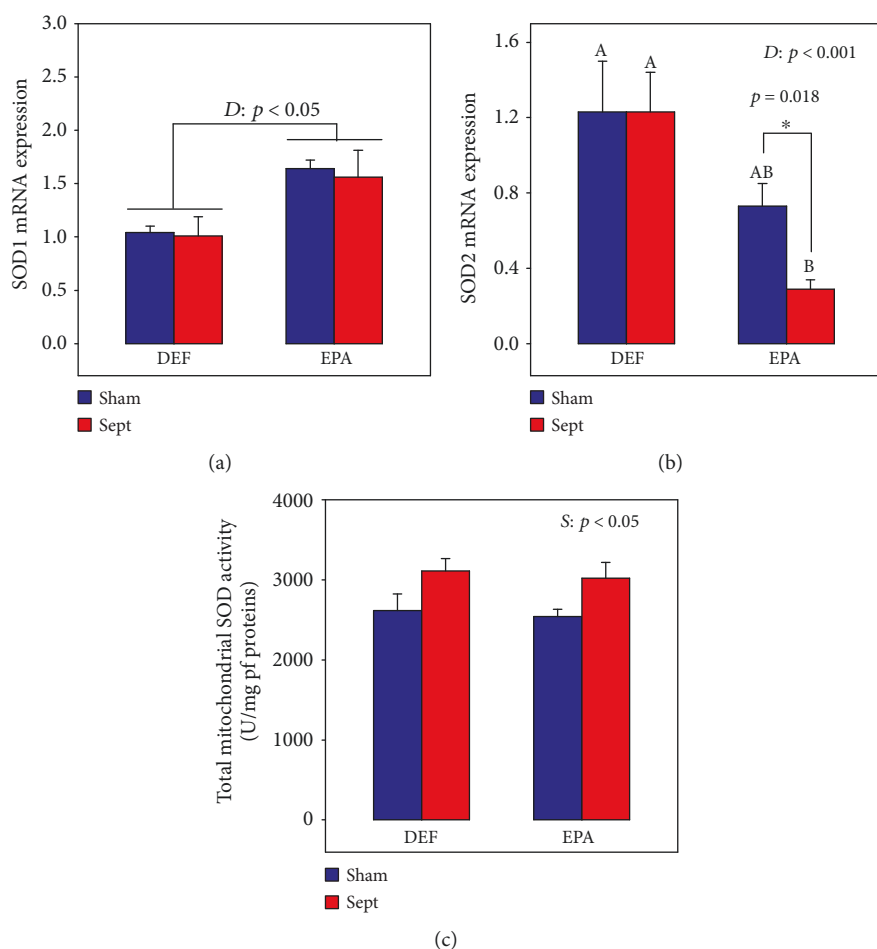


FIGURE 3: Cytoplasmic (SOD1) (a) and mitochondrial (SOD2) (b) superoxide dismutase mRNA expressions and mitochondrial SOD activity (c) in female rats subjected to a 48 h sepsis. The means are the average of 8 rats. DEF: rats fed the ω 3 polyunsaturated fatty acid-deficient diet; EPA: rats fed the eicosapentaenoic acid-enriched diet; Sham: sham-operated rats; Sept: septic rats; *D*: diet effect; *S*: sepsis effect; A, B: histogram bars on the same panel without a common letter are significantly different; *significantly different by one-way analysis of variance.

group (−20%, NS) but increased by the pathology in the EPA group (+39%, $p < 0.01$).

In the isolated mitochondria, the VDAC content was not affected by the diets and the surgical procedures (data not shown).

Since all these results suggest an increased mitochondrial content in the septic myocardium of the EPA group, PGC-1 α protein expression was determined in the different subgroups. The results indicated that the dietary and surgical interventions did not modify the expression of this protein (data not shown).

4. Discussion

This study set out to (i) determine whether the function of cardiac mitochondria is prematurely modified—before the occurrence of contractile dysfunctions—in early low-severity sepsis induced by cecal ligation and puncture in rats fed a Western diet, (ii) find out whether dietary eicosapentaenoic acid (C20:5 *n*-3 or EPA) protects the integrity of these organelles, and (iii) seek a potential mechanism responsible for observed effects. We found that the septic animals fed

the Western-type diet displayed a reduced mitochondrial oxidative phosphorylation although the cardiac mechanical function was not yet reduced. This was associated with an increased mitochondrial oxidative stress. Dietary EPA exerts cardioprotection against these changes through reducing the mitochondrial oxidative stress, which may be related to increased mitochondrial UCP3 and SIRT3 expressions.

4.1. Justification of the Dietary Model. In the present study, the influence of sepsis was studied in two different populations of rats fed distinct dietary PUFAs. The first population was fed a diet in which the PUFAs were strictly ω 6 (linoleic acid). This diet was thus deficient in ω 3 PUFAs. It modeled some features of the Western diet, which is characterized by an excessive ingestion of ω 6 PUFAs and an insufficient ω 3 PUFA intake. In industrialized societies, the ratio of dietary ω 6 PUFAs to ω 3 PUFAs is around 15 but the World Health Organization recommends a ratio close to 4–5. EPA, one of the ω 3 substrates of cyclooxygenase and lipoxygenase, was thus added to the second diet.

Dietary EPA decreased ω 6 PUFAs in cardiac phospholipids, namely, arachidonic acid, C22:4 ω 6, and C22:5 ω 6,

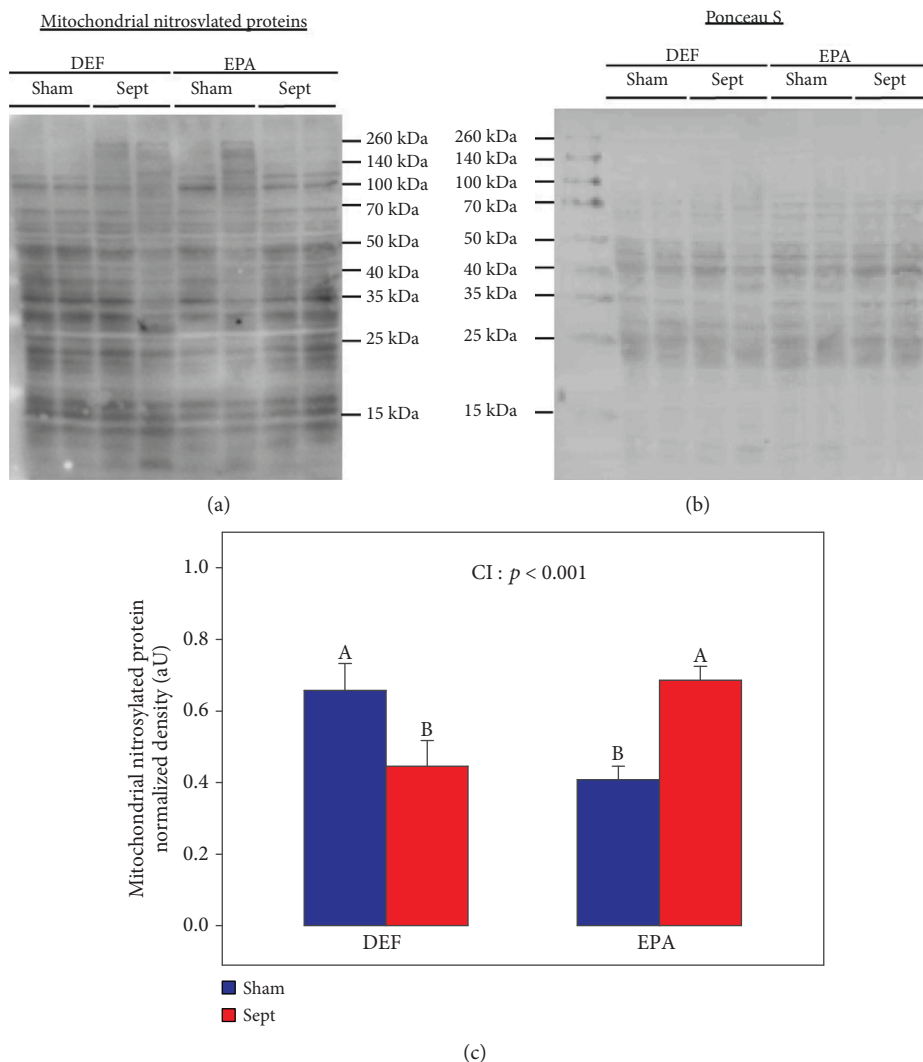


FIGURE 4: Degree of mitochondrial nitrosylated proteins: (a) representative immunoblots; (b) protein densitometry to Ponceau S of the corresponding samples; (c) quantification of mitochondrial nitrosylated proteins. The means are the average of 8 rats. DEF: rats fed the $\omega 3$ polyunsaturated fatty acid-deficient diet; EPA: rats fed the eicosapentaenoic acid-enriched diet; Sham: sham-operated rats; Sept: septic rats; CI: cross-interaction; A, B: histogram bars without a common letter are significantly different.

and increased long-chain $\omega 3$ PUFAs (C22:5 and C22:6 $\omega 3$). These modifications are classically observed when a $\omega 6$ PUFA-based diet is enriched with $\omega 3$ PUFAs [17, 18, 39]. The PUFA ($\omega 6 + \omega 3$) level of phospholipids is relatively constant to maintain stability of the membrane fluidity. However, there is a perpetual renewal of acyl moieties in the constitution of these complex lipids. It is due to the activities of phospholipases A1 and A2 which deacylate the phospholipids. The resulting lysophospholipids are immediately reacylated by lysophospholipid acyltransferases which implant acyl moieties from acyl-CoA in these molecules. PUFAs of the $\omega 6$ series and those of the $\omega 3$ family compete for these enzymes. Introducing $\omega 3$ PUFAs in the diet thus induces a decrease in $\omega 6$ PUFAs and an increase in $\omega 3$ PUFAs in cardiac membranes.

4.2. Limitations of the Study. The maximal sepsis duration was 48 h and the intensity of the microbial infection was

low (ligature at only 1 cm from the cecal apex). The sepsis was limited to this severity (i) for the welfare of the animals and to meet the requirements of the local ethics committee on the use and care of laboratory animals and those of the animal welfare cell of our laboratory and (ii) to limit animal death and so have a sufficient sample size to validate statistical analysis. Clearly, the results obtained are restricted to this short postsurgery period and low-severity sepsis and do not allow extrapolation to other situations.

4.3. Effects of the Diet and Surgical Procedure on Cardiac Mechanical Function. Cardiac mechanical function was estimated by MRI in the living animal anesthetized with isoflurane. The proportion of isoflurane was strictly regulated as a function of the respiratory rhythm. Body temperature of the animals (37°C) was also strictly controlled by adjusting the temperature of the gas flow entering the lungs.

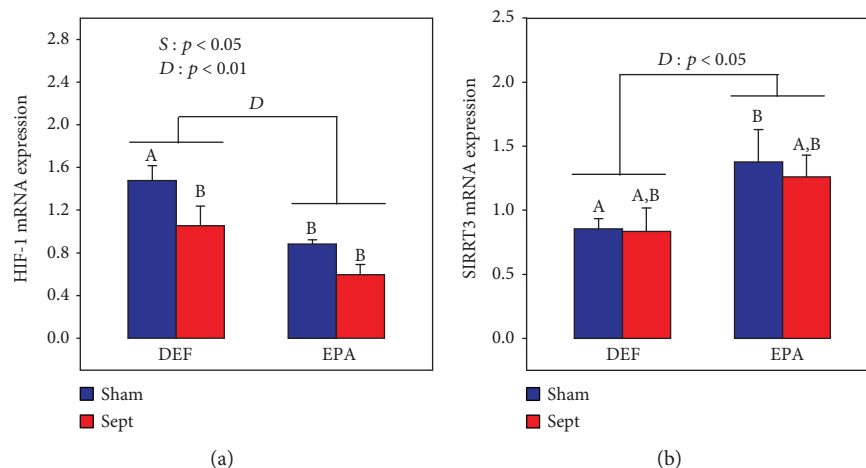


FIGURE 5: Myocardial hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) (a) and sirtuin-3 (SIRT3) (b) mRNA expressions. The means are the average of 8 rats. DEF: rats fed the ω 3 polyunsaturated fatty acid-deficient diet; EPA: rats fed the eicosapentaenoic acid-enriched diet; Sham: sham-operated rats; Sept: septic rats; D: diet effect; S: sepsis effect; A, B: histogram bars on the same panel without a common letter are significantly different.

Our model of sepsis had little effect on cardiac morphology and function. Sepsis has different influences on cardiac function according to the severity of the pathology: early sepsis increases the heart rate [6, 40] to fight against the systemic hypotension encountered in this situation [41]. With more severe sepsis, diastolic dysfunctions occur [8]. Finally, with evolution toward septic shock, systolic dysfunctions appear [7]. The early low-severity sepsis induced in our study did not trigger the expected increase in the heart rate occurring in the hyperdynamic phase of the pathology. However, the rate of contraction tended to be increased in both groups (+13%, $p = 0.08$), suggesting a compensatory mechanism for a probable hypotension. CLP in the rodent is known to decrease body temperature [42]. In our study, the body temperature was maintained at 37°C during the MRI measurements. Since we increased the temperature artificially, stimulation of the rate of contraction may have occurred instead of the increased heart rate.

4.4. Effects of the Diet and Surgical Procedure on Mitochondrial Function. In the sham-operated rats, the EPA-induced changes in the fatty acid composition of membrane phospholipids affected the cardiac mitochondria. Oxidative phosphorylation was unchanged, but several factors related to the oxidative stress were altered. Nitrosylation of mitochondrial proteins was decreased by EPA. This decrease suggests attenuation of reactive oxygen species (ROS) generation. Furthermore, the SOD2 mRNA expression tended to be decreased in this group (−40%, $p = 0.13$). SOD2 is the mitochondrial enzyme, and the lowering of its mRNA expression associated with the lower protein nitrosylation suggests that ROS impregnation of the mitochondrial matrix was reduced. The ω 3 PUFA-related decrease in mitochondrial oxidative stress is of utmost importance in regulating the oxidative phosphorylation: ROS can block the Krebs cycle by inhibiting aconitase [43]. EPA-induced reduction of mitochondrial ROS impregnation can thus improve the oxidative phosphorylation. The phenomenon was associated

with important changes in intermediary metabolism. Lysine acetylation reflecting the intensity of the β -oxidation rate [36] was decreased by the EPA diet, indicating a lower fatty acid oxidation. Furthermore, the pyruvate dehydrogenase kinase 4 mRNA expression was reduced by the ω 3 PUFA. Since this enzyme inhibits pyruvate dehydrogenase, this finding suggests that the oxidative decarboxylation of pyruvate to acetyl-CoA in the mitochondrial matrix was accelerated. Finally, dietary EPA seemed to shift substrate oxidation toward a cardioprotective pattern characterized by high glucose oxidation and low fatty acid degradation [34, 35].

Sepsis strongly depressed the oxidative phosphorylation of cardiac mitochondria in the DEF-fed animals modeling the human Western diet, although degradation of cardiac mechanical function was not yet observed. Compensatory energy production might have occurred through anaerobic glycolysis. Abnormal mitochondrial activity was associated with increased oxidative stress. This was ascertained by the behavior of isolated mitochondria: they displayed an increased ratio of H_2O_2 production to oxidative phosphorylation regardless of the substrate used. This indicates that the ROS release was always higher at a similar rate of energy production. The mitochondrial oxidative stress encountered in the myocardium of these rats can explain the reduced oxidative phosphorylation: ROS and calcium are recognized effectors of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) [44]. The mPTP opening allows the release of small-size water-soluble entities (MW < 1500 Da) from the mitochondrial matrix, namely, NADH and adenine nucleotides, and this release reduces mitochondrial oxidative phosphorylation [17]. The sepsis-induced deficit in mitochondrial energy production translated into a reduction of mitochondrial protein acetylation reflecting a decreased β -oxidation rate. Pyruvate oxidation was not increased in compensation (unchanged glycolytic enzyme mRNA expressions). The mitochondrial oxidative stress also explains the augmentation of IL-1 β mRNA expression in the myocardium: inflammatory cytokine expression is favored by mitochondrial ROS

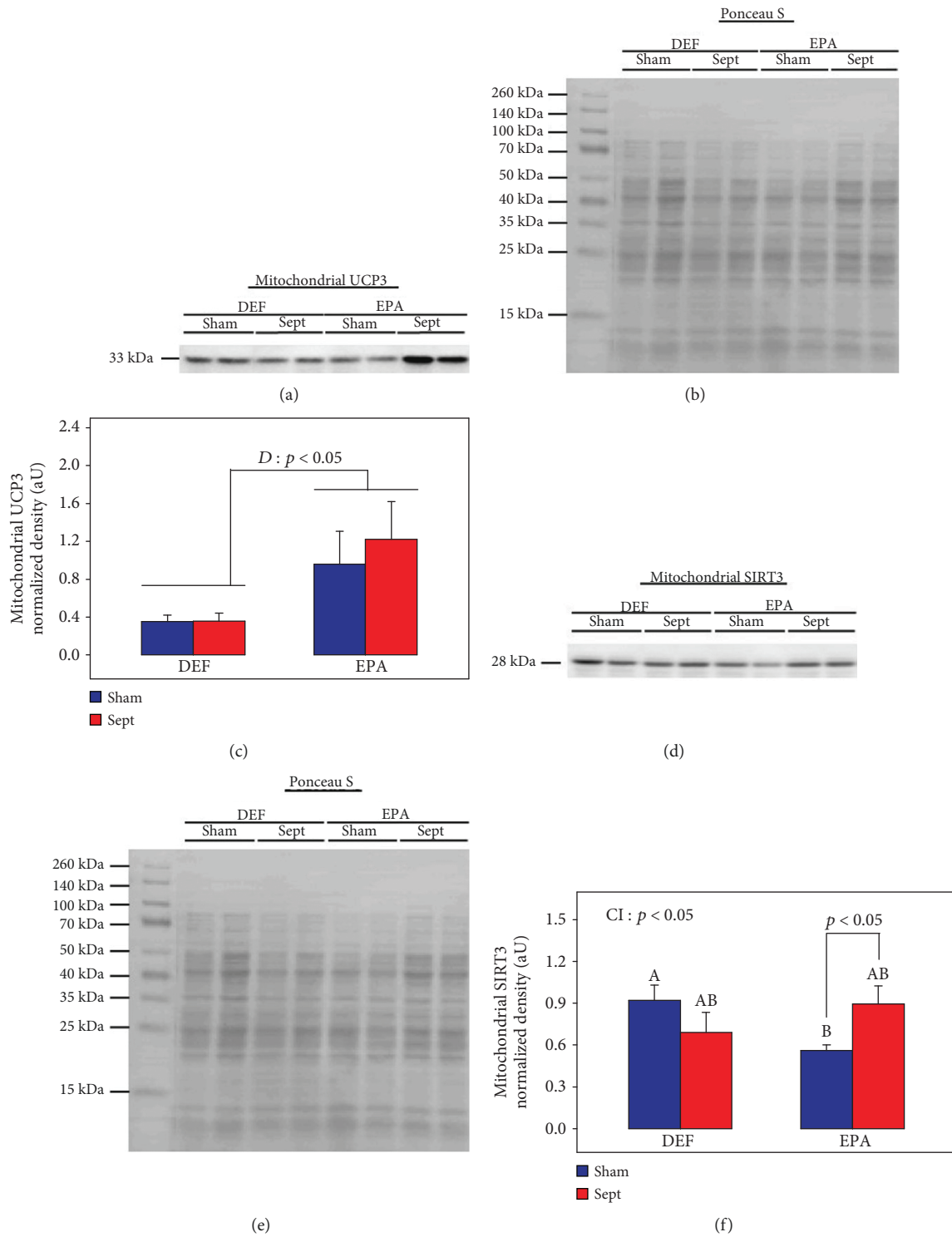


FIGURE 6: Continued.

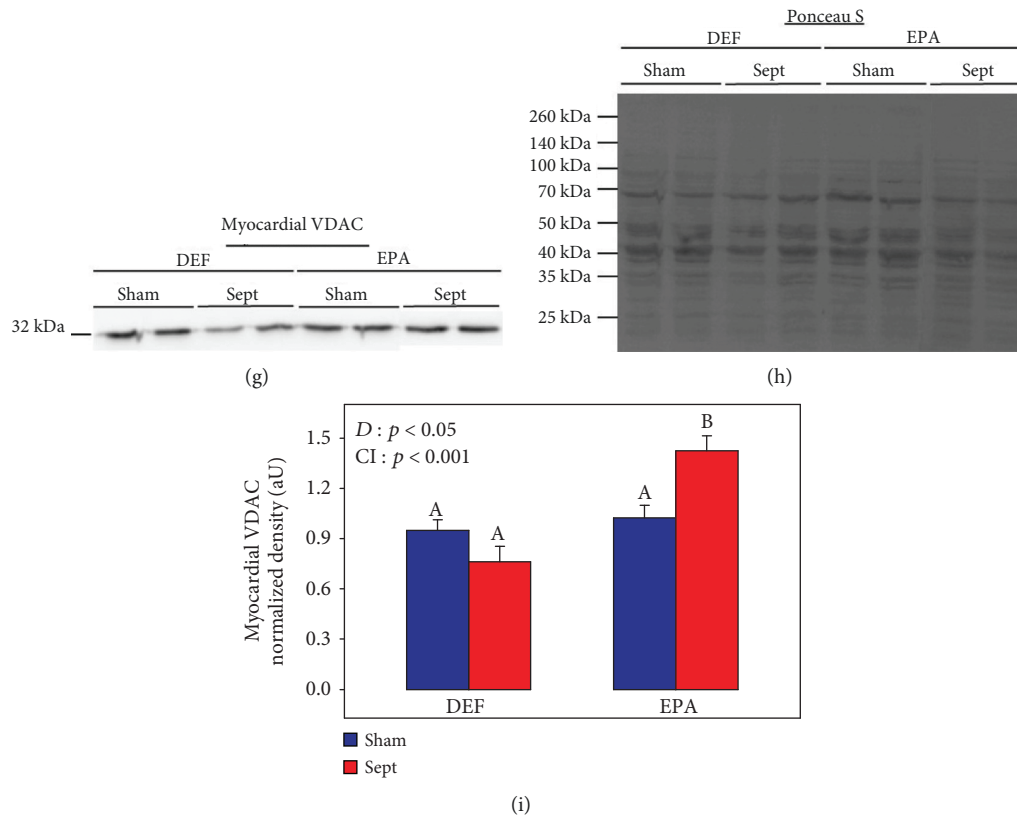


FIGURE 6: Mitochondrial uncoupling protein-3 (UCP3) (a–c), mitochondrial sirtuin-3 (SIRT3) (d–f), and myocardial voltage-dependent anion channel (VDAC) (g–i) expressions. (a, d, g) Representative immunoblots for UCP3, SIRT3, and VDAC; (b, e, h) protein densitometries to Ponceau S of the corresponding samples; (c, f, i) quantifications of mitochondrial UCP3 and SIRT3 together with myocardial VDAC. The means are the average of 8 rats. DEF: rats fed the $\omega 3$ polyunsaturated fatty acid-deficient diet; EPA: rats fed the eicosapentaenoic acid-enriched diet; Sham: sham-operated rats; Sept: septic rats; *D*: diet effect; *CI*: cross-interaction; A, B: histogram bars on the same panel without a common letter are significantly different.

and can trigger a mitochondrial oxidative stress in a vicious cycle [45]. The cardiotoxicity after CLP was thus partly due to inflammation, which probably resulted from the accumulation of the proinflammatory $\omega 6$ PUFAs in membrane phospholipids [23, 46].

In the animals fed the EPA-rich diet, the oxidative phosphorylation of myocardial mitochondria was not depressed by sepsis. As ascertained by the lower SOD2 mRNA expression and ROS release by isolated mitochondria, the EPA-induced protection was due to a reduction of the matrix oxidative stress. This situation allowed (i) maintenance of the oxidative phosphorylation through prevention of mPTP opening, (ii) upholding of the intensity of the intermediate metabolism characterized by an increased β -oxidation rate despite an apparent reduction of glycolysis suggested by the decrease in gene expression of enzymes directly involved in the glycolytic pathway (HK2 and PKm), and (iii) a decrease in the inflammatory response characterized by a slackening of the NF- κ B pathway and reduction of IL-1 β gene expression. This underlines the cardioprotective effects of EPA on sepsis, which is well documented in the literature by numerous human studies [47–62].

VDAC is essential to maintaining a high rate of oxidative phosphorylation, since the pore constituted by this protein

allows the inward and outward movements of solutes through the outer mitochondrial membrane. Its expression in the whole myocardium was increased by dietary EPA in the septic subgroup, although it was unchanged in the mitochondria. This suggests an increased mitochondrial density. Yet PGC-1 α was not overexpressed, indicating that mitochondrial biogenesis was unchanged: it is thus probable that mitophagy was slackened by the lower oxidative stress, leading to the progressive accumulation of nitrated proteins. In the long term, this might be detrimental for the heart and explain the few human studies describing a lack of EPA-induced cardioprotection [62–64] or even a negative effect [65, 66].

4.5. Mechanisms of the Cardioprotective Effects of Dietary EPA

4.5.1. Dietary EPA in Sham-Operated Animals. Our study shows that dietary EPA increased mitochondrial UCP3 content. Such an observation was already noticed in C2C12 cells [67]. The reduced matrix oxidative stress of the EPA-enriched heart was triggered by the observed increase in mitochondrial UCP3 content [68]. UCP3 allows upholding of the oxidative metabolism [69]: UCP3 expression facilitates

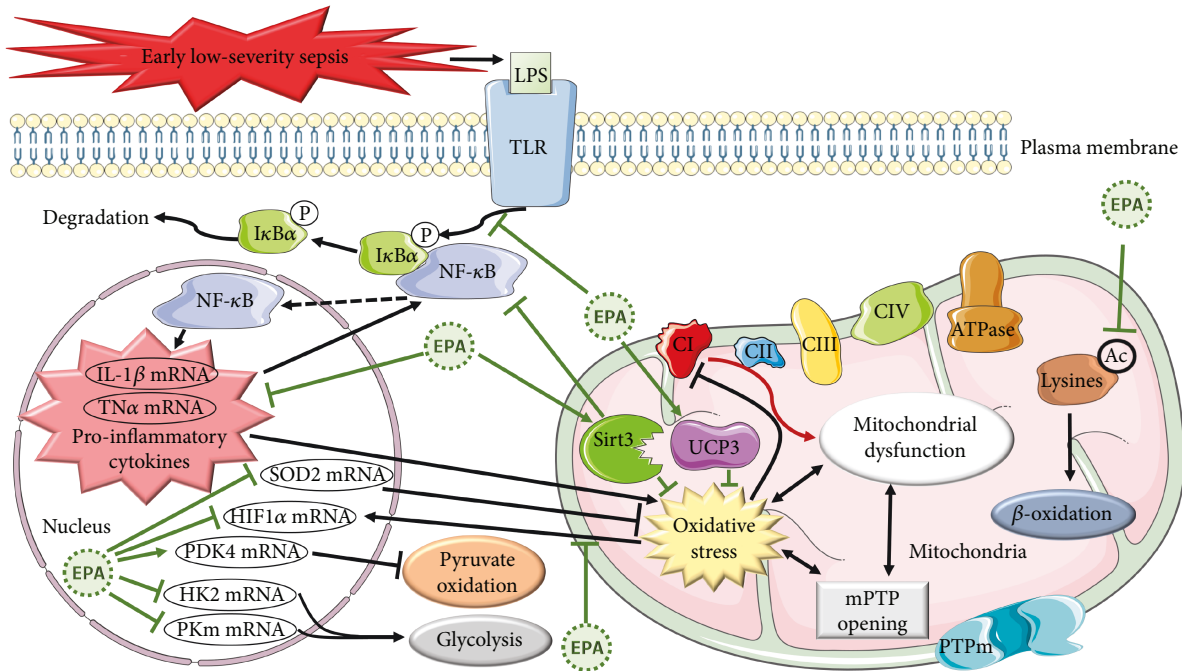


FIGURE 7: Effects of early low-severity sepsis and dietary eicosapentaenoic acid on myocardial function. LPS: lipopolysaccharides; TLR: Toll-like receptors; NF- κ B: nuclear factor-kappa B; I κ B α : nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cell inhibitor alpha; P: phosphate; IL-1 β : interleukin-1 β ; TNF- α : tumor necrosis factor-alpha; mRNA: messenger ribonucleic acid; EPA: eicosapentaenoic acid; HIF-1 α : hypoxia-inducible factor-1-alpha; SOD2: mitochondrial superoxide dismutase; PDK4: pyruvate dehydrogenase kinase 4; HK2; hexokinase 2; PKm: pyruvate kinase; lysine acetylation: image of the beta-oxidation rate; SIRT3: sirtuin-3; UCP3: uncoupling protein 3; CI, CII, CIII, and CIV: complexes 1, 2, 3, and 4 of the respiratory chain; ATPase: adenosine triphosphate synthase; mPTP: mitochondrial permeability transition pore.

matrix expulsion of fatty acids and reduces their degradation in the β -oxidative pathway. Thus, a higher matrix-free CoA content is available for pyruvate oxidation. The assumed UCP3-related lower mitochondrial acyl-CoA content can also account for the reduced matrix oxidative stress accumulation of these toxic lipids in the mitochondria being known to favor ROS production [70]. The phenomenon was associated with increased SIRT3 and decreased HIF-1 mRNA expressions. Bell et al. [37] report in primary mouse embryo fibroblast that a decrease in the matrix oxidative stress induces a reduction of HIF-1 α expression. EPA reduced the matrix oxidative stress and preconditioned the myocardium in terms of mRNA expressions. When the mitochondrial function was measured in the isolated organelles, no change in mitochondrial function was observed except an EPA-induced increase in the respiratory control ratio (RCR) when palmitoylcarnitine/malate was used as a substrate (+38%, $p < 0.05$). It is known that the UCP3-induced reduction of the oxidative stress is related to lipid oxidation: ROS open the mPTP and favor proton leakage [44], and this decreases the RCR. The EPA-related ROS scavenging activity improved the RCR, but the enhancement was limited to the reactive oxygen species resulting from the β -oxidative pathway. The changes in protein and/or gene expressions seen in the myocardium of sham-operated animals probably constitute preconditioning allowing the EPA-induced cardioprotection during sepsis.

4.5.2. Dietary EPA in Septic Animals. The lower oxidative stress of the mitochondrial matrix of the EPA-fed rats was maintained during sepsis. It allowed (i) the reduction of inflammatory cytokine production, (ii) the maintenance of the mPTP in a closed configuration in the *in vivo* situation, and (iii) the upholding of high rates of oxidative phosphorylation to sustain the cardiac mechanical function.

In this model of early sepsis, UCP3 expression was still high in the cardiac mitochondria of animals treated with EPA. This was associated with an increased protein nitrosylation. An UCP3-induced reduction of oxidative stress in favor of an increased nitrosative stress has already been described under conditions of high ROS production [38]. The reduction of the oxidative stress prevented the mPTP opening and favored the upholding of the oxidative phosphorylation. Our study shows for the first time that the nitrosative stress is less deleterious for the mitochondria than the oxidative stress in these conditions of early sepsis. Furthermore, mitochondrial SIRT3 was also increased. Under stressing conditions, this NAD⁺-dependent deacetylase is translocated into the nucleus and mitochondria [71]. In the nucleus, the histone deacetylase has been reported to limit NF- κ B activation [72]. It thus limits the inflammation process [73] and related oxidative stress of the mitochondrial matrix. This effect may be potentiated by high expression of SIRT3 activating several enzymes involved in ROS scavenging activity [74]. Moreover, the increased protein acetylation observed in the septic

mitochondria of the EPA group suggests stimulation of the β -oxidative pathway. Protein acetylation has strong regulatory effects on several mitochondrial enzymes [75]: it blocks glucose and fatty acid oxidations through inhibition of pyruvate, very long-chain acyl-CoA, and long-chain acyl-CoA dehydrogenases, but it stimulates enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase [76], potentially leading to the accumulation of the amphiphilic and perhaps toxic 3-ketoacyl-CoA. By acting on a limited number of key enzymes, SIRT3 is able to overcome these deleterious effects via deacetylation of the involved proteins [77]: it thus allows the upholding of high rates of β -oxidation and oxidative phosphorylation.

4.6. Conclusion (See Figure 7). Sepsis induces dysfunctions of cardiac mitochondria before contractile abnormalities in rats fed a Western-type diet. They are characterized by oxidative stress and disruption of oxidative phosphorylation. Dietary EPA and/or its elongation products (DPA and DHA) exert a strong cardioprotective effect, defined by the absence or delay of inflammation and upholding of the energy metabolism in the physiological range. The reason for the ω 3 PUFA-induced anti-inflammatory effect is a low mitochondrial ROS impregnation suspected to be related to increased UCP3 and SIRT3 expressions. These effects already emerge in the physiological situation through changes in mRNA expressions that precondition the myocardium. They can explain the resistance to sepsis. The antioxidant effect of n-3 PUFAs has been regularly observed after short-term administration (until 10 weeks) of these fatty acids [78–80]. However, Firuzi et al. [81] noticed tendencies toward an increased circulating 8-iso-PGF2 α concentration and decreased erythrocyte glutathione peroxidase and catalase activities after a 6-month treatment in patients enduring dilated cardiomyopathy. Further investigations are thus necessary to determine whether long-term administration of n-3 PUFAs has antioxidant and anti-inflammatory properties. Moreover, future studies with human cardiac mitochondria are now needed to confirm the protection observed in the rat during early sepsis.

Abbreviations

ArA:	Arachidonic acid	DICOM:	Digital imaging and communications in medicine
ADETEC:	Surgical association for the development and enhancement of the techniques of screening and treatment of cardiovascular diseases	$\Delta\psi$:	Mitochondrial membrane potential
ADP:	Adenosine diphosphate	dP/dt_{\max} :	Maximal rate of rise in the left ventricular-developed pressure
AIDS:	Acute immunodeficiency syndrome	dP/dt_{\min} :	Maximal rate of decrease in the left ventricular-developed pressure
ANOVA:	Analysis of variance	ECG:	Electrocardiogram
ARRIVE:	Animal research: reporting of <i>in vivo</i> experiments	ECL:	Enhanced chemiluminescence
ATP:	Adenosine triphosphate	EDTA:	Ethylenediaminetetraacetic acid
CaCl ₂ :	Calcium chloride	EDV:	End-diastolic volume
cDNA:	Complementary deoxyribonucleic acid	EGTA:	Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
CoA:	Free coenzyme A	EPA:	Eicosapentaenoic acid
CO ₂ :	Carbon dioxide	ESV:	End-systolic volume
Cu-Zn:	Copper-zinc	FADH ₂ :	Reduced flavin adenine dinucleotide
DEF:	ω 3 polyunsaturated fatty acid-deficient diet	FFC:	French Federation of Cardiology
DHA:	Docosahexaenoic acid	FoxO3a:	Forkhead box O3 transcription factor
		FRAP:	Ferric reducing antioxidant power
		HCl:	Hydrochloric acid
		HEPES:	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
		HIF-1:	Hypoxia-inducible factor-1
		H ₂ O ₂ :	Hydrogen peroxide
		HRP:	Horseradish peroxidase
		HSE:	Hugo Sachs Elektronik
		IL-1 β :	Interleukin-1 β
		KCl:	Potassium chloride
		KH ₂ PO ₄ :	Potassium dihydrogen phosphate
		LA:	Linoleic acid
		LSD:	Least significant difference
		LV:	Left ventricular
		MgSO ₄ :	Magnesium sulfate
		MOPS:	3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid
		mPTP:	Mitochondrial permeability transition pore
		MR:	Magnetic resonance
		MRI:	Magnetic resonance imaging
		mRNA:	Messenger ribonucleic acid
		MUFA:	Monounsaturated fatty acid
		NaCl:	Sodium chloride
		MW:	Molecular weight
		NADH:	Reduced nicotinamide adenine nucleotide
		NaHCO ₃ :	Sodium bicarbonate
		NF- κ B:	Nuclear factor kappa-B
		NCSS:	Number cruncher statistical software
		O ₂ :	Oxygen dioxide
		ω :	Omega
		PUFA:	Polyunsaturated fatty acid
		PVDF:	Polyvinylidene difluoride
		qRT-PCR:	Quantitative real-time polymerase chain reaction
		RCR:	Respiratory control ratio
		RNA:	Ribonucleic acid
		ROS:	Reactive oxygen species
		Sept:	Septic
		SDS-PAGE:	Variant of polyacrylamide gel electrophoresis
		SEM:	Standard error of the mean
		SIRT3:	Sirtuin-3
		SV:	Systolic volume

SOD:	Superoxide dismutase
TBARS:	Thiobarbituric acid-reactive substances
TNF- α :	Tumor necrosis factor-alpha
UCP3:	Uncoupling protein-3
VDAC:	Voltage-dependent anion-selective channel.

Data Availability

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Disclosure

The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the National Institute of Agronomical Research, French Federation of Cardiology, and ADETEC.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

Authors' Contributions

Thibault Leger, Kasra Azarnoush, Jean-Paul Rigaudière, Chrystèle Jouve, Damien Bouvier, Vincent Sapin, and Luc Demaison contributed to the technical part of the study. Amidou Traoré, Guilhem Pagès, and Lucie Cassagne contributed to the acquisition of MRI data and to their analysis. Bruno Pereira performed the statistical analyses. Jean-Marie Bonny, Kasra Azarnoush, and Luc Demaison contributed to the study conception and design and analysis and interpretation of data. Luc Demaison wrote the manuscript, and Kasra Azarnoush revisited it critically and gave final approval of the version to be published.

Acknowledgments

This work was supported by the French Federation of Cardiology (FFC) and surgical association for the development and enhancement of the techniques of screening and treatment of cardiovascular diseases (ADETEC). The authors warmly thank the staff of the Experimental Unit of Animal Nutrition of the National Institute of Agronomical Research of Theix/Saint-Genès-Champanelle for animal care. They also wish to thank Richard Ryan for editing the manuscript.

References

- [1] C. Fleischmann, A. Scherag, N. K. J. Adhikari et al., "Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis. Current estimates and limitations," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 193, no. 3, pp. 259–272, 2016.
- [2] A. Schmid, J. Pugin, J. C. Chevrolet et al., "Burden of illness imposed by severe sepsis in Switzerland," *Swiss Medical Weekly*, vol. 134, no. 7-8, pp. 97–102, 2004.
- [3] R. C. Bone, "Sepsis, the sepsis syndrome, multi-organ failure: a plea for comparable definitions," *Annals of Internal Medicine*, vol. 114, no. 4, pp. 332–333, 1991.
- [4] J. P. Quenot, A. Pavon, I. Fournel, S. D. Barbar, and R. Bruyère, "Septic shock in adult in France: 20 years of epidemiological data," *Réanimation*, vol. 24, no. 3, pp. 303–309, 2015.
- [5] L. Smeding, F. B. Plötz, A. B. J. Groeneveld, and M. C. J. Kneyber, "Structural changes of the heart during severe sepsis or septic shock," *Shock*, vol. 37, no. 5, pp. 449–456, 2012.
- [6] W. K. Cheung, L. S. Chau, I. I. L. Mak, M. Y. Wong, S. L. Wong, and A. F. Y. Tiwari, "Clinical management for patients admitted to a critical care unit with severe sepsis or septic shock," *Intensive and Critical Care Nursing*, vol. 31, no. 6, pp. 359–365, 2015.
- [7] A. Flynn, B. Chokkalingam Mani, and P. J. Mather, "Sepsis-induced cardiomyopathy: a review of pathophysiologic mechanisms," *Heart Failure Reviews*, vol. 15, no. 6, pp. 605–611, 2010.
- [8] J. D. Hunter and M. Doddi, "Sepsis and the heart," *British Journal of Anaesthesia*, vol. 104, no. 1, pp. 3–11, 2010.
- [9] M. Bujak and N. G. Frangogiannis, "The role of IL-1 in the pathogenesis of heart disease," *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, vol. 57, no. 3, pp. 165–176, 2009.
- [10] K. E. Mason and D. A. Stofan, "Endotoxin challenge reduces aconitase activity in myocardial tissue," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 469, no. 2, pp. 151–156, 2008.
- [11] M. J. Lopez-Armada, R. R. Riveiro-Naveira, C. Vaamonde-Garcia, and M. N. Valcarcel-Ares, "Mitochondrial dysfunction and the inflammatory response," *Mitochondrion*, vol. 13, no. 2, pp. 106–118, 2013.
- [12] I. A. Hobai, J. Edgecomb, K. LaBarge, and W. S. Colucci, "Dysregulation of intracellular calcium transporters in animal models of sepsis-induced cardiomyopathy," *Shock*, vol. 43, no. 1, pp. 3–15, 2015.
- [13] R. Lohner, M. Schwederski, C. Narath et al., "Toll-like receptor 9 promotes cardiac inflammation and heart failure during polymicrobial sepsis," *Mediators of Inflammation*, vol. 2013, Article ID 261049, 13 pages, 2013.
- [14] R. R. Bartz, H. B. Suliman, and C. A. Piantadosi, "Redox mechanisms of cardiomyocyte mitochondrial protection," *Frontiers in Physiology*, vol. 6, p. 291, 2015.
- [15] V. M. Victor, J. V. Esplugues, A. Hernandez-Mijares, and M. Rocha, "Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis: a potential therapy with mitochondria-targeted antioxidants," *Infectious Disorders - Drug Targets*, vol. 9, no. 4, pp. 376–389, 2009.
- [16] S. Alvarez, T. Vico, and V. Vanasco, "Cardiac dysfunction, mitochondrial architecture, energy production, and inflammatory pathways: interrelated aspects in endotoxemia and sepsis," *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 81, Part B, pp. 307–314, 2016.
- [17] L. Demaison, D. Moreau, F. Clauw, C. Vergely, and L. Rochette, "Mitochondrial basis of the anti-arrhythmic action of lidocaine and modulation by the n-6 to n-3 PUFA ratio of cardiac phospholipids," *Fundamental & Clinical Pharmacology*, vol. 27, no. 4, pp. 373–386, 2013.
- [18] L. Demaison, J. P. Sergiel, D. Moreau, and A. Grynberg, "Influence of the phospholipid n-6/n-3 polyunsaturated fatty acid ratio on the mitochondrial oxidative metabolism before and after myocardial ischemia," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1227, no. 1-2, pp. 53–59, 1994.

- [19] P. L. McLennan, M. Y. Abeywardena, J. A. Dallimore, and D. Raederstorff, "Dietary fish oil preserves cardiac function in the hypertrophied rat heart," *The British Journal of Nutrition*, vol. 108, no. 4, pp. 645–654, 2012.
- [20] J. S. Charnock, K. Sundram, M. Y. Abeywardena, P. L. McLennan, and D. T. Tan, "Dietary fats and oils in cardiac arrhythmia in rats," *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 53, no. 4, pp. 1047S–1049S, 1991.
- [21] J. A. Eclow, Q. Qian, R. Redetzke et al., "EPA, not DHA, prevents fibrosis in pressure overload-induced heart failure: potential role of free fatty acid receptor 4," *Journal of Lipid Research*, vol. 56, no. 12, pp. 2297–2308, 2015.
- [22] Y. Nasa, M. Hayashi, H. Sasaki, J. Hayashi, and S. Takeo, "Long-term supplementation with eicosapentaenoic acid salvages cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced injury in rats fed with fish-oil-deprived diet," *Japanese Journal of Pharmacology*, vol. 77, no. 2, pp. 137–146, 1998.
- [23] Y. Duan, F. Li, L. Li, J. Fan, X. Sun, and Y. Yin, "n-6:n-3 PUFA ratio is involved in regulating lipid metabolism and inflammation in pigs," *The British Journal of Nutrition*, vol. 111, no. 3, pp. 445–451, 2014.
- [24] O. Haworth and B. D. Levy, "Endogenous lipid mediators in the resolution of airway inflammation," *The European Respiratory Journal*, vol. 30, no. 5, pp. 980–992, 2007.
- [25] N. Khaper, S. Bryan, S. Dhingra et al., "Targeting the vicious inflammation-oxidative stress cycle for the management of heart failure," *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 13, no. 7, pp. 1033–1049, 2010.
- [26] H. Seki, K. Fukunaga, M. Arita et al., "The anti-inflammatory and proresolving mediator resolvin E1 protects mice from bacterial pneumonia and acute lung injury," *The Journal of Immunology*, vol. 184, no. 2, pp. 836–843, 2010.
- [27] C. Kilkenny and D. G. Altman, "Improving bioscience research reporting: ARRIVE-ing at a solution," *Laboratory Animals*, vol. 44, no. 4, pp. 377–378, 2010.
- [28] M. G. Toscano, D. Ganea, and A. M. Gamero, "Cecal ligation puncture procedure," *Journal of Visualized Experiments*, no. 51, article e2860, 2011.
- [29] J. E. Schneider, "Assessment of global cardiac function," *Methods in Molecular Biology*, vol. 771, pp. 387–405, 2011.
- [30] E. Heiberg, J. Sjögren, M. Ugander, M. Carlsson, H. Engblom, and H. Arheden, "Design and validation of segment - freely available software for cardiovascular image analysis," *BMC Medical Imaging*, vol. 10, no. 1, p. 1, 2010.
- [31] J. Riegler, K. K. Cheung, Y. F. Man, J. O. Cleary, A. N. Price, and M. F. Lythgoe, "Comparison of segmentation methods for MRI measurement of cardiac function in rats," *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, vol. 32, no. 4, pp. 869–877, 2010.
- [32] J. Folch, M. Lees, and S. G. H. Sloane, "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 226, no. 1, pp. 497–509, 1957.
- [33] F. Capel, C. Acquaviva, E. Pitois et al., "DHA at nutritional doses restores insulin sensitivity in skeletal muscle by preventing lipotoxicity and inflammation," *The Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 26, no. 9, pp. 949–959, 2015.
- [34] N. Fillmore and G. D. Lopaschuk, "Targeting mitochondrial oxidative metabolism as an approach to treat heart failure," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1833, no. 4, pp. 857–865, 2013.
- [35] J. S. Jaswal, W. Keung, W. Wang, J. R. Ussher, and G. D. Lopaschuk, "Targeting fatty acid and carbohydrate oxidation—a novel therapeutic intervention in the ischemic and failing heart," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1813, no. 7, pp. 1333–1350, 2011.
- [36] O. Pougovkina, H. te Brinke, R. Ofman et al., "Mitochondrial protein acetylation is driven by acetyl-CoA from fatty acid oxidation," *Human Molecular Genetics*, vol. 23, no. 13, pp. 3513–3522, 2014.
- [37] E. L. Bell, B. M. Emerling, S. J. H. Ricoult, and L. Guarente, "SirT3 suppresses hypoxia inducible factor 1 α and tumor growth by inhibiting mitochondrial ROS production," *Oncogene*, vol. 30, no. 26, pp. 2986–2996, 2011.
- [38] E. Barreiro, C. Garcia-Martínez, S. Mas et al., "UCP3 overexpression neutralizes oxidative stress rather than nitrosative stress in mouse myotubes," *FEBS Letters*, vol. 583, no. 2, pp. 350–356, 2009.
- [39] D. W. L. Ma, J. Seo, K. C. Switzer et al., "n-3 PUFA and membrane microdomains: a new frontier in bioactive lipid research," *The Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 15, no. 11, pp. 700–706, 2004.
- [40] T. Léger, A. Charrier, C. Moreau et al., "Early sepsis does not stimulate reactive oxygen species production and does not reduce cardiac function despite an increased inflammation status," *Physiological Reports*, vol. 5, no. 13, article e13231, 2017.
- [41] J. Izawa, T. Kitamura, T. Iwami et al., "Early-phase cumulative hypotension duration and severe-stage progression in oliguric acute kidney injury with and without sepsis: an observational study," *Critical Care*, vol. 20, no. 1, p. 405, 2016.
- [42] J. I. Granger, P. L. Ratti, S. C. Datta, R. M. Raymond, and M. R. Opp, "Sepsis-induced morbidity in mice: effects on body temperature, body weight, cage activity, social behavior and cytokines in brain," *Psychoneuroendocrinology*, vol. 38, no. 7, pp. 1047–1057, 2013.
- [43] N. H. Gehring, M. W. Hentze, and K. Pantopoulos, "Inactivation of both RNA binding and aconitase activities of iron regulatory protein-1 by quinone-induced oxidative stress," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 10, pp. 6219–6225, 1999.
- [44] L. K. Seidlmayer, V. V. Juettner, S. Kettlewell, E. V. Pavlov, L. A. Blatter, and E. N. Dedkova, "Distinct mPTP activation mechanisms in ischaemia-reperfusion: contributions of Ca²⁺, ROS, pH, and inorganic polyphosphate," *Cardiovascular Research*, vol. 106, no. 2, pp. 237–248, 2015.
- [45] Q. Deng, J. Xu, B. Yu et al., "Effect of dietary tea polyphenols on growth performance and cell-mediated immune response of post-weaning piglets under oxidative stress," *Archives of Animal Nutrition*, vol. 64, no. 1, pp. 12–21, 2010.
- [46] P. C. Calder, "n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases," *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 83, no. 6, pp. 1505S–1519S, 2006.
- [47] M. A. M. Al-Biltagi, A. A. E. B. Abo-Elezz, M. A. Abd-Elhafez, M. M. Mabrouk, and G. A. Suliman, "Beneficial effects of omega-3 supplement to the enteral feeding in children with mild to moderate sepsis," *Journal of Intensive Care Medicine*, vol. 32, no. 3, pp. 212–217, 2017.
- [48] V. M. Barbosa, E. A. Miles, C. Calhau, E. Lafuente, and P. C. Calder, "Effects of a fish oil containing lipid emulsion on plasma phospholipid fatty acids, inflammatory markers, and clinical outcomes in septic patients: a randomized, controlled clinical trial," *Critical Care*, vol. 14, no. 1, p. R5, 2010.

- [49] R. J. Beale, T. Sherry, K. Lei et al., “Early enteral supplementation with key pharmaconutrients improves sequential organ failure assessment score in critically ill patients with sepsis: outcome of a randomized, controlled, double-blind trial,” *Critical Care Medicine*, vol. 36, no. 1, pp. 131–144, 2008.
- [50] H. Chen, W. Wang, C. Hong et al., “Omega-3 fish oil reduces mortality due to severe sepsis with acute gastrointestinal injury grade III,” *Pharmacognosy Magazine*, vol. 13, no. 51, pp. 407–412, 2017.
- [51] H. Chen, W. Wang, Y. Hong, H. Zhang, C. Hong, and X. Liu, “Single-blinded, randomized, and controlled clinical trial evaluating the effects of omega-3 fatty acids among septic patients with intestinal dysfunction: a pilot study,” *Experimental and Therapeutic Medicine*, vol. 14, no. 2, pp. 1505–1511, 2017.
- [52] C. Galbán, J. C. Montejo, A. Mesejo et al., “An immune-enhancing enteral diet reduces mortality rate and episodes of bacteremia in septic intensive care unit patients,” *Critical Care Medicine*, vol. 28, no. 3, pp. 643–648, 2000.
- [53] D. K. Heyland, F. Novak, J. W. Drover, M. Jain, X. Su, and U. Suchner, “Should immunonutrition become routine in critically ill patients? A systematic review of the evidence,” *JAMA*, vol. 286, no. 8, pp. 944–953, 2001.
- [54] S. D. Heys, L. G. Walker, I. Smith, and O. Eremin, “Enteral nutritional supplementation with key nutrients in patients with critical illness and cancer: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials,” *Annals of Surgery*, vol. 229, no. 4, pp. 467–477, 1999.
- [55] B. S. Khor, S. J. Liaw, H. C. Shih, and L. S. Wang, “Randomized, double blind, placebo-controlled trial of fish-oil-based lipid emulsion infusion for treatment of critically ill patients with severe sepsis,” *Asian Journal of Surgery*, vol. 34, no. 1, pp. 1–10, 2011.
- [56] W. Manzanares, R. Dhaliwal, B. Jurewitsch, R. D. Stapleton, K. N. Jeejeebhoy, and D. K. Heyland, “Parenteral fish oil lipid emulsions in the critically ill: a systematic review and meta-analysis,” *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, vol. 38, no. 1, pp. 20–28, 2014.
- [57] W. Manzanares, P. L. Langlois, R. Dhaliwal, M. Lemieux, and D. K. Heyland, “Intravenous fish oil lipid emulsions in critically ill patients: an updated systematic review and meta-analysis,” *Critical Care*, vol. 19, no. 1, p. 167, 2015.
- [58] B. Michaeli, M. M. Berger, J. P. Revelly, L. Tappy, and R. Chioloro, “Effects of fish oil on the neuro-endocrine responses to an endotoxin challenge in healthy volunteers,” *Clinical Nutrition*, vol. 26, no. 1, pp. 70–77, 2007.
- [59] T. T. Pluess, D. Hayoz, M. M. Berger et al., “Intravenous fish oil blunts the physiological response to endotoxin in healthy subjects,” *Intensive Care Medicine*, vol. 33, no. 5, pp. 789–797, 2007.
- [60] A. Pontes-Arruda, A. M. A. Aragão, and J. D. Albuquerque, “Effects of enteral feeding with eicosapentaenoic acid, γ -linolenic acid, and antioxidants in mechanically ventilated patients with severe sepsis and septic shock,” *Critical Care Medicine*, vol. 34, no. 9, pp. 2325–2333, 2006.
- [61] A. Pontes-Arruda, S. DeMichele, A. Seth, and P. Singer, “The use of an inflammation-modulating diet in patients with acute lung injury or acute respiratory distress syndrome: a meta-analysis of outcome data,” *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, vol. 32, no. 6, pp. 596–605, 2008.
- [62] P. Singer, M. Theilla, H. Fisher, L. Gibstein, E. Grozovski, and J. Cohen, “Benefit of an enteral diet enriched with eicosapentaenoic acid and gamma-linolenic acid in ventilated patients with acute lung injury,” *Critical Care Medicine*, vol. 34, no. 4, pp. 1033–1038, 2006.
- [63] J. E. Gadek, S. J. DeMichele, M. D. Karlstad et al., “Effect of enteral feeding with eicosapentaenoic acid, gamma-linolenic acid, and antioxidants in patients with acute respiratory distress syndrome. Enteral Nutrition in ARDS Study Group,” *Critical Care Medicine*, vol. 27, no. 8, pp. 1409–1420, 1999.
- [64] A. J. Palmer, C. K. M. Ho, O. Ajibola, and A. Avenell, “The role of ω -3 fatty acid supplemented parenteral nutrition in critical illness in adults: a systematic review and meta-analysis,” *Critical Care Medicine*, vol. 41, no. 1, pp. 307–316, 2013.
- [65] T. W. Rice, A. P. Wheeler, B. T. Thompson et al., “Enteral omega-3 fatty acid, γ -linolenic acid, and antioxidant supplementation in acute lung injury,” *JAMA*, vol. 306, no. 14, pp. 1574–1581, 2011.
- [66] A. R. H. van Zanten, F. Sztark, U. X. Kaisers et al., “High-protein enteral nutrition enriched with immune-modulating nutrients vs standard high-protein enteral nutrition and nosocomial infections in the ICU: a randomized clinical trial,” *JAMA*, vol. 312, no. 5, pp. 514–524, 2014.
- [67] M. S. Lee, I. H. Kim, and Y. Kim, “Effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on uncoupling protein 3 gene expression in C₂C₁₂ muscle cells,” *Nutrients*, vol. 5, no. 5, pp. 1660–1671, 2013.
- [68] F. Villarroya, R. Iglesias, and M. Giralt, “PPARs in the control of uncoupling proteins gene expression,” *PPAR Research*, vol. 2007, Article ID 74364, 12 pages, 2007.
- [69] J. Himms-Hagen and M. E. Harper, “Physiological role of UCP3 may be export of fatty acids from mitochondria when fatty acid oxidation predominates: an hypothesis,” *Experimental Biology and Medicine*, vol. 226, no. 2, pp. 78–84, 2001.
- [70] S. Cortassa, S. J. Sollott, and M. A. Aon, “Mitochondrial respiration and ROS emission during β -oxidation in the heart: an experimental-computational study,” *PLoS Computational Biology*, vol. 13, no. 6, article e1005588, 2017.
- [71] M. B. Scher, A. Vaquero, and D. Reinberg, “Sirt3 is a nuclear NAD⁺-dependent histone deacetylase that translocates to the mitochondria upon cellular stress,” *Genes & Development*, vol. 21, no. 8, pp. 920–928, 2007.
- [72] C. J. Chen, Y. C. Fu, W. Yu, and W. Wang, “SIRT3 protects cardiomyocytes from oxidative stress-mediated cell death by activating NF- κ B,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 430, no. 2, pp. 798–803, 2013.
- [73] M. D. Hirschey, T. Shimazu, E. Jing et al., “SIRT3 deficiency and mitochondrial protein hyperacetylation accelerate the development of the metabolic syndrome,” *Molecular Cell*, vol. 44, no. 2, pp. 177–190, 2011.
- [74] S. H. Park, O. Ozden, H. Jiang et al., “Sirt3, mitochondrial ROS, ageing, and carcinogenesis,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 12, no. 9, pp. 6226–6239, 2011.
- [75] J. Baeza, M. J. Smallegan, and J. M. Denu, “Mechanisms and dynamics of protein acetylation in mitochondria,” *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 41, no. 3, pp. 231–244, 2016.
- [76] S. Zhao, W. Xu, W. Jiang et al., “Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation,” *Science*, vol. 327, no. 5968, pp. 1000–1004, 2010.
- [77] M. D. Hirschey, T. Shimazu, E. Goetzman et al., “SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation,” *Nature*, vol. 464, no. 7285, pp. 121–125, 2010.
- [78] E. J. Anderson, K. A. Thayne, M. Harris et al., “Do fish oil omega-3 fatty acids enhance antioxidant capacity and

mitochondrial fatty acid oxidation in human atrial myocardium via PPAR γ activation?," *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 21, no. 8, pp. 1156–1163, 2014.

- [79] Q. Li, Q. Yu, R. Na, and B. Liu, "Omega-3 polyunsaturated fatty acids prevent murine dilated cardiomyopathy by reducing oxidative stress and cardiomyocyte apoptosis," *Experimental and Therapeutic Medicine*, vol. 14, no. 6, pp. 6152–6158, 2017.
- [80] E. F. Wiest, M. T. Walsh-Wilcox, and M. K. Walker, "Omega-3 polyunsaturated fatty acids protect against cigarette smoke-induced oxidative stress and vascular dysfunction," *Toxicological Sciences*, vol. 156, no. 1, pp. 300–310, 2017.
- [81] O. Firuzi, N. Shakibazad, H. Amoozgar et al., "Effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids on heart function and oxidative stress biomarkers in pediatric patients with dilated cardiomyopathy," *International Cardiovascular Research Journal*, vol. 7, no. 1, pp. 8–14, 2013.

Publication n°5

A procedure to extract functional isolated mitochondria from small-sized human atrial samples. Applications to the influence of obesity.

Au vu des données de la littérature et des résultats positifs obtenus dans les études précédentes, nous souhaiterions vérifier nos résultats chez l'Homme. Les données décrivant la fonction des mitochondries cardiaques humaines sont rares dans la littérature scientifique. Une recherche approfondie dans PubMed en renseignant simultanément les 3 mots-clés "human", "heart" et "mitochondria" depuis le début de l'année 2018 n'a permis de trouver que deux publications étudiant la phosphorylation oxydative et/ou la libération de ROS dans des mitochondries cardiaques humaines isolées (Kleinbongard et al. 2018; Ait-Aissa et al. 2019). La coopération avec le Professeur Kasra Azarnoush, chirurgien cardiaque, nous offrait la possibilité de récupérer du tissu atrial frais correspondant généralement à un déchet opératoire. Une recherche plus approfondie dans la littérature à partir de l'an 2000 a mis en avant seulement quatre articles étudiant les mitochondries atriales humaines isolées sur le plan de l'oxydation phosphorylante et/ou de la production de ROS (Mio et al. 2008; Morota et al. 2013; Croston et al. 2014; Schipper et al. 2017). A part l'étude de Croston présentant des mitochondries dans un bon état fonctionnel, rares sont les études où le processus d'extraction ne semble pas altérer les mitochondries, principalement au vu des valeurs de RCI. Nous avons donc décidé d'adapter notre protocole du ventricule de rat au tissu atrial humain et de vérifier l'état des mitochondries obtenues.

Les résultats préliminaires des atria humains montrent une respiration mitochondriale et des RCI comparables voire meilleurs par rapport à ceux du tissu ventriculaire des rats. La même constatation est observée pour la libération des ROS rapportée à la consommation d'oxygène. Les mitochondries atriales obtenues sont donc fonctionnelles et de bonne qualité. En revanche, le rendement d'extraction est quasiment 2 fois inférieur pour l'atrium humain par rapport au ventricule de l'animal. Ce constat signifie que la méthode d'extraction peut être

améliorée ou que le taux de mitochondries présentes dans le tissu atrial humain est inférieur à celui des ventricules de rats.

Afin de valider la mise au point du protocole du point de vue de la capacité à mettre en évidence des différences de fonctionnement, une application préliminaire a été mise en place. Celle-ci a consisté à comparer la respiration des mitochondries cardiaques issues de patients normo-pondéraux à celle d'individus obèses. Les patients de cette étude étaient inclus dans le projet de recherche clinique enregistré sur le site ClinicalTrial.gov sous le numéro d'identification NCT03690076. Les résultats montrent que la consommation d'oxygène en état d'oxydation phosphorylante maximale et l'intégrité mitochondriale sont augmentées dans le cadre de l'obésité, ce qui valide des études préliminaires réalisées chez le rat présentant une obésité abdominale. Ces observations permettent de valider la méthode d'extraction destinée à l'obtention de mitochondries cardiaques humaines fonctionnelles mais elles suggèrent également un impact notoire de l'obésité sur ces organites.

**A PROCEDURE TO EXTRACT FUNCTIONAL ISOLATED MITOCHONDIA FROM
SMALL-SIZED HUMAN ATRIAL SAMPLES. APPLICATIONS TO THE
INFLUENCE OF OBESITY.**

Thibault LEGER¹, Luc DEMAISON¹, Chrystèle JOUVE¹, Damien BOUVIER², Vincent SAPIN², Bruno MIGUEL³, Kasra AZARNOUSH³

- 1) Université Clermont Auvergne, INRA, UNH, Unité de Nutrition Humaine, CRNH Auvergne, 63000 Clermont-Ferrand, France
- 2) Department of Medical Biochemistry and Molecular Biology, CHU Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France
- 3) Heart Surgery Department, Gabriel Montpied Hospital, Clermont-Ferrand University Hospital, Clermont-Ferrand, France

Corresponding author: Luc Demaison, 58 rue Montalembert, BP 321, 63009 Clermont-Ferrand cedex 1, France. tel: (+33) 4 73 60 82 65; fax: (+33) 4 73 60 82 55; email: luc.demaison@inra.fr

Abstract

Evaluation of the activity of cardiac mitochondria is probably the best way to estimate early cellular damages in chronic pathology. Early diagnosis allows the rapid therapeutic interventions increasing patient survival in numerous diseases. However, the data on human cardiac mitochondria are scarce in the international literature. Here we describe a method to extract and study functionally mitochondria from small-sized right atrium rejections (minimum of 400 mg) obtained during extracorporeal circulation and usually considered as surgical waste products. The mitochondria were purified through several mechanical processes (fine myocardial cutting, tissue grinder and potter Elvehjem), an enzymatic proteolytic action (subtilisin) and differential centrifugation. The effects of obesity on the rate of mitochondrial oxygen consumption and H₂O₂ release were determined with 3 different substrates. Human atrial mitochondria were of high quality on the functional viewpoint compared to rat ventricle organelles, but their extraction yield was twice lower. Testing the effects of obesity indicated that glutamate/malate-related ADP-stimulated respiration was increased strongly in obese subjects, although the oxidation of other substrates was unaffected. These results confirm those previously found in the ventricles of rats fed a high fat diet. In conclusion, the described method is simple, reliable and sensitive. It allowed the description of the impact of obesity with only a small patient sampling (n = 5 in the lean and obese groups).

Keywords Human right atrium . Mitochondria . Obesity . Oxidative phosphorylation . Reactive oxygen species

Introduction

In several chronic or acute cardiac diseases, early diagnosis of abnormal myocardial function is important to select the best therapeutic strategy. Earliest prognoses increase survival chance for the patients. Echocardiographic or magnetic resonance imaging measurements of mechanical activity are often used in cardiovascular units to estimate myocardial damages. Ejection fraction is a rough tool to estimate cardiac mechanical function and its depression occurs after the onset of cellular damages. Enzyme or protein release in the systemic circulation can be more representative of cellular damages [1]. In example, circulating cardiac troponin I level is used ordinarily as a marker of cellular injuries [2]. However, the release of this protein occur probably with severe cellular disruption and is not viewed as an early marker of damages.

Measurement of mitochondrial function may be the best way to make an early diagnosis of cardiomyocyte damages. Indeed, disruption of mitochondrial function accompanies numerous cardiac pathologies including arrhythmias [3], ischemia/reperfusion [4], diabetes [5], sepsis [6], etc. These abnormalities occur soon after the beginning of diseases and are explained by excess reactive oxygen species (ROS) production or mitochondrial calcium accumulation, opening of the permeability transition pore, release of matrix elements in the cytosol and loss of oxidative phosphorylation capacities [7]. Recent results of our laboratory showed that such dysfunctions occur before changes in myocardial contractility during a low-severity sepsis of short duration [8]. Indeed, decreases in mitochondrial ATP production were offset by increased anaerobic glycolysis, so that energy synthesis was unchanged and myocardial contractility was not depressed [9]. Evaluation of the mitochondrial metabolism is thus very promising in accelerating and improving diagnosis establishment.

Data describing the function of human cardiac mitochondria are scarce in the scientific literature. Performing an extensive research in PubMed by simultaneously questioning the 3 key-words “human”, “heart” and “mitochondria” from the beginning of 2018 allowed to find only 2 publications studying the oxidative phosphorylation and/or ROS production of isolated human cardiac mitochondria [10, 11]. Another approach is more currently used: measurement of oxygen consumption by permeabilized cardiac fibers [12, 13, 14]. This technique allows the determination of the oxidative phosphorylation of the mitochondrial population as a whole in their cellular context. However, this technique is semi-quantitative, since it is not possible to adjust the amount of mitochondria added to the assay with reliability. Yet, the relationship between the quantity of mitochondria added to the respiration medium and intensity of respiration is not linear. Moreover, the presence of numerous ATPases alters the respiration

signal: these enzymes favour ADP production from the synthesized ATP, resulting in an equilibrium between ATP and ADP in the respiration medium. This equilibrium connects the respiration measurements to ATPase activity. It is thus difficult to determine reliable rates of respiration and ATP production. One of the advantage of the permeabilized fibers results from the fact that only a minor quantity of cardiac tissue is necessary for respiration measurements. On the other hand, the respiration rate is low and its determination necessitates high-resolution respirometry apparatus such as the well-known Oroboros system.

That permeabilized fibers necessitate only a small amount of fresh myocardial tissue is an incontestable asset for determination of human oxidative phosphorylation. In example, cordial agreement with cardio-vascular surgeons allows the procurement of atrial biopsies obtained during establishment of extracorporeal circulation. The biopsies are small and their weight can reach only 400 mg. This amount of atrial tissue allows the determination of oxidative phosphorylation of permeabilized fibers, but was until now considered to be too low to permit such a measurement in isolated mitochondria.

We have previously determine the effects of abdominal obesity on the functioning of isolated cardiac mitochondria in the rat fed a high fat diet. The results were irrevocable: abdominal obesity increases the oxidative phosphorylation of the complex 1-related glutamate/malate [15]. In another study using a similar rat model, we observed that abdominal obesity decreases the cardiac oxidative stress [16]. When searchers elaborate a new technique, they need to validate it by comparing their results with those obtained by a method already validated.

This study aimed at presenting a simple and efficient method allowing the preparation of isolated mitochondria from human atrial biopsies obtained during extracorporeal circulation and determination of respiration measurements and hydrogen peroxide releases from 3 different substrates: the complex 1-related glutamate/malate, complex 2-related succinate/rotenone and lipid-related palmitoylcarnitine/malate. To sustain the method, the effects of obesity have been evaluated.

Materials and Methods

Ethical considerations

The protocol was approved by the review board named “Comité de Protection des Personnes Sud-Ouest et Outre-Mer III” of Bordeaux, France (authorization number 2018/17) and

conformed with the World Medical Association Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. Rejections were collected after written informed consent was obtained. The trial was registered in ClinicalTrials.gov under the identifier: NCT03690076.

Material

Fresh human atrial biopsies were collected from 15 patients undergoing open-chest cardiac surgery at the Gabriel Montpied University Hospital, Clermont-Ferrand, France. All the patients had such an intervention for the first time. Five of them were used for finalization of the technique of mitochondrial preparation and comparison with rat ventricle mitochondria. The remaining 10 individuals were tested to determine the effect of obesity (5 lean and 5 obese patients) on the function of atrial mitochondria. The experiments were full-blind studies. For valve surgery and/or coronary revascularisation, the heart has to be stopped and extracorporeal circulation is necessary. Introduction of a cannula of the heart-lung bypass machine in the right atrium necessitates to cut a piece of tissue out. The collected rejections (0.4-1.0 g) were immediately placed in 3-4 ml of cold A buffer (in mM: mannitol 220, sucrose 70, MOPS 5, EGTA 2, pH 7.4 at 4°C, fatty acid-free bovine serum albumin 0.2%) and transferred to a near laboratory for mitochondria extraction.

Mitochondria preparation (scheme 1)

Mitochondrial extraction from human atrial tissue was performed in two steps as we already finalized it for the rat ventricles [8]: first, a mechanical homogenization allowing the collection of mechanically extracted mitochondria; then, an enzymatic extraction after removing of the mechanically extracted mitochondria permitting the obtainment of enzymatically extracted mitochondria. Since the initial size of the atrial biopsy was small, both types of organelles were gathered in order to reach a sufficient mitochondrial concentration in the final suspension.

Briefly, the atrial piece and the cold A buffer was put in a Petri's dish placed on ice and the extra-atrial tissue (mainly yellow adipose tissue) was discarded. The buffer was discarded and the tissue was washed twice with 1 ml of cold A buffer. The tissue was chiselled with curve scissors in cold A buffer (1 ml) during approximately 10 min until the myocardial fragments reached the size of pinheads. The fragments were then placed on 2-3 layers of gauze and rinsed

with 2-3 ml of cold A buffer. After meticulous retrieval, the fragmented tissue was rapidly weighed and placed in a 30-ml centrifugation tube with 5.4 ml of cold A buffer/g of tissue. It was ground with a homogenizer (PT1200E, Polytron) at maximal speed for 2 cycles of 1.2 s. The homogenate was transferred to a Potter-Elvehjem homogenizer and the Polytron grinder was rinsed two times with 2.7 ml of cold A buffer to recover all the tissue. To ensure a sufficient mechanical extraction, the tissue preparation was homogenized with the potter-Elvehjem (350 RPM, 3 passages without taking the pestle of the potter out of the liquid). After careful recovery of all the homogenate in a centrifuge tube, the sample was centrifuged (800 g, 10 min, 4°C). The supernatant containing mechanically extracted mitochondria was filtered on 2 gauze layers and stored on ice until collection of enzymatically extracted mitochondria. The pellet was put in the potter-Elvehjem and suspended in 7.5 ml of cold B buffer (in mM: KCl 100, MOPS 50, EGTA 2, pH 7.4 at 4°C, fatty acid-free serum albumin 0.2%). To release more mitochondria, myofibril proteolysis was performed using subtilisin. A commercial subtilisin solution (Sigma ref P4860) was preferred compared to the classical powdered subtilisin because the powdered enzyme was difficult to weight owing to static electricity and the solution was stable at 4°C for a long duration. The subtilisin solution (22 Sigma units in 1 ml of cold B buffer) was added and the suspension was immediately vortexed and put on ice for 1 min exactly. The suspension was then rapidly homogenized with the potter-Elvehjem (350 RPM, 2 passages) and subtilisin action was stopped by addition of 15 ml of cold B buffer. After meticulous transfer in an adequate tube, the suspension was immediately centrifuged (8000 g, 10 min, 4°C). The supernatant containing the protease was discarded and the pellet re-suspended carefully with a vortex by using 4 x 2.7 ml of cold B buffer/g of tissue. A further centrifugation was performed (800 g, 10 min, 4°C) and the supernatant containing enzymatically extracted mitochondria was filtered on gauze and added to the first supernatant with mechanically-extracted mitochondria. The totality was centrifuged (8000 g, 10 min, 4°C) and the pellet of mitochondria was re-suspended with 0.5 ml of cold C buffer (similar to B buffer without fatty acid-free serum albumin) by several liquid back and forth with an automatic pipette. Once the mitochondria were re-suspended, the tube was filled at two third of its volume with cold C buffer and centrifuge once again (8000 g, 10 min, 4°C). The mitochondrial pellet was finally suspended in 0.5 ml of cold C buffer/g of tissue at the approximate concentration of 10 mg of mitochondrial proteins/ml.

Extraction of rat ventricle mitochondria, respiration measurements and determinations of hydrogen peroxide release were performed according to the same techniques exactly for comparison with human atrial mitochondria. All the experiments followed the European Union

recommendations for the care and use of laboratory animals for experimental and scientific purposes. All the animal work was approved by the local board of ethics for animal experimentation (Comité d'éthique pour l'expérimentation animale, Auvergne) and notified to the research animal facility of our laboratory (authorization No. APAFIS#2213-2016082409264678 v2). The research complied with the ARRIVE guidelines on animal research [17].

Respiration measurements

The rate of mitochondrial oxygen consumption was measured at 30 or 37°C in an incubation chamber (Oxytherm OXYT1, Hansatech, King's Lynn, England) with a Clarke-type O₂ electrode filled with 1 ml of incubation buffer (KCl 125 mM, Tris-HCl 20 mM, KH₂PO₄ 10 mM, EGTA 1 mM, pH 7.2 at 30 °C, fatty acid-free bovine serum albumin 0.15%). All measurements were made using mitochondria (0.1 mg of mitochondrial protein/mL) incubated with either glutamate (5.5 mM)/malate (2.5 mM), palmitoylcarnitine (20 µM)/malate (2.5 mM) or succinate (5.5 mM)/rotenone (2 µM) as substrates (state 2), in the presence of ADP 100 mM (maximal state 3) or 60 mM (spontaneous return to state 4 respiration rate after ADP exhaustion) and afterwards with the addition of oligomycin 0.5 µg/mL. The pH of each substrate was strictly fixed at 7.4 at 30 °C. The incubation buffer was maintained at 30 °C or 37°C and constantly stirred with a built-in electromagnetic stirrer and bar flea. Coupling of the oxidative phosphorylation was assessed by the state 3 to state 4 respiration rate ratio, which measures the degree of control exerted on oxidation by phosphorylation (respiratory control ratio or RCR). Amplex® Red (1 µM) and horseradish peroxidase (5 U/ml) were added to the medium at the beginning of the respiration measurement to maintain the same experimental conditions as those used in the measurement of H₂O₂ release.

Mitochondrial reactive oxygen species release

The rate of mitochondrial reactive oxygen species release was evaluated in the same conditions as the respiration measurements. It followed the linear increase in fluorescence (excitation at 560 nm and emission at 584 nm) due to enzymatic oxidation of Amplex® Red by H₂O₂ in the presence of horseradish peroxidase modified to kinetically follow the rate of production of reactive oxygen species by isolated mitochondria on a fluorometer (Xenius XC, SAFAS, Monaco). Reaction conditions were 0.10 mg of mitochondrial protein/ml, 5 U/ml of horseradish

peroxidase and 1 μ M of Amplex® Red with the same substrates and concentrations as in the respiration measurements.

Morphological data

Fat, lean and hydric masses of the patients were determined with an impedance-meter (Bodystat, France Medical Concept, Franqueville Saint Pierre, France) on the day before the surgery.

In vivo measurements of cardiac function

Several assessments were performed on the day before the surgery: a clinical examination, a 6-minute walking test, an electro-cardiogram, and a transthoracic echocardiography.

Biochemical assays

A systematic measurement of several blood parameters was performed in all the patients. Glucose, total cholesterol, HDL-cholesterol and triglycerides were assayed with an automaton (Dimension Vista, Siemens Healthcare Diagnostics, Saint Denis, France) using commercial available kits (Abcam, Paris, France). HDL-cholesterol was evaluated with the same automaton using a kit from Merck Millipore (Fontenay-sous-Bois, France). LDL-cholesterol was calculated using the Friedewald's formula [18]. Glycated haemoglobin was assayed by High Performance Liquid Chromatography with a Variant system (Biorad, Marnes-la-Coquette, France). Insulin was measured according to an immune-metric chemo-luminescent assay with an automaton (Immulite, Siemens Healthcare Diagnostics, Saint Denis, France) using a kit from Alpco (Grenoble, France). All the blood collections were performed after a 1-night fasting before the surgery. The HOMA-IR index was calculated as follow: $\text{HOMA-IR} = (\text{Blood glucose (mg/dl)} \times \text{insulin concentration (mIU/l)}) / 405$.

Mitochondrial proteins were estimated according to the Pierce's method with a commercial available kit (Micro BCA™ Protein Assay Kit, Thermo Scientific, Rockford, IL).

Statistical analyses

All data presented are mean \pm SEM. Intragroup data normality and intergroup homoscedasticity were evaluated with the Shapiro-Wilk and Bartlett tests, respectively. When the data followed a normal law and variances were equal, a one-way analysis of variance describing the effects

of the species or obesity was performed. If the data were not normally distributed or the variances were unequal, a non-parametric Mann-Whitney U/Wilcoxon Rank-Sum test was carried out. Significance was diagnosed when the probabilities were lower than 0.05. All statistical analyses were performed using the NCSS (number Cruncher Statistical Software) 10.

Results

Comparative activities of human atrial and rat ventricle mitochondria

Comparison of the function of rat and human myocardial mitochondria is presented in table 1. The mitochondrial extraction yield was twice lower with the right atrium of the human heart (-51%, $p < 0.001$). When glutamate/malate was used as an oxidative phosphorylation substrate, the ADP-stimulated respiration rate was higher in the human mitochondria (+171%, $p < 0.001$). This was not the case during the state 4 respiration when oligomycin blocked the ATPases. Consequently, the respiratory control index (RCI) was almost twice higher in human mitochondria (+94%, $p < 0.01$). No difference was however noticed for the P/O ratio. The rates of H_2O_2 release during the states 3 and 4 of the respiration were of similar magnitude in rat and human mitochondria and this was also the case for the ratios between H_2O_2 releases and respiration rates.

The results were slightly different with the lipid substrate palmitoylcarnitine/malate. The state 3 and 4 respiration rates were almost twice higher in human mitochondria (+93 and +100%, $p < 0.001$ and $p < 0.05$) as it was observed with glutamate/malate. Interestingly, H_2O_2 releases during states 3 and 4 of the respiration were higher in the human mitochondria (+202 and +76%, $p < 0.001$ and $p < 0.01$), but finally the ratio between ROS productions and respiration rates were quite similar in the two species.

Specific results were also noticed when succinate/rotenone was used. The rates of state 3 and 4 respirations as well as the RCI were also higher in human (+47, +25 and +25%, $p < 0.05$ for all) although the P/O ratio was similar. ROS release during the state 3 respiration was not significantly modified, but was lower in human mitochondria during the state 4 respiration (-39%, $p < 0.01$). The ratio between ROS releases and respiration rates behaved similarly as the H_2O_2 releases (-50% for this ratio during the state 4 respiration rate, $p < 0.01$).

Effects of obesity on the activity of atrial mitochondria in humans

This study enrolled 10 patients (5 lean and 5 obese individuals) having to undergo an open-chest surgery for valve replacement and/or coronary bypass for the first time. Pre-surgical drug treatments were (number of treated patients in the lean and obese groups): β -blocking (3, 4), anti-hypertensive (3, 4), lipid lowering (4, 2), blood fluidizer (3, 4), ACE inhibitor (3, 2), anti-arrhythmic (2, 0), calcium antagonist (1, 2), potassium enhancer (0, 2), digitalis (1, 0), anti-diabetic (1, 1), analgesic (1, 2), anxiolytic (1, 1), and anti-inflammatory (0, 2) therapies.

Revascularization was planned in 2 lean and 2 obese patients; aortic valve surgery in 2 lean and 3 obese individuals; mitral valve intervention in 4 lean and 2 obese; and finally, tricuspid surgery in 2 lean and 3 obese patients.

All the patients suffered grade 2 or 3 dyspnea with grade 1 Angor, but had no respiratory and cardiac failures. They were mainly males with a similar age in the lean and obese groups (Table 2). In the obese group, 2 patients on 5 were treated for type-2 diabetes, 3 on 5 for dyslipidaemia and the totality for hypertension. In the lean group, none of the patients had developed type-2 diabetes, but 2 on 5 had treatments for dyslipidaemia and 2 on 5 for hypertension.

Although the body weight was not significantly different, the body mass indexes and fat masses were higher in the obese group (+34 and +65% compared to the lean group, $p < 0.001$ for all). Conversely, parameters of the cardiac and pulmonary functions (heart rate, ejection fraction, systolic and diastolic pressures, and systolic arterial pulmonary pressure) were similar. No significant difference in total cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, glycated haemoglobin and HOMA-IR index was noticed. However, triglycerides were increased by obesity (+97% compared to the lean group, $p < 0.05$).

The extracorporeal circulation performed to arrest the heart necessitates the collection of a piece of right atrium which is usually removed as a surgical waste product. We used this piece of atrium to prepare mitochondria. Biopsy weight for mitochondrial preparation averaged 746 ± 42 mg. The mitochondrial extraction yields were of similar magnitude as that measured with the comparison rat ventricle/human atrial mitochondria (data not shown) and did not differ between lean and obese patients. The parameters of oxidative phosphorylation and H_2O_2 release measured when glutamate/malate was used as a substrate are presented in Figure 2. The rate of state 3 respiration was increased strongly by obesity (+101% compared to thinness, $p < 0.001$). This was not the case for the state 4 respiration rate. The RCI thus was increased by obesity (+91%, $p < 0.05$). The parameters of ROS release were however not significantly modified by obesity: nevertheless, a strong tendency toward an obesity-related decrease in the ratio between

H₂O₂ release and state 3 respiration was observed (-62%, p = 0.21). Since the incidence of hypertension was higher in the obese group, we also tested the influence of this pathology on mitochondrial function: hypertension had no significant effects on the parameters of mitochondrial oxidative phosphorylation and ROS release when glutamate/malate was used as a substrate (data not shown).

When palmitoylcarnitine/malate or succinate/rotenone was used as a substrate, the parameters of mitochondrial function were not affected by obesity (data not shown).

Discussion

This study aimed to describe a simple, reliable and sensitive method allowing the preparation of isolated mitochondria from human atrial biopsies obtained during extracorporeal circulation, and determination of respiration measurements and hydrogen peroxide releases from 3 different substrates: the complex 1-related glutamate/malate, complex 2-related succinate/rotenone and lipid-related palmitoylcarnitine/malate. To sustain the method, the effects of obesity have been evaluated. We noticed that the functions of human atrial mitochondria were of good quality compared to those of rat ventricles. The respiration measurements were performed easily with an oxy-meter displaying a conventional sensitivity to oxygen. Furthermore, sufficient amounts of mitochondria were purified to allow all the desired measurements. Obesity increased the state 3 respiration rate and RCI of atrial mitochondria oxidizing glutamate/malate. This may be related to a decreased H₂O₂ release during state 3 respiration. These significant results were obtained despite the low sample size of the experiment indicating the good sensitivity of the methods.

Compared activities of rat ventricle and human atrial mitochondria

One of the main observations of this comparison was that human right atrium contained less mitochondria than rat ventricle mitochondria as suggested by the lower mitochondrial extraction yield. This may be related to the size of the species: indeed, it is well known that the smallest animals have highest heart rate and metabolism [19]. *In vivo* heart rate surrounds 400 beats/min in the rat, whereas it is only around 60 in humans. The highest heart rates necessitate more energy and more oxidative metabolism, and finally higher mitochondrial density.

Although their extraction yield was lower, human atrial mitochondria displayed the highest rates of oxidative phosphorylation whatever the substrate used. Rat heart mitochondria can have been deteriorated slightly during the extraction process. Indeed, rat ventricle is harder than human right atrium. The mechanical extraction with the homogenizer and potter Elvehjem can thus have deteriorated more severely rat mitochondria compared to the human organelles. That rat mitochondria were partially deteriorated is sustained by the myocardial capacities of ATP synthesis. These last can be estimated roughly according to the following calculation: $CAS = (St\ 3 - St4) \times P/O \times MEY$ where CAS are the capacities of ATP synthesis (nmoles of ATP/min/g of myocardium), St3 and St4 the mitochondrial respiration rates during state 3 and 4 (ng atoms of oxygen/min/mg of mitochondrial proteins), P/O is the mitochondrial efficiency (nmoles of synthesized ATP/ng atom of oxygen) and MEY the mitochondrial extraction yield (mg of mitochondrial proteins/g of myocardium). The difference between state 3 (ATP production + uncoupling) and state 4 (only uncoupling) was calculated to estimate the quantity of oxygen involved in ATP synthesis. According to our measurements, CAS were 832 and 1306 nmoles of ATP/min/mg of myocardium in the rat ventricles and human right atrium, respectively. The lower CAS in the rat does not agree with the high heart rate measured in this species.

Our data indicate that human atrial mitochondria displayed good respiration properties, although their extraction yield was low. Since we had not a lot of biological material, we had to adapt measurements of oxidative phosphorylation and ROS release to this situation. Using an oxy-meter with a classical oxygen sensitivity, we decided to perform respiration and ROS measurements with 0.1 mg of mitochondrial proteins/ml. Our experiment indicated that this quantity was enough for the measurements and even allowed the easy collection of repeated small samples (5 μ l in 50 μ l of cold dimethyl sulfoxide) from the respiration chamber to perform determinations of ATP concentrations by luminometry at a later date. A rapid calculation taking into account the mitochondrial extraction yield shows that only 400 mg of atrial tissue is sufficient to perform all the measurements. Moreover, the SEM of our measurements were rather low compared to the corresponding means indicating that the methods of extraction and measurements of mitochondrial activities were reliable, although we had no information on the health status of the patients involved in the measurements. Utilization of healthy human left ventricle obtained from heart-transplanted patients will allow the better comparison with rat ventricle mitochondria.

Effects of obesity on the activities of human atrial mitochondria

Obese patients involved in this study were clearly differentiated from lean subject as evidenced by their increased body mass index and fat mass. They had more difficulties to perform the 6-min walk test, although the lower travelled distance (-33%) was not significantly different from that determined in lean patients. Interestingly, they displayed a higher circulating triglyceride concentration, suggesting a potential lipotoxicity. Despite this fact, glutamate/malate-related state 3 respiration was twice higher compared to that measured in lean subjects. This can offset for the increased energy utilization due to excess body weight. These results fit well with those obtained in one of our previous study performed in the ventricle mitochondria of rats fed a high fat diet for several weeks [15]: the high fat diet triggered abdominal obesity and the mitochondria a higher ADP-stimulated respiration with glutamate/malate.

In the pair glutamate/malate, only malate is oxidized. Its oxidation is carried out in the Krebs cycle by the malate dehydrogenase enzyme producing only the reduced form of NAD. NADH is re-oxidized at complex 1 level of the respiratory chain. Complex 1 activity is decreased by the mitochondrial oxidative stress via cardiolipin oxidation [20, 21]. In the present study, the ratio between H₂O₂ production and ADP-stimulated respiration was reduced by 62% in the obese group. The difference was not significant due to the too low sample size, but it was huge. This strongly suggests that at a similar rate of oxidative phosphorylation, ROS release tended to be lower. This agrees well with a recent study performed in obese high fat diet-fed rats in which we observed a reduced cardiac oxidative stress [16]. This lower oxidative stress was probably responsible for the increased complex 1 activity and malate ADP-stimulated respiration noticed in the present study. The reasons for the lower oxidative stress are not known, but can be linked to the stimulated respiration: increased respiration consumes more $\Delta\Psi$. The potential difference between matrix and intermembrane space would be lower with weaker positive electric charge out of the mitochondria. The negative electrons transiting the respiratory chain thus would be less pulled in the intermembrane space and superoxide anion would be less produced. Increased respiration might results from augmented cardiac work at similar magnitude of physical activity in obese individuals.

Visualizing the impact of the increased complex 1-related respiration in the context of the whole organ is difficult and somewhat speculative. However, complex 1 activity produces more energy than complex 2 or lipid-related electron transfer flavoproteins. The resulting gain in metabolic efficiency [22] can strengthen the activity of the whole heart and favour blood expulsion in the arteries, thus allowing the care of the increased energy needs due to excess body weight.

Conclusion

In the present study, we presented a simple, reproducible and sensitive technique allowing the preparation of atrial mitochondria from a small human tissue sampling. The mitochondria were in good health status although they were obtained in small quantity. However, adaptation of the typical protocol of respiration and ROS release allowed the full determinations of these parameters with 3 different substrates. The mitochondrial extraction yield obtained indicated that only 400 mg of atrial tissue were sufficient.

Estimation of the effects of obesity indicated that the method used for preparation of human atrial mitochondria allowed the obtaining of the same results as those determined in the rat ventricle. The mitochondria of obese individuals displayed a higher rate of complex 1-related substrate respiration due to a lower oxidative stress. This similarity strengthens the validity of our extraction method.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article. The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the National Institute of Agronomical Research, French Federation of Cardiology and society ADETEC.

Funding

This work was supported by the French Federation of Cardiology (FFC) and surgical association for the development and enhancement of the techniques of screening and treatment of cardiovascular diseases (ADETEC).

Contribution statement

Kasra Azarnoush, Bruno Miguel, Chrystèle Jouve, Damien Bouvier, Thibault Leger, Vincent Sapin and Luc Demaison contributed to the technical part of the study. Luc Demaison performed the statistical analyses. Thibault Leger, Kasra Azarnoush and Luc Demaison

contributed to the study conception and design, analysis and interpretation of data. Luc Demaison wrote the manuscript, Thibault Leger and Kasra Azarnoush revisited it critically and gave final approval of the version to be published.

Acknowledgments

The authors warmly thank the staff of the Experimental Unit of Animal Nutrition of the National Institute of Agronomical Research of Theix/Saint-Genès-Champanelle for animal care. They also wish to thank Richard Ryan for editing the manuscript.

Figure caption

Fig. 1 Schematic representation of the procedure for the extraction of isolated cardiac mitochondria of human atrial samples.

Fig. 2 Effects of obesity on the activities of human atrial mitochondria. The respiration and H₂O₂ release measurements were carried out at 37°C with a saturating ADP concentration and glutamate/malate as a substrate. The means are a consortium of 5 patients. St3: state 3 respiration rate (ng atoms of oxygen/min/mg of proteins); St4: state 4 respiration rate (ng atoms of oxygen/min/mg of proteins); RCI: respiratory control index; ROS3: H₂O₂ release during the ADP-stimulated respiration (pmoles/min/mg of proteins); ROS4: H₂O₂ release during the state 4 respiration (pmoles/min/mg of proteins); R3 and R4: ratio between ROS and oxygen consumption during the states 3 and 4 of the respiration (pmoles H₂O₂/ng atom of oxygen); *: p < 0.05; ***: p < 0.001.

Table 1. Comparison of the activities of rat ventricle and human atrial mitochondria

		Rat ventricles	Human right atrium
	MEY	5.1 ± 0.4	2.5 ± 0.3 ***
GM	St3	84 ± 7	228 ± 31 ***
	St4	13 ± 1	19 ± 3
	RCI	6.5 ± 0.2	12.6 ± 1.4 **
	P/O	2.3 ± 0.2	2.5 ± 0.1
	ROS3	81 ± 5	129 ± 43
	ROS4	113 ± 7	169 ± 48
	ROS3/St3	1.0 ± 0.1	0.6 ± 0.1
	ROS4/St4	9.3 ± 0.9	9.1 ± 1.8
PM	St3	110 ± 10	212 ± 18 ***
	St4	12 ± 1	24 ± 4 *
	RCI	8.7 ± 0.2	9.9 ± 1.9
	P/O	2.6 ± 0.2	2.6 ± 0.1
	ROS3	56 ± 5	169 ± 6 ***
	ROS4	90 ± 9	158 ± 5 **
	ROS3/St3	0.5 ± 0.1	0.8 ± 0.2 *
	ROS4/St4	7.6 ± 0.8	7.7 ± 0.8
SR	St3	129 ± 13	189 ± 9 *
	St4	52 ± 3	65 ± 4 *
	RCI	2.4 ± 0.1	3.0 ± 0.1 *
	P/O	1.1 ± 0.1	1.2 ± 0.1
	ROS3	139 ± 6	103 ± 22
	ROS4	174 ± 7	107 ± 23 **
	ROS3/St3	1.2 ± 0.1	0.6 ± 0.1
	ROS4/St4	3.4 ± 0.2	1.7 ± 0.1 **

Data are the average of 5 myocardial samples per group. Mitochondrial metabolism was determined at 30°C with a non-saturating ADP concentration (60 mM). MEY: mitochondrial extraction yield in mg of mitochondrial proteins/g of myocardial tissue; GM: glutamate/malate; PM: palmitoylcarnitine/malate; SR: succinate/rotenone; St3 and St4: state 3 and state 4 respiration rates in ng atoms of oxygen/mg of mitochondrial proteins; P/O: nmoles of ADP/ng atom of oxygen; ROS3 and ROS4: rates of H₂O₂ release during the state 3 and state 4 respiration; *: p < 0.05; **: p < 0.01; ***: p < 0.001.

Table 2. Characteristics of the lean and obese patients involved in the study

	Lean	Obese
Male	4/5	4/5
Age (y)	73 ± 3	74 ± 4
Body weight (kg)	68 ± 4	89 ± 9
BMI (kg/m ²)	24.2 ± 1.0	32.4 ± 0.8 **
Fat mass (kg)	19.6 ± 1.7	32.3 ± 2.7 **
Lean mass (kg)	48.4 ± 3.9	56.3 ± 11.2
Hydric mass (kg)	39.8 ± 2.7	45.3 ± 8.4
Diabetes	0/5	2/5
Dyslipidaemia	2/5	3/5
Hypertension	2/5	5/5
6 min walk test (m)	413 ± 29	275 ± 65
HR (beats/min)	63 ± 4	76 ± 12
EF (%)	55 ± 3	63 ± 3
SAPP (mmHg)	41 ± 6	48 ± 7
SAP (mmHg)	123 ± 10	133 ± 15
DAP (mmHg)	66 ± 3	79 ± 1
Total chol (g/l)	1.39 ± 0.12	1.82 ± 0.42
LDL-chol (g/l)	0.72 ± 0.11	1.27 ± 0.25
HDL-chol (g/l)	0.50 ± 0.03	0.36 ± 0.06
Triglycérides (g/l)	0.88 ± 0.13	1.73 ± 0.25 *
Glycated Hb (%)	6.24 ± 0.43	6.00 ± 0.10
HOMA-IR	0.89 ± 0.18	1.88 ± 0.83

Five patients were included in each group. BMI: body mass index; HR: heart rate; EF: ejection fraction; SAPP: systolic arterial pulmonary pressure; SAP: systolic aortic pressure; DAP: diastolic aortic pressure; chol: cholesterol; LDL: low-density lipoproteins; HDL: high-density lipoproteins; Hb: haemoglobin; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$.

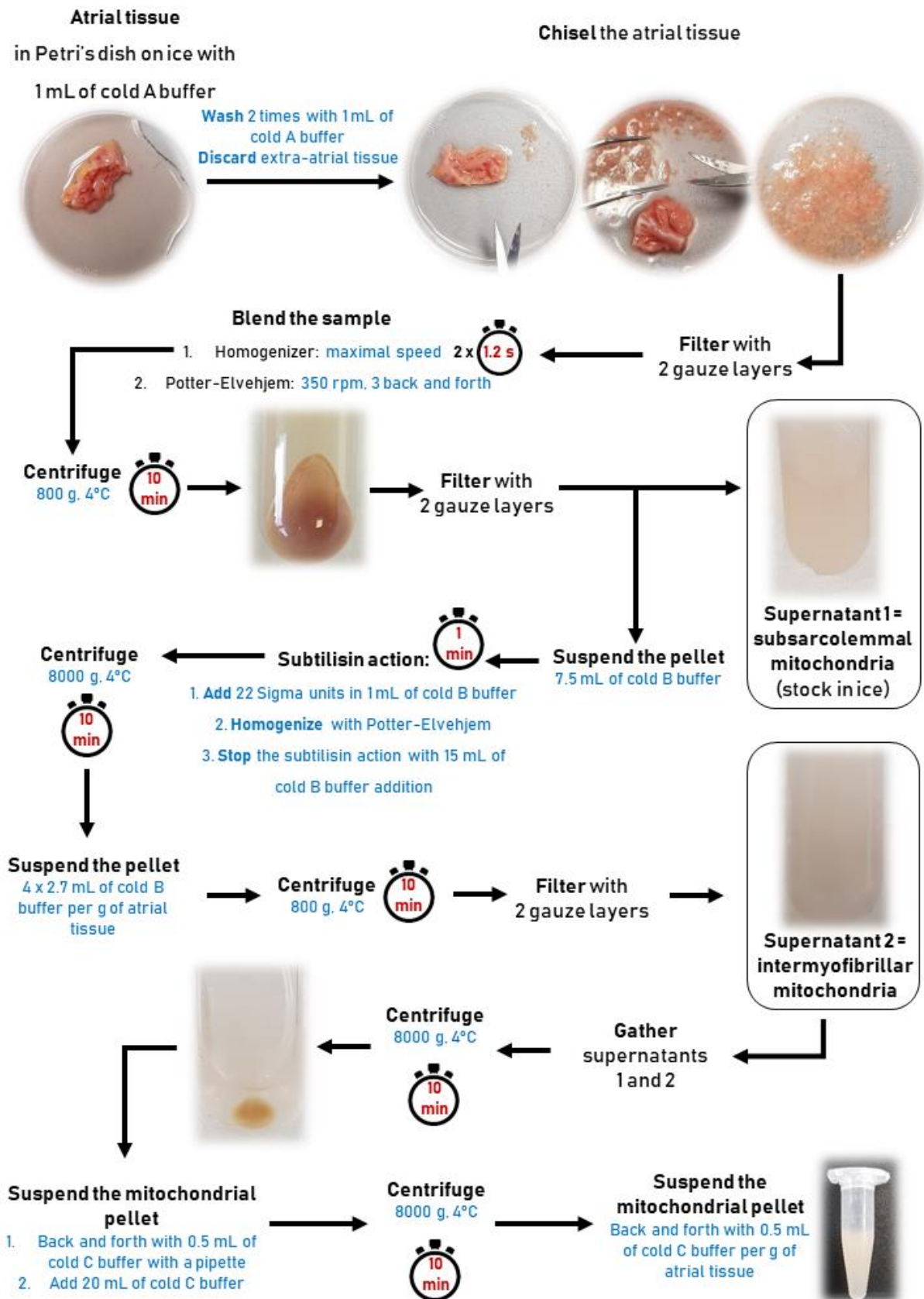


Figure 1

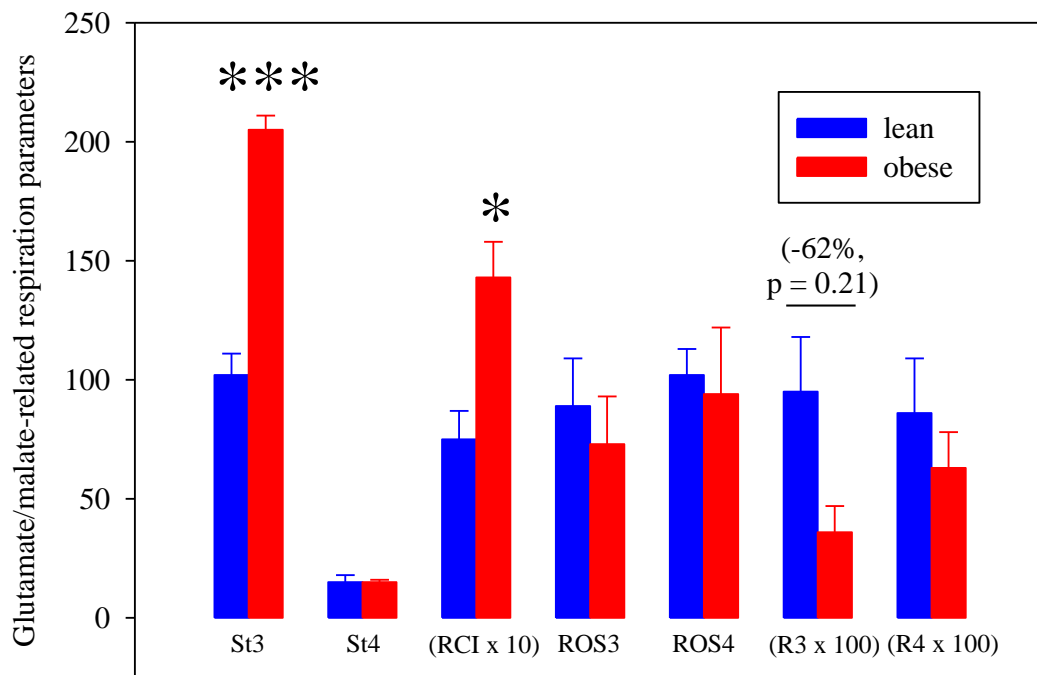


Figure 2

REFERENCES

1. De Leiris J, Feuvray D (1973) Factors affecting the release of lactate dehydrogenase from isolated rat heart after calcium and magnesium free perfusions. *Cardiovasc Res* 7:383-390.
2. Mair P, Mair J, Seibt I, Wieser C, Furtwaengler W, Waldenberger F, Puschendorf B, Balogh D (1993) Cardiac troponin T: a new marker of myocardial tissue damage in bypass surgery. *J Cardiothor Vasc Anest* 7:674-678.
3. Kontogiannis C, Kosmopoulos M, Georgiopoulos G, Spartalis M, Paraskevaidis I, Chatzidou S (2018) Mitochondria in beta-adrenergic signaling: emerging therapeutic perspectives in heart failure and ventricular arrhythmias. *J Thor Dis* 10:S4183-S4185.
4. Demaison L, Sergiel JP, Moreau D, Grynberg A (1994) Influence of the phospholipid n-6/n-3 polyunsaturated fatty acid ratio on the mitochondrial oxidative metabolism before and after myocardial ischemia. *Biochim Biophys Acta* 1227:53-59.
5. Santos DL, Palmeira CM, Seïça R, Dias J, Mesquita J, Moreno AJ, Santos MS (2003) Diabetes and mitochondrial oxidative stress: a study using heart mitochondria from the diabetic Goto-Kakizaki rat. *Mol Cell Biochem* 246:163-170.
6. Víctor VM, Espulgues JV, Hernández-Mijares A, Rocha M (2009) Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis: a potential therapy with mitochondria-targeted antioxidants. *Infect Dis Drug Targ* 9:376-389.
7. Zhao Y, Ye L, Liu H, Xia Q, Zhang Y, Yang X, Wang K (2010) Vanadium compounds induced mitochondria permeability transition pore (PTP) opening related to oxidative stress. *J Inorg Biochem* 104:371-378.
8. Leger T, Azarnoush K, Traoré A, Cassagnes L, Rigaudière JP, Jouve C, Pagès G, Bouvier D, Sapin V, Pereira B, Bonny JM, Demaison L (In Press) Antioxidant and cardioprotective effects of EPA in early low-severity sepsis through UCP3- and SIRT3-upholding of the mitochondrial redox potential. *Ox Med Cell Long*.
9. Fillmore N, Lopaschuk GD (2013) Targeting mitochondrial oxidative metabolism as an approach to treat heart failure. *Biochim Biophys Acta* 1833:857-865.
10. Ait-Aissa K, Blaszkak SC, Beutner G, Tsaih SW, Morgan G, Santos JH, Flister MJ, Joyce DL, Camara AKS, Gutterman DD, Donato AJ, Porter GA Jr, Beyer AM (2019) Mitochondrial oxidative phosphorylation defect in the heart of subjects with coronary artery disease. *Sci Rep* 9:7623.

11. Kleinbongard P, Gedik N, Kirca M, Stoian L, Frey U, Zandi A, Thielmann M, Jakob H, Peters J, Kamler M, Heusch G (2018) Mitochondrial and contractile function of human right atrial tissue in response to remote ischemic conditioning. *J Am Heart Assoc* 7:e009540.
12. Anderson EJ, Kypson AP, Rodriguez E, Anderson CA, Lehr EJ, Neuffer PD (2009) Substrate-specific derangements in mitochondrial metabolism and redox balance in the atrium of the type 2 diabetic human heart. *J Am Coll Cardiol* 54:1891-1898.
13. Park SY, Trinity JD, Gifford JR, Diakos NA, McCreath L, Drakos S, Richardson RS (2016) Mitochondrial function in heart failure: The impact of ischemic and non-ischemic etiology. *Int J Cardiol* 220:711-717.
14. Stride N, Larsen S, Hey-Mogensen M, Hansen CN, Prats C, Steinbrüchel D, Køber L, Dela F (2013) Impaired mitochondrial function in chronically ischemic human heart. *Am J Physiol* 304:H1407-H1414.
15. Mourmoura E, Rigaudière JP, Couturier K, Hininger I, Laillet B, Malpuech-Brugère C, Azarnoush K, Demaison L (2016) Long-term abdominal adiposity activates several parameters of cardiac energy function. *J Physiol Biochem* 72:525-537.
16. Leger T, Hininger-Favier I, Capel F, Geloën A, Rigaudière JP, Jouve C, Pitois E, Pineau G, Vaysse C, Chardigny JM, Michalski MC, Malpuech-Brugère C, Demaison L (2018) Dietary canolol protects the heart against the deleterious effects induced by the association of rapeseed oil, vitamin E and coenzyme Q10 in the context of a high-fat diet. *Nutr Metab* 15:15.
17. Kilkenny C, Altman DG (2010) Improving bioscience research reporting: ARRIVE-ing at a solution. *Lab An* 44:377-378.
18. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS (1972) Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18:499-502.
19. Kindwall EP (1962) Metabolic rate and animal size correlated with decompression sickness. *Am J Physiol* 203:385-388.
20. Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Di Venosa N, Federici A, Ruggiero FM (2004) Decrease in mitochondrial complex I activity in ischemic/reperfused rat heart: involvement of reactive oxygen species and cardiolipin. *Circ Res* 94:53-59.
21. Petrosillo G, Matera M, Moro N, Ruggiero FM, Paradies G (2009) Mitochondrial complex I dysfunction in rat heart with aging: critical role of reactive oxygen species and cardiolipin. *Free Rad Biol Med* 46:88-94.

22. Hinkle PC (2005) P/O ratios of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 1706:1-11.

Chapitre 5 : Discussion générale

Afin de déterminer les effets de l'EPA sur la santé cardiovasculaire et leur modulation par le stress oxydant, ma thèse a porté sur l'étude de 3 situations différentes : l'obésité, le diabète sucré et le sepsis précoce. La première se caractérise par l'absence de stress oxydant à court et moyen terme. Cet état peut évoluer vers l'installation d'une insulino-résistance favorisant le déclenchement d'un diabète sucré de type 2 et d'une hyperglycémie associée alors à un stress oxydant sévère et chronique. Le sepsis précoce est, quant à lui, caractérisé par une phase initiale de stimulation de la fonction cardiaque qui nous a permis d'obtenir un modèle de stress oxydant d'intensité faible voire modérée. L'étude de l'association ou non d'agents antioxydants avec les AGPI ω 3 dans ces différentes situations a mis en lumière plusieurs constats : i) un surdosage en antioxydants comme l'association vitamine E + CoQ10 peut s'avérer délétère en aboutissant à un effet pro-oxydant, même au cours de l'obésité abdominale qui est caractérisée par une amélioration du statut oxydant ; ii) à l'inverse, une situation de stress oxydant sévère et chronique comme le diabète sucré a démontré un impact mortel d'un enrichissement en EPA alors que l'association de ce nutriment avec un extrait de thé vert a aboli cet effet tout en offrant un meilleur maintien de la fonction cardiaque ; iii) le cas d'un niveau intermédiaire de stress oxydant comme le sepsis précoce peu intense a mis en évidence des effets antioxydant et cardio-protecteur de l'EPA en préservant la fonction mitochondriale. Les résultats obtenus dans ces études animales vont nous conduire à étudier l'effet de l'EPA associé à un antioxydant adéquat sur le fonctionnement des mitochondries cardiaques humaines dans différentes situations pathologiques. Pour cela, nous avons d'abord adapté notre protocole d'extraction de ces organites du cœur de rat au tissu atrial humain. Après l'étape de validation, la méthode mise au point ouvre des perspectives nouvelles pour l'étude de la santé cardiovasculaire, en particulier dans le cadre de l'obésité et de l'endocardite aiguë humaines.

5.1 Effets du niveau de stress oxydant associés aux maladies métaboliques sur la fonction cardiovasculaire.

5.1.1 Relations entre l'obésité, le stress oxydant et la santé cardiovasculaire

Dans le cadre du régime obésogène de l'étude présentée dans la **Publication n°1**, les rats ne montrent pas une masse corporelle supérieure à celle des animaux nourris avec des croquettes normo-lipidiques. Ils présentent toutefois une obésité abdominale. Dans ce contexte, l'équilibre rédox de l'organisme est amélioré comme l'indiquent les valeurs des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBARS) et celles de l'activité de la SOD. Ce résultat est en accord avec des études préalables ayant démontré que l'obésité abdominale naissante réduit le stress oxydant cardiaque tout en améliorant la réactivité coronaire et, en conséquence, l'activité myocardique *in vivo* (Mourmoura et al. 2014). En parallèle, l'étude préliminaire sur les mitochondries atriales humaines (**Publication n°5**) a été réalisée sur des patients présentant un IMC moyen égal à 32,4 kg/m². Cette obésité modérée était associée à une augmentation de la proportion de masse grasse totale (36,3% vs 28,8% pour les sujets normo-pondéraux). Bien que les patients obèses présentent une hypertension, les paramètres cardiovasculaires ne montrent pas d'altération mais plutôt une tendance non significative à la stimulation. Cependant, sur le long terme, l'obésité conduit inéluctablement vers une insuffisance cardiaque suite à l'installation d'une fatigue de l'organe engendrée par des modifications structurelles et fonctionnelles (Csige et al. 2018). Les altérations sont favorisées par l'installation d'un stress oxydant suite à l'apparition d'une insulino-résistance et d'une hyperglycémie. Elles sont également induites par des complications menant au syndrome métabolique voire au diabète de type 2 qui favorise un stress oxydant important et chronique (Ginsberg et MacCallum 2009; Bagi 2009). L'ensemble de ces phénomènes a également été constaté dans la **Publication n°2**. Les patients obèses de la **Publication n°5** ne présentent pas d'insulino-résistance au vu du taux d'hémoglobine glyquée et de l'indice d'insulino-résistance HOMA-IR (pour HOMEostatic Assessment of Insulin Resistance). Ce dernier est cependant augmenté de façon non significative en raison de la participation de 2 patients diabétiques. En l'absence d'insulino-résistance et sûrement d'un stress oxydant conséquent, les patients obèses

présentent également une forte stimulation de la respiration des mitochondries cardiaques. En effet, l'utilisation d'un substrat du complexe I, le glutamate-malate, montre un état 3 et un ICR deux fois supérieurs à ceux des patients normo-pondéraux. Cela corrobore des résultats antérieurs sur les mitochondries de cœur de rat présentant une obésité abdominale : cette dernière stimule l'oxydation phosphorylante du substrat du complexe 1 (Mourmoura et al. 2016). J'ai également constaté que l'obésité humaine baisse de 62% la libération mitochondriale de ROS rapportée à la consommation d'O₂. Bien que non significatif en raison du nombre insuffisant de sujets (n = 5), ce résultat suggère un stress oxydant mitochondrial plus faible pour les patients obèses. Cette observation rejoint le constat de la **Publication n°1** qui montre l'amélioration de l'équilibre rédox dans l'obésité abdominale chez le rat.

5.1.2 Modifications induites par les composés antioxydants de l'huile de colza sur la santé cardiovasculaire dans l'obésité

En plus de la modulation du statut oxydant myocardique, l'huile de colza réduit la quantité de collagène tissulaire (**Publication n°1**). L'enrichissement avec le CoQ10 et la vitamine E annule cet effet suggérant l'installation d'une fibrose tissulaire. Celle-ci survient suite à la stimulation de l'expression du récepteur 1b à l'angiotensine 2 (Ag2R-1b). En effet, la surexpression de ce récepteur conduit à une vasoconstriction coronaire favorisant l'apparition de phénomènes hypoxiques (Oniki et al. 2006; Granado et al. 2014). L'ajout de canolol bloque cet impact délétère de la vitamine E associée au CoQ10 : les expressions de l'Ag2R-1b et de la SOD2 sont normalisées traduisant l'absence du développement d'une fibrose et une possible protection de l'intégrité mitochondriale. L'enrichissement vitamine E + CoQ10 accroît significativement les triglycérides cardiaques alors que l'ajout de canolol normalise cette teneur par rapport à celle des animaux sous régime normo-lipidique. L'ajout de canolol permet également d'améliorer le profil myocardique des diacylglycérols, des AGNE et du cholestérol total par rapport aux animaux sous régime normo-lipidique. Il a été démontré que le canolol présente une capacité à stimuler l'activité de l'Akt et de la MAPK p38 dans le muscle squelettique, mais aussi celle de l'AMPK dans le tissu adipeux sous-cutané lors d'un régime obésogène (Capel et al. 2018). Ceci permet de réduire l'intolérance au glucose et d'améliorer la sensibilité à l'insuline. Cependant, ces effets n'ont été constatés

que sur un court terme. S'ils se maintiennent dans la durée, l'effet bénéfique du canolol pourrait être conséquent en freinant l'apparition du syndrome métabolique voire du diabète de type 2 associés à un stress oxydant induit par l'insulino-résistance et l'hyperglycémie (Ginsberg et MacCallum 2009; Bagi 2009).

5.1.3 Impact de l'huile de colza et de ses composés antioxydants sur le statut oxydant dans l'obésité

La **Publication n°1** montre que l'enrichissement en huile de colza améliore le statut oxydant au vu de l'augmentation du taux des groupements thiols plasmatiques par rapport au régime ne contenant que l'huile de palme. Ceci peut s'expliquer par la présence d'ALA qui améliore le profil en acides gras des phospholipides membranaires en réduisant la part d'ARA, en augmentant celle des ω 3-LC et en favorisant la baisse du rapport ω 6/ ω 3. Cependant, l'ajout de CoQ10 et de vitamine E accroît le stress oxydant comme l'indiquent l'élévation de l'activité de la GPx et l'augmentation de l'expression des gènes de la catalase, de la GPX4 et de la SOD2. Cette dernière modification suggère une stimulation de la production mitochondriale des ROS malgré le bénéfice attendu par l'obésité abdominale. Ces résultats démontrent que, même dans une situation où le stress oxydant est absent ou réduit par rapport à celui des animaux témoins, une capacité pro-oxydante de composés qualifiés d'antioxydants comme la vitamine E et le CoQ10 peut émerger lorsqu'ils sont administrés en doses trop élevées. Ceci confirme certaines études antérieures sur l'effet mitochondrial de la vitamine E (Meynier et al. 2003). De plus, dans de nombreuses études, les oméga 3 ont été comparés ou combinés avec de la vitamine E. L'ajout de vitamine E peut expliquer les effets neutres ou délétères des ω 3, en particulier par rapport au stress oxydant (« Dietary Supplementation with N-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Vitamin E after Myocardial Infarction: Results of the GISSI-Prevenzione Trial. Gruppo Italiano per Lo Studio Della Sopravvivenza Nell'Infarto Miocardico » 1999; Alves Luzia et al. 2015; Li et al. 2019). L'absence d'effet bénéfique de l'association ω 3 et vitamine E dans les régimes alimentaires peut être également due à une quantité insuffisante de vitamine E. En effet, cette dernière a souvent été ajoutée en dose juste suffisante pour éviter la peroxydation lipidique dans les régimes alimentaires, mais pas forcément pour induire un réel effet antioxydant dans l'organisme entier. Une dose plus appropriée aurait pu protéger les AGPI ω 3 une fois ingérés et intégrés aux phospholipides cardiaques contre la peroxydation lipidique endogène.

Le choix de l'antioxydant et de sa dose en fonction de la situation physiopathologique et, en particulier, du niveau de stress oxydant revêt donc un aspect essentiel dans l'élaboration des recommandations nutritionnelles.

5.2 Modulation de l'impact cardiaque de l'EPA par un extrait de thé vert dans un modèle de stress oxydant chronique sévère : le diabète sucré.

5.2.1 Choix des enrichissements pour l'étude des conséquences du stress oxydant dans le diabète sucré

Il a été constaté que les AGPI ω 3 peuvent présenter un impact délétère dans le cadre du diabète de type 2 (Li 2015). Cet effet est certainement dû à l'altération de ces acides gras par le mécanisme de peroxydation lipidique dans cette situation de stress oxydant intense qu'est le diabète de type 2 (Ramana, Srivastava, et Singhal 2017). Notre hypothèse soutient que les ω 3-LC nécessitent donc une association avec un composant qui présente des propriétés anti-oxydantes au niveau de l'organisme entier. Au vu de l'effet délétère possible de la vitamine E et du CoQ10 (**Publication n°1**) et du manque de données sur les effets cardiaques du canolol en situation de stress oxydant intense, le choix d'un autre agent à administrer dans le cadre du diabète sucré s'est avéré nécessaire. Le choix s'est axé sur un extrait de thé vert pour plusieurs raisons : i) le thé vert a montré des effets bénéfiques sur le cœur et les mitochondries (Liu et al. 2014; Oyama et al. 2017); ii) il présente un effet hypolipémiant intéressant en plus de ses propriétés anti-oxydantes (Tenore et al. 2015); iii) il favorise la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline (Ortsäter et al. 2012; Jang, Ridgeway, et Kim 2013) ; iv) l'EGCG du thé vert est hydrosoluble et favorise sûrement la détoxification radicalaire des radeaux lipidiques alors que le canolol, à l'image de la vitamine E et du CoQ10, est un composé hydrophobe ne favorisant sûrement pas une bonne détoxification membranaire en situation de stress oxydant sévère (Alves Luzia et al. 2015; Li et al. 2019) ; v) le thé vert est un produit d'utilisation courante dont l'association avec l'EPA retrouvé dans les produits marins présente un intérêt majeur, d'un point de vue tant préventif que curatif vis-à-vis des diabétiques non diagnostiqués (Zhang et al. 2015; « IDF Diabetes Atlas - 2017 Atlas » s. d.; « Les chiffres du diabète en France » s. d.).

Bien que l'huile de colza soit riche en ALA, l'EPA apparait comme un meilleur acteur cardio-protecteur au vu de la littérature (Eclöv et al. 2015). La dose d'EPA a été déterminée en fonction de la littérature. En l'occurrence, un apport optimal en ω 3-LC est compris entre 1 à 2% de l'apport énergétique total chez l'animal (De Caterina et Zampolli 2001). Pour notre étude, nous nous sommes basés sur un apport de 2% (soit 720 mg/kg/jour). Cette dose équivaut environ à 8 g d'EPA par jour chez l'Homme (Nair et Jacob 2016). Le choix de cette quantité pouvant sembler importante est justifiée par plusieurs raisons : i) le métabolisme du rat est beaucoup plus actif que celui de l'humain et il est nécessaire d'augmenter la dose apportée à l'animal pour simuler l'effet obtenu chez l'Homme ; ii) des études cliniques dans le cadre d'un diabète de type 2 ont montré l'absence d'amélioration endothéliale pour des doses comprises entre 1,7 et 3,8 g par jour d'EPA et/ou de DHA (Woodman et al. 2003; Stirban et al. 2010; Wong et al. 2010) ; iii) l'EPA étant sensible au stress oxydant, il est possible que plus la dose administrée est élevée plus l'impact est négatif. Ainsi, une dose importante est préférable afin de mettre en lumière un véritable effet protecteur de l'agent antioxydant.

5.2.2 Effets de l'EPA et du thé vert sur le stress oxydant du diabète sucré.

Le stress oxydant joue un rôle fondamental dans le diabète. Dans notre étude, la pathologie a conduit à des niveaux élevés de carbonylation des protéines mitochondriales comme le confirment les données de la littérature (Dennis et al. 2013; Nath, Ghosh, et Choudhury 2017). Le taux élevé d'acétylation de la SOD2 est responsable de ce phénomène : les anions superoxydes ne sont pas totalement détoxifiés en H_2O_2 et ils causent des dommages moléculaires conséquents aux mitochondries. La nitrotyrosination des protéines mitochondriales est réduite par le diabète par rapport au groupe sous régime normo-lipidique et rétablie au-dessus du contrôle dans les deux groupes enrichis en thé vert ou en EPA + thé vert. Cette réaction résulte de l'interaction entre le NO et les anions superoxydes qui conduisent à la formation de peroxy-nitrites réagissant avec les résidus tyrosine des protéines cellulaires. Nos résultats montrent que la formation de NO est probablement faible dans le contexte d'oxydation élevée des animaux diabétiques. Dans le diabète, la NO synthase est découplée en raison de la diminution du potentiel redox. Cela augmente la formation d'anions superoxydes au détriment du NO (Thum et al. 2007; Luo et al. 2014). En revanche, la synthèse du NO est probablement plus élevée dans les deux

groupes fortifiés ce qui suggère une diminution du stress oxydant. Les taux similaires de carbonylation protéique dans les trois groupes hyperglycémiques peuvent résulter d'une saturation des sites susceptibles d'être carbonylés. Les informations concernant le stress oxydant et l'activité NO synthase sont confirmées par le statut inflammatoire. Dans le diabète, le stress oxydant favorise l'inflammation en activant la voie NF- κ B suite à la libération et à la dégradation d'I κ B α . I κ B α est réduit chez les animaux diabétiques mais l'enrichissement en extrait de thé vert empêche cette baisse et donc limite l'inflammation. L'association ou non avec l'EPA ne module pas ces phénomènes inflammatoires.

Les modifications du stress oxydant et de la disponibilité en NO peuvent jouer un rôle fondamental sur la réactivité coronaire. Cette dernière dépend de l'activité de deux types de cellules vasculaires : les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. Les premières libèrent des agents vasoactifs (NO, prostacycline, thromboxane, etc.) qui régulent le tonus des cellules musculaires lisses. Dans ce travail, les deux types de cellules vasculaires ont été endommagés au vu des vasodilatations endothéliale-dépendante et -indépendante. Une diminution de la disponibilité du NO due au stress oxydant explique parfaitement la réduction de l'activité vasodilatatrice des cellules endothéliales dans les trois groupes de rats diabétiques par rapport aux animaux sains. Notre étude montre une baisse de l'expression myocardique de la NOX1 en cas d'ajout d'extrait de thé vert. La NOX1 est exprimée par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les cellules adventitielles du système vasculaire. Elle favorise le dysfonctionnement endothélial et l'hypertrophie des cellules musculaires lisses par la libération d'O₂⁻ (Konior et al. 2014). Son activité est stimulée en cas d'hyperglycémie et d'hyperlipidémie (Jansen et al. 2013). L'effet hypolipémiant du thé vert, déjà décrit dans la littérature (Kao et al. 2006; Lee, Kim, et Kim 2009), est confirmé dans notre étude en situation diabétique comme le montrent les taux de lipides circulants. Cette propriété a ainsi freiné l'expression de la protéine NOX1 mais aussi protégé les cellules vasculaires et la réactivité coronaire. De plus, une légère amélioration de l'activité vasodilatatrice des cellules endothéliales a été constatée avec la combinaison des deux enrichissements contrairement aux animaux diabétiques avec ou sans l'administration de thé vert. D'autres agents vasoactifs tels que les prostaglandines et les leucotriènes peuvent être responsables de l'amélioration de l'activité vasodilatatrice des cellules endothéliales.

5.2.3 Modifications du métabolisme intermédiaire

L'hyponatrémie et l'hypochlorémie constatées suggèrent une situation d'acidocétose déclarée chez nos animaux diabétiques (Engelking 2015). Ce phénomène est connu pour induire une bêta-oxydation incomplète dans le cadre d'un diabète sucré (Ahn, Kang, et Jeung 2017). Il en résulte une acidose cellulaire qui peut être renforcée par une glycolyse anaérobie excessive puisque l'oxydation du pyruvate est partiellement bloquée par le diabète. Ce dernier point est confirmé dans notre étude comme l'indique la surexpression de la PDK4. Cependant, l'ajout de thé vert favorise la β -oxydation des acides gras au vu des taux de lysine acétylée dans le myocarde et les mitochondries. Alors que les hausses de l'acétylation de la lysine et de la β -oxydation sont connues pour être délétères dans l'obésité et le diabète de type 2 (Fukushima et Lopaschuk 2016), elles semblent bénéfiques dans notre étude. Ceci est probablement dû à l'EGCG présent dans le thé vert qui protège de la peroxydation lipidique et favorise le métabolisme des acides gras (Skrzydowska et al. 2002; Casanova et al. 2019). Il est connu que l'utilisation du glucose en tant que substrat énergétique est préférable à celle des acides gras en situation d'atteinte cardiaque. En effet, le glucose offre un meilleur rendement en terme de production d'ATP par molécule de carbone oxydé (Nagoshi et al. 2011). Cependant, dans la durée, le métabolisme lipidique devient limitant pour maintenir une production d'énergie suffisante dans le cadre du diabète de type 2 suite à l'altération lipidique. Une β -oxydation maintenue intense et une protection des lipides semblent donc essentielles dans cette situation.

5.2.4 Réflexion sur la survie des animaux

Bien que le diabète entraîne une hausse de la mortalité chez nos animaux, l'enrichissement en EPA accroît de façon drastique ce phénomène. L'EPA se caractérise donc par un effet négatif radical dans ce modèle de diabète mellitus et de stress oxydant important, tout comme un apport en $\omega 3$ s'est avéré pro-arythmique dans l'ischémie/reperfusion sévère (Demaison et al. 2019). La santé cardiaque est altérée dans le diabète comme le montre la réactivité coronaire. Cependant, l'enrichissement en thé vert compense partiellement ce phénomène et encore plus lors de son association avec l'EPA. Le taux de carbonylation mitochondriale est pourtant identique dans tous les groupes diabétiques. Ces éléments suggèrent que la santé cardiaque ne dépend donc pas uniquement du niveau de stress oxydant

tissulaire. Il est fort probable que le niveau d'acidose joue un rôle majeur au vu des résultats constatés avec l'expression de NHE1 et NCX1 ainsi que leur impact sur la signalisation calcique (Matteucci, Rizvi, et Giampietro 2001; Karmazyn, Sostaric, et Gan 2001). L'épicatéchine du thé vert inhibe partiellement NHE1 et limite l'accumulation intracellulaire de Ca^{2+} . Ceci freine les phénomènes d'apoptose et de fibrose comme le montre le taux de collagène myocardique dans le groupe EPA + thé vert. Il apparaît donc qu'un maintien approprié de l'homéostasie calcique permet de préserver la survie des cardiomyocytes. Tous ces éléments suggèrent que la cause de la mort des animaux soumis à un enrichissement en EPA seul n'est pas une défaillance cardiaque. Une déshydratation tissulaire est caractérisée par une perte de l'élasticité de la peau. Ce phénomène a été constaté rapidement suite à l'injection de streptozotocine chez ces animaux. L'hyperglycémie diabétique avec déficit en insuline est connue pour favoriser une hyperosmolarité entraînant la plasmolyse et donc la déshydratation des tissus. Le phénomène est caractérisé par l'hypochlorémie et l'hyponatrémie en cas d'acidose diabétique comme dans notre étude (Engelking 2015). L'ajout d'EPA a pu exacerber de tels processus qui ont probablement altéré le fonctionnement d'autres organes comme le rein notamment. Une étude avec un effectif plus important aurait sans doute permis de discerner des différences significatives vis-à-vis de la survie des animaux entre les autres groupes diabétiques.

L'enrichissement alimentaire en extrait de thé vert améliore la fonction cardiaque par deux mécanismes : l'amélioration de la production de NO et l'inhibition probable de NHE1 par l'épicatéchine. L'ajout d'EPA dans le régime alimentaire provoque le décès des rats diabétiques mais son association avec le thé vert supprime l'acidose, établit un profil favorable en AGPI dans les phospholipides cardiaques et améliore la santé cardiaque en optimisant la réactivité coronaire et en limitant la fibrose. Le mécanisme exact par lequel l'EPA augmente le taux de mortalité dans la situation diabétique reste à élucider.

L'étude décrite dans la **Publication n°1** montre également un effet anti-fibrotique de l'huile de colza. Cette huile est riche en ALA, précurseur des ω 3-LC. Il a été constaté que seul l'EPA et non le DHA prévient la fibrose dans l'insuffisance cardiaque induite par une surcharge de pression (Eclöv et al. 2015). Il est donc possible que l'apport en ALA grâce à l'huile de colza limite la fibrose en favorisant la synthèse d'EPA dans notre modèle d'obésité.

5.3 Implication du statut oxydant et de l'EPA sur la santé cardiaque en situation infectieuse.

5.3.1 Effets d'un régime carencé en ω 3 dans le cas du sepsis précoce associé à un faible stress oxydant

Après avoir étudié des situations de stress oxydant faible ou sévère, l'étude dans un cas intermédiaire était nécessaire. La validation d'un modèle de sepsis précoce par ligature et perforation cæcales a donc été réalisée (**Publication n°3**). Il a conduit à l'initiation de l'inflammation du myocarde, constatée au vu de l'expression génique des cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-1 β . Cependant, le sepsis précoce n'a montré ni réduction de la fonction myocardique ni installation d'un stress oxydant. Au contraire, une baisse de certains paramètres du statut oxydant comme la GPx plasmatique et le taux de GSSG myocardique indique une amélioration de l'équilibre rédox. Ce phénomène est similaire à ce qui est observé dans le cadre de l'obésité (**Publication n°1**). Le sepsis précoce et l'obésité sont deux situations présentant une stimulation de la fonction cardiaque (Flynn, Chokkalingam Mani, et Mather 2010; Mourmoura et al. 2014). Ces observations suggèrent que cette stimulation en conditions pathologiques est associée non seulement à une absence de stress oxydant mais également à une baisse du statut oxydant du cœur et de l'organisme.

Dans l'étude présentée dans la **Publication n°4**, le sepsis précoce a été déclenché par une ligature et une perforation cæcales chez des rats soumis à un régime carencé en AGPI ω 3 afin de modéliser un régime de type occidental (Calder 2003; Micha et al. 2014). L'initiation de l'inflammation a aussi été constatée avec une dégradation d'I κ B α . Ce phénomène est connu pour stimuler l'activation de la voie NF- κ B (Gupta et al. 2010) et la libération de cytokines pro-inflammatoires, observée en l'occurrence dans notre étude avec l'augmentation de l'expression d'IL-1 β . Contrairement à la **Publication n°3** où les prélèvements ont été effectués 24h après le déclenchement du sepsis, l'expression du TNF- α n'est pas augmentée dans cette étude dont les analyses biochimiques ont été réalisées sur du matériel biologique récupéré 48h après l'opération. Les phénomènes observés de stimulation de la réaction inflammatoire résultent probablement du délai entre la chirurgie et les mesures. En effet, on sait que le TNF- α plasmatique augmente rapidement

durant les premières 6h suite à l'apparition d'une agression. Ensuite, sa concentration atteint un plateau avant de s'abaisser à partir de 24h post-agression (Duerrschmid et al. 2015; Rütten et al. 2016). Nos mesures effectuées 48h après la chirurgie sont probablement trop tardives pour observer une élévation de la concentration en TNF- α . En parallèle, l'activité totale de la SOD est légèrement stimulée par le sepsis précoce mais sans modification de l'expression des ARNm des SOD1 et SOD2. Ceci confirme l'apparition d'un niveau faible voire modéré de stress oxydant. Ce constat est conforté par l'activité cardiaque qui ne présente pas de dégradation mais au contraire une tendance à la stimulation au vu de la contractilité mesurée par IRM. Il est important de noter que l'évaluation des paramètres cardiaques *in vivo* par IRM a été effectuée sur des rates anesthésiées. Une estimation dans une condition d'activité plus intense aurait probablement mis en évidence une différence significative de la vitesse de contraction. Une stimulation de la fonction cardiaque est typique d'un stade précoce du sepsis associé à la phase hyper-dynamique de cette pathologie (Flynn, Chokkalingam Mani, et Mather 2010).

Malgré l'absence d'atteinte de l'activité cardiaque, une altération de la fonction mitochondriale est en revanche constatée. En effet, une chute des paramètres de l'oxydation phosphorylante et une augmentation de la libération des ROS rapportée à la consommation d'oxygène ont été observées chez ces animaux. Les effets affectent particulièrement le complexe I de la chaîne respiratoire mais touchent néanmoins le complexe II et le métabolisme mitochondrial lié à un substrat lipidique comme le palmitoylcarnitine-malate. L'altération de la fonction mitochondriale est probablement reliée à une ouverture accrue du PTPm (Bernardi et al. 2015; Briston et al. 2017). Ceci démontre qu'une dysfonction mitochondriale apparaît dès le début du sepsis précoce et favorise probablement le développement d'une insuffisance cardiaque ultérieure due à l'augmentation de la sévérité de la pathologie. L'atteinte mitochondriale et principalement l'altération du métabolisme énergétique caractérisée par la baisse de la production d'ATP est déjà connue en situation infectieuse (Vanasco et al. 2012). Elle ne semble pas accompagnée d'une modification de la voie glycolytique au vu des niveaux d'expression des ARNm des enzymes de la glycolyse.

5.3.2 Impact de l'EPA par rapport au régime de type occidental carencé en ω 3

Chez les animaux sains, le régime enrichi en EPA ne modifie ni l'activité cardiaque ni la fonction mitochondriale. En revanche, des modifications métaboliques sont tout de même constatées. En effet, la diminution des ARNm de la PDK4 et la baisse du taux d'acétylation de la lysine traduisent respectivement une hausse de la glycolyse aérobie au détriment de la β -oxydation. Ceci représente un métabolisme favorable pour la protection cardiaque (Fillmore et Lopaschuk 2013; Hyndman et Knepper 2017). Le taux d'UCP3 est augmenté avec l'EPA. Cette protéine découplante est connue pour réduire le taux matriciel d'acyl-CoA en l'expulsant hors des mitochondries, favorisant alors le couplage de la β -oxydation à l'oxydation phosphorylante (Bézaire et al. 2001; Pohl et al. 2019). Dans notre étude, une amélioration EPA-dépendante du couplage de l'oxydation phosphorylante du palmitoylcarnitine est constatée avec une hausse de l'ICR. Autrement dit, l'UCP3 réduit la production de ROS liée à une teneur élevée en acylCoA dans la matrice et, de ce fait, prévient l'ouverture partielle du PTPm et le découplage mitochondrial. Une forte tendance à l'augmentation d'UCP3 est également constatée suite à l'enrichissement en EPA et en thé vert dans l'étude sur le diabète sucré (**Publication n°2**) ce qui semble confirmer notre théorie sur l'effet favorable d'une β -oxydation efficiente. Il faut préciser que le taux de mortalité a réduit la taille de l'échantillonnage et qu'un panel plus important d'animaux aurait sans doute rendu ce résultat significatif. La β -oxydation est également liée à la nature des acides gras utilisés. En effet, un acide gras saturé comme l'acide palmitique paraît plus toxique que l'EPA en favorisant des phénomènes inflammatoires et d'apoptose (Soumura et al. 2010). Ceci est associé à une chute de la teneur en Sirt3, mais une expression stimulée de cette déacétylase contrebalance ces phénomènes délétères en réduisant la production mitochondriale de ROS et l'inflammation (Koyama et al. 2011). Cette enzyme est connue pour être réduite en cas d'insuffisance cardiaque (Hsu et al. 2009; Pillai et al. 2015). Dans notre étude, chez les animaux sains, l'EPA stimule l'expression génique de la Sirt3. Outre son implication dans le métabolisme énergétique (Sol et al. 2012; Rardin et al. 2013), l'activité déacétylase de cette enzyme est également connu pour limiter l'hyper-acétylation de la SOD2 favorisant la lutte contre le stress oxydant et l'inflammation (Chen et al. 2013 ; Dikalova et al. 2017). Nous notons effectivement que l'expression du TNF- α et de la SOD2 sont réduites par l'enrichissement en EPA sans que l'activité totale de la SOD soit altérée. Ceci montre donc que l'EPA améliore les profils oxydatif et inflammatoire ainsi que le

métabolisme énergétique avec comme déterminant majeur la teneur en UCP3. Ces mécanismes permettent de pré-conditionner le cœur vis-à-vis d'agressions ultérieures éventuelles.

Dans le cadre du sepsis, contrairement aux animaux carencés en ω 3, l'EPA permet le maintien des niveaux de respiration mitochondriale, de production d'ATP et réduit la libération de ROS normalisée à la consommation d' O_2 . L'amélioration de la fonction mitochondriale est associée à une élévation du taux de lysine acétylée signifiant une hausse de la β -oxydation par rapport aux animaux sains. Elle s'accompagne d'une augmentation des teneurs en Sirt3 et en UCP3. Cela suggère qu'en situation de sepsis précoce, l'apport d'AGPI ω 3-LC comme l'EPA favorise un couplage de la β -oxydation avec l'oxydation phosphorylante tout en évitant une utilisation délétère des acides gras. Ce même constat peut être évoqué dans le cadre de la **Publication n°2**, malgré l'absence de significativité justifiée préalablement pour l'augmentation des taux d'UCP3 et de Sirt3. De plus, l'enrichissement en EPA dans notre modèle de sepsis précoce limite le stress oxydant mitochondrial en réduisant l'expression de la SOD2 par rapport aux animaux carencés mais aussi par rapport aux rats sains traités à l'EPA. Ceci s'explique par un taux de Sirt3 plus élevé qui accroît l'activité de la SOD2 par déacétylation sans nécessiter une surexpression de l'enzyme. L'initiation de l'inflammation dans le sepsis précoce est également ralentie par l'EPA comme le montre le taux plus élevé d'I κ B α et l'expression plus faible de l'IL-1 β .

Les observations effectuées lors de cette étude et celles réalisées dans la **Publication n°2** semblent confirmer le rôle important d'une β -oxydation maintenue élevée dans les situations pathologiques, notamment en la présence d'un stress oxydant faible ou sévère et chronique. Le phénomène paraît lié à la qualité des acides gras membranaires mais aussi au maintien de la fonction mitochondriale favorisée par la stimulation de l'expression EPA-dépendante de l'UCP3 et de la Sirt3. L'acide gras agirait en limitant le stress oxydant et l'inflammation.

Chapitre 6 : Conclusion & Perspectives

Les études présentées dans le cadre de ma thèse mettent en avant des effets induits par l'EPA influencés par le niveau de stress oxydant (Figure 38). En conditions physiologiques, cet AGPI ω 3-LC pré-conditionne le cœur en installant un métabolisme énergétique cardio-protecteur caractérisé par une hausse de la glycolyse au détriment de la β -oxydation tout en favorisant le couplage de l'oxydation des acides gras vis-à-vis de la production mitochondriale d'ATP. L'EPA permet également d'améliorer le statut oxydant et de limiter l'inflammation. En situation de stress oxydant faible, l'EPA présente ces propriétés mais offre également une protection contre l'atteinte mitochondriale préalable à l'insuffisance cardiaque. Ceci se traduit par un maintien de l'oxydation phosphorylante et une limitation de la libération des ROS par les mitochondries. L'effet bénéfique est également lié à une amélioration de l'expression d'acteurs mitochondriaux tels que la SOD2, l'UCP3 et la Sirt3. Dans le cas d'un stress oxydant sévère et chronique comme dans celui du diabète sucré associé à un régime obésogène, l'EPA est radicalement délétère en accroissant la mortalité des animaux. En revanche, l'association avec un agent antioxydant approprié comme le thé vert révèle une capacité cardio-protectrice. En effet, l'EPA combiné au thé vert limite le risque d'apparition d'une fibrose cardiaque et compense grandement l'altération de la réactivité coronaire. Ces effets sont favorisés par la limitation des conséquences de l'acidose via l'expression de NCX1 et NHE1 et un maintien de l'homéostasie calcique. Un métabolisme énergétique privilégiant une β -oxydation de qualité est retrouvé dans le cadre d'un stress oxydant sévère tel que le diabète mais cela nécessite une protection contre la peroxydation lipidique. En résumé, l'EPA présente un réel potentiel cardioprotecteur mais il peut devenir délétère dans le cas d'un stress oxydant important. L'association avec un antioxydant adapté au contexte et administré en quantités adéquates est alors indispensable.

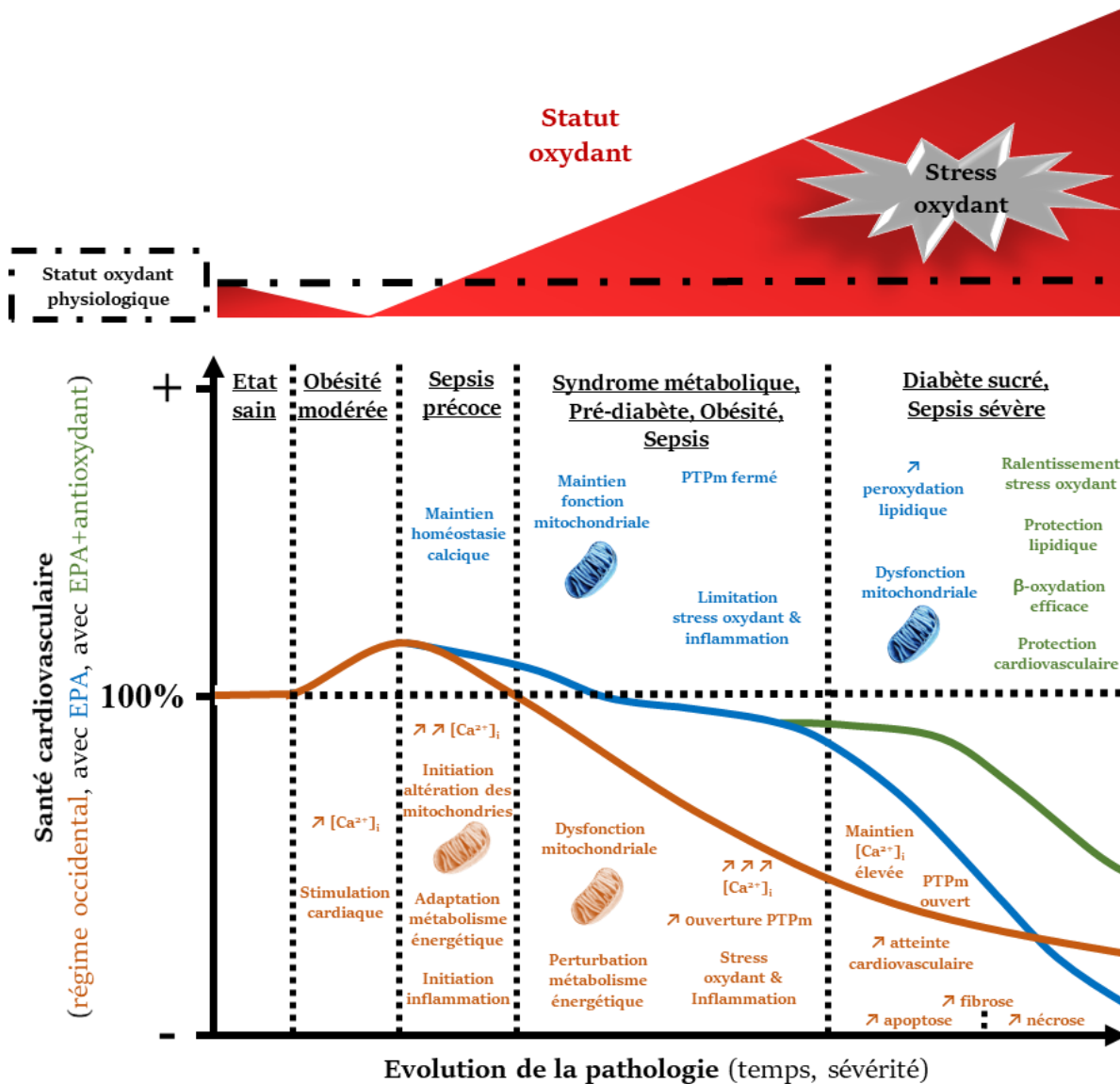


Figure 38 : Schéma récapitulatif de l'influence du niveau de stress oxydant et de l'EPA sur la santé cardiaque. Avec un régime occidental carencé en $\omega 3$, une phase initiale de perturbations métaboliques favorise une stimulation cardiaque et une amélioration du statut oxydatif. L'aggravation de la pathologie perturbe l'homéostasie calcique et altère la fonction mitochondriale sans réduire la fonction myocardique grâce à une adaptation du métabolisme énergétique (une hausse de la glycolyse anaérobie). L'apparition d'un stress oxydant conduit à des dysfonctions mitochondriale et cardiaque associées à des phénomènes inflammatoires. L'augmentation du stress oxydant conduit à une insuffisance cardiaque. Un enrichissement en EPA permet un maintien de l'homéostasie calcique et de la fonction mitochondriale en limitant le stress oxydant et les phénomènes inflammatoires mais apparait délétère avec un stress oxydant intense. L'association d'EPA et d'antioxydant freine l'accroissement du stress oxydant et protège la santé cardiovasculaire. (Source : Thibault Leger)

Les résultats obtenus offrent les perspectives d'étendre l'utilisation de cet ω 3-LC d'intérêt associé à un antioxydant dans la prévention et le traitement de nombreuses situations d'atteintes cardiovasculaires. Des études chez l'Homme sont incontournables car les dysfonctionnements mitochondriaux surviennent préalablement à l'insuffisance cardiaque et la favorise. Dans le but d'étudier le fonctionnement des mitochondries cardiaques humaines, nous avons adapté nos méthodes d'extraction et d'analyse utilisées chez le rat à l'étude de rejections atriales fraîches obtenues lors de circulations extracorporelles. Les objectifs futurs consistent à déterminer : i) l'impact de l'obésité et de l'endocardite aiguë humaines sur la fonction mitochondriale cardiaque ; ii) les effets bénéfiques potentiels de l'EPA et de son association avec un antioxydant adapté sur ces modifications ; et iii) des biomarqueurs sanguins potentiels permettant de mettre en lumière une atteinte mitochondriale en amont de l'apparition d'une insuffisance cardiaque. Cette dernière perspective offrirait la possibilité d'améliorer la prise en charge des patients à l'aide d'une simple prise de sang.

Références bibliographiques

- Abel, E. Dale. 2004. « Glucose Transport in the Heart ». *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 9 (janvier): 201-15. <https://doi.org/10.2741/1216>.
- Adachi, Kengo, Kazuhiro Oiwa, Takayuki Nishizaka, Shou Furuike, Hiroyuki Noji, Hiroyasu Itoh, Masasuke Yoshida, et Kazuhiko Kinosita. 2007. « Coupling of Rotation and Catalysis in F(1)-ATPase Revealed by Single-Molecule Imaging and Manipulation ». *Cell* 130 (2): 309-21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.020>.
- Adameova, Adriana, et Naranjan S. Dhalla. 2014. « Role of Microangiopathy in Diabetic Cardiomyopathy ». *Heart Failure Reviews* 19 (1): 25-33. <https://doi.org/10.1007/s10741-013-9378-7>.
- Adeghate, Ernest, et Jaipaul Singh. 2014. « Structural Changes in the Myocardium during Diabetes-Induced Cardiomyopathy ». *Heart Failure Reviews* 19 (1): 15-23. <https://doi.org/10.1007/s10741-013-9388-5>.
- Adkins, Yuriko, et Darshan S. Kelley. 2010. « Mechanisms Underlying the Cardioprotective Effects of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids ». *The Journal of Nutritional Biochemistry* 21 (9): 781-92. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.12.004>.
- Aerni-Flessner, Lauren, Melissa Abi-Jaoude, Amanda Koenig, Maria Payne, et Paul W. Hruz. 2012. « GLUT4, GLUT1, and GLUT8 Are the Dominant GLUT Transcripts Expressed in the Murine Left Ventricle ». *Cardiovascular Diabetology* 11 (juin): 63. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-11-63>.
- Ahn, Changhwan, Ji-Houn Kang, et Eui-Bae Jeung. 2017. « Calcium Homeostasis in Diabetes Mellitus ». *Journal of Veterinary Science* 18 (3): 261-66. <https://doi.org/10.4142/jvs.2017.18.3.261>.
- Aikens, J., et T. A. Dix. 1991. « Perhydroxyl Radical (HOO.) Initiated Lipid Peroxidation. The Role of Fatty Acid Hydroperoxides ». *The Journal of Biological Chemistry* 266 (23): 15091-98.
- Ait-Aissa, Karima, Scott C. Blaszkak, Gisela Beutner, Shirng-Wern Tsaih, Garrett Morgan, Janine H. Santos, Michael J. Flister, et al. 2019. « Mitochondrial Oxidative Phosphorylation Defect in the Heart of Subjects with Coronary Artery Disease ». *Scientific Reports* 9 (1): 7623. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43761-y>.
- Akhmedov, Alexander T., Vitalyi Rybin, et José Marín-García. 2015. « Mitochondrial Oxidative Metabolism and Uncoupling Proteins in the Failing Heart ». *Heart Failure Reviews* 20 (2): 227-49. <https://doi.org/10.1007/s10741-014-9457-4>.
- Albert, Benjamin B., David Cameron-Smith, Paul L. Hofman, et Wayne S. Cutfield. 2013. « Oxidation of Marine Omega-3 Supplements and Human Health ». *BioMed Research International* 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/464921>.
- Al-Gubory, Kais H. 2012. « Mitochondria: Omega-3 in the Route of Mitochondrial Reactive Oxygen Species ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44 (9): 1569-73. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.06.003>.
- Alkaitis, Matthew S., et Mark J. Crabtree. 2012. « Recoupling the Cardiac Nitric Oxide Synthases: Tetrahydrobiopterin Synthesis and Recycling ». *Current Heart Failure Reports* 9 (3): 200-210. <https://doi.org/10.1007/s11897-012-0097-5>.
- Alp, Nicholas J., et Keith M. Channon. 2004. « Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase by Tetrahydrobiopterin in Vascular Disease ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24 (3): 413-20. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000110785.96039.f6>.

- Álvarez-Herms, J., S. Julià-Sánchez, H. Gatterer, C. Blank, F. Corbi, T. Pagès, M. Burtscher, et G. Viscor. 2016. « Anaerobic Training in Hypoxia: A New Approach to Stimulate the Rating of Effort Perception ». *Physiology & Behavior* 163: 37-42. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.04.035>.
- Alves Luzia, Liania, José Mendes Aldrighi, Nágila Raquel Teixeira Damasceno, Geni Rodrigues Sampaio, Rosana Aparecida Manólio Soares, Isis Tande Silva, Ana Paula De Queiroz Mello, Antonio Augusto Ferreira Carioca, et Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres. 2015. « FISH OIL AND VITAMIN E CHANGE LIPID PROFILES AND ANTI-LDL-ANTIBODIES IN TWO DIFFERENT ETHNIC GROUPS OF WOMEN TRANSITIONING THROUGH MENOPAUSE ». *Nutricion Hospitalaria* 32 (1): 165-74. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.32.1.9079>.
- Anderson, Ethan J., Kathleen A. Thayne, Mitchel Harris, Saame Raza Shaikh, Timothy M. Darden, Daniel S. Lark, John Mark Williams, W. Randolph Chitwood, Alan P. Kypson, et Evelio Rodriguez. 2014. « Do Fish Oil Omega-3 Fatty Acids Enhance Antioxidant Capacity and Mitochondrial Fatty Acid Oxidation in Human Atrial Myocardium via PPAR γ Activation? » *Antioxidants & Redox Signaling* 21 (8): 1156-63. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.5888>.
- Anderson, M. E. 1998. « Glutathione: An Overview of Biosynthesis and Modulation ». *Chemico-Biological Interactions* 111-112 (avril): 1-14. [https://doi.org/10.1016/s0009-2797\(97\)00146-4](https://doi.org/10.1016/s0009-2797(97)00146-4).
- Anderson, Robert H, Reza Razavi, et Andrew M Taylor. 2004. « Cardiac anatomy revisited ». *Journal of Anatomy* 205 (3): 159-77. <https://doi.org/10.1111/j.0021-8782.2004.00330.x>.
- Antonucci, Elio, Enrico Fiaccadori, Katia Donadello, Fabio Silvio Taccone, Federico Franchi, et Sabino Scolletta. 2014. « Myocardial Depression in Sepsis: From Pathogenesis to Clinical Manifestations and Treatment ». *Journal of Critical Care* 29 (4): 500-511. <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2014.03.028>.
- Apel, Klaus med, et Heribert Hirt. 2004. « Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. » *Annual review of plant biology* 55: 373-99. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>.
- Aragno, Manuela, Raffaella Mastrocola, Claudio Medana, Maria Graziella Catalano, Ilenia Vercellinato, Oliviero Danni, et Giuseppe Boccuzzi. 2006. « Oxidative Stress-Dependent Impairment of Cardiac-Specific Transcription Factors in Experimental Diabetes ». *Endocrinology* 147 (12): 5967-74. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0728>.
- Archibald, John. 2014. *One Plus One Equals One: Symbiosis and the Evolution of Complex Life*. Oxford University Press.
- Arroyo-Johnson, Cassandra, et Krista D. Mincey. 2016. « Obesity epidemiology trends by race/ethnicity, gender, and education: National Health Interview Survey, 1997–2012 ». *Gastroenterology clinics of North America* 45 (4): 571-79. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2016.07.012>.
- Ascah, Alexis, Maya Khairallah, Frédéric Daussin, Céline Bourcier-Lucas, Richard Godin, Bruce G. Allen, Basil J. Petrof, Christine Des Rosiers, et Yan Burelle. 2011. « Stress-Induced Opening of the Permeability Transition Pore in the Dystrophin-Deficient Heart Is Attenuated by Acute Treatment with Sildenafil ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 300 (1): H144-153. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00522.2010>.
- ASCEND Study Collaborative Group, Louise Bowman, Marion Mafham, Karl Wallendszus, Will Stevens, Georgina Buck, Jill Barton, et al. 2018. « Effects of N-3 Fatty Acid Supplements in Diabetes Mellitus ». *The New England Journal of Medicine* 379 (16): 1540-50. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1804989>.

- Ascherio, A., E. B. Rimm, M. J. Stampfer, E. L. Giovannucci, et W. C. Willett. 1995. « Dietary Intake of Marine N-3 Fatty Acids, Fish Intake, and the Risk of Coronary Disease among Men ». *The New England Journal of Medicine* 332 (15): 977-82. <https://doi.org/10.1056/NEJM199504133321501>.
- Aung, Theingi, Jim Halsey, Daan Kromhout, Hertz C. Gerstein, Roberto Marchioli, Luigi Tavazzi, Johanna M. Geleijnse, et al. 2018. « Associations of Omega-3 Fatty Acid Supplement Use With Cardiovascular Disease Risks: Meta-Analysis of 10 Trials Involving 77 917 Individuals ». *JAMA Cardiology* 3 (3): 225-34. <https://doi.org/10.1001/jamacardio.2017.5205>.
- Avlas, Orna, Reut Fallach, Asher Shainberg, Eyal Porat, et Edith Hochhauser. 2011. « Toll-like Receptor 4 Stimulation Initiates an Inflammatory Response That Decreases Cardiomyocyte Contractility ». *Antioxidants & Redox Signaling* 15 (7): 1895-1909. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3728>.
- Ayala, Antonio, Mario F. Muñoz, et Sandro Argüelles. 2014. « Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014: 360438. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>.
- Babu, Pon Velayutham Anandh, et Dongmin Liu. 2008. « Green Tea Catechins and Cardiovascular Health: An Update ». *Current Medicinal Chemistry* 15 (18): 1840-50. <https://doi.org/10.2174/092986708785132979>.
- Babu, Pon Velayutham Anandh, Kuruvimalai Ekambaram Sabitha, et Chennam Srinivasulu Shyamaladevi. 2006a. « Green Tea Impedes Dyslipidemia, Lipid Peroxidation, Protein Glycation and Ameliorates Ca²⁺ -ATPase and Na⁺/K⁺ -ATPase Activity in the Heart of Streptozotocin-Diabetic Rats ». *Chemico-Biological Interactions* 162 (2): 157-64. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.05.020>.
- Babu. 2006b. « Therapeutic Effect of Green Tea Extract on Oxidative Stress in Aorta and Heart of Streptozotocin Diabetic Rats ». *Chemico-Biological Interactions* 162 (2): 114-20. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.04.009>.
- Bagi, Zsolt. 2009. « Mechanisms of Coronary Microvascular Adaptation to Obesity ». *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 297 (3): R556-567. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.90817.2008>.
- Banks, C.J., et J.L. Andersen. 2019. « Mechanisms of SOD1 regulation by post-translational modifications ». *Redox Biology* 26 (juillet). <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101270>.
- Barbosa, Vera M., Elizabeth A. Miles, Conceição Calhau, Estevão Lafuente, et Philip C. Calder. 2010. « Effects of a Fish Oil Containing Lipid Emulsion on Plasma Phospholipid Fatty Acids, Inflammatory Markers, and Clinical Outcomes in Septic Patients: A Randomized, Controlled Clinical Trial ». *Critical Care (London, England)* 14 (1): R5. <https://doi.org/10.1186/cc8844>.
- Batinic-Haberle, Ines, Artak Tovmasyan, Emily R. H. Roberts, Zeljko Vujaskovic, Kam W. Leong, et Ivan Spasojevic. 2014. « SOD Therapeutics: Latest Insights into Their Structure-Activity Relationships and Impact on the Cellular Redox-Based Signaling Pathways ». *Antioxidants & Redox Signaling* 20 (15): 2372-2415. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5147>.
- Bergendi, L., L. Benes, Z. Duracková, et M. Ferencik. 1999. « Chemistry, Physiology and Pathology of Free Radicals ». *Life Sciences* 65 (18-19): 1865-74. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(99\)00439-7](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(99)00439-7).
- Bernardi, Paolo, Andrea Rasola, Michael Forte, et Giovanna Lippe. 2015. « The Mitochondrial Permeability Transition Pore: Channel Formation by F-ATP Synthase, Integration in

- Signal Transduction, and Role in Pathophysiology ». *Physiological Reviews* 95 (4): 1111-55. <https://doi.org/10.1152/physrev.00001.2015>.
- Berne, R M. 1981. « Cardiovascular Physiology ». *Annual Review of Physiology* 43 (1): 357-58. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.43.030181.002041>.
- Bessman, Samuel P. 1987. « The creatine phosphate energy shuttle—The molecular asymmetry of a “pool” ». *Analytical Biochemistry* 161 (2): 519-23. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90483-0](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90483-0).
- Bézaire, V., W. Hofmann, J. K. Kramer, L. P. Kozak, et M. E. Harper. 2001. « Effects of Fasting on Muscle Mitochondrial Energetics and Fatty Acid Metabolism in Ucp3(-/-) and Wild-Type Mice ». *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 281 (5): E975-982. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.2001.281.5.E975>.
- Bhardwaj, Pooja, et Deepa Khanna. 2013. « Green Tea Catechins: Defensive Role in Cardiovascular Disorders ». *Chinese Journal of Natural Medicines* 11 (4): 345-53. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(13\)60051-5](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(13)60051-5).
- Bild, Walther, Alin Ciobica, Manuela Padurariu, et Veronica Bild. 2013. « The Interdependence of the Reactive Species of Oxygen, Nitrogen, and Carbon ». *Journal of Physiology and Biochemistry* 69 (1): 147-54. <https://doi.org/10.1007/s13105-012-0162-2>.
- Biswas, Subrata Kumar. 2016. « Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? » Research article. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/5698931>.
- Boles, Annette, Ramesh Kandimalla, et P. Hemachandra Reddy. 2017. « Dynamics of Diabetes and Obesity: Epidemiological Perspective ». *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease* 1863 (5): 1026-36. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.01.016>.
- Bombicino, Silvina S., Darío E. Iglesias, Ivana A. Rukavina Mikusic, Verónica D’Annunzio, Ricardo J. Gelpi, Alberto Boveris, et Laura B. Valdez. 2016. « Diabetes Impairs Heart Mitochondrial Function without Changes in Resting Cardiac Performance ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 81 (Pt B): 335-45. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.09.018>.
- Bonello, Steve, Christian Zähringer, Rachida S. BelAiba, Taliya Djordjevic, John Hess, Carine Michiels, Thomas Kietzmann, et Agnes Görlach. 2007. « Reactive Oxygen Species Activate the HIF-1alpha Promoter via a Functional NFkappaB Site ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27 (4): 755-61. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000258979.92828.bc>.
- Bonora, Massimo, Simone Patergnani, Alessandro Rimessi, Elena De Marchi, Jan M. Suski, Angela Bononi, Carlotta Giorgi, et al. 2012. « ATP synthesis and storage ». *Purinergic Signalling* 8 (3): 343-57. <https://doi.org/10.1007/s11302-012-9305-8>.
- Boutens, Lily, Guido J. Hooiveld, Sourabh Dhingra, Robert A. Cramer, Mihai G. Netea, et Rinke Stienstra. 2018. « Unique Metabolic Activation of Adipose Tissue Macrophages in Obesity Promotes Inflammatory Responses ». *Diabetologia* 61 (4): 942-53. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4526-6>.
- Boveris, A., N. Oshino, et B. Chance. 1972. « The Cellular Production of Hydrogen Peroxide ». *The Biochemical Journal* 128 (3): 617-30. <https://doi.org/10.1042/bj1280617>.
- Boveris, Alberto, et Britton Chance. 1973. « The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen ». *Biochemical Journal* 134 (3): 707-16.
- Brand, Martin D. 2010. « The sites and topology of mitochondrial superoxide production ». *Experimental gerontology* 45 (7-8): 466-72. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.01.003>.

- Brand, Martin D., Julie A. Buckingham, Telma C. Esteves, Katherine Green, Adrian J. Lambert, Satomi Miwa, Michael P. Murphy, Julian L. Pakay, Darren A. Talbot, et Karim S. Echtay. 2004. « Mitochondrial Superoxide and Aging: Uncoupling-Protein Activity and Superoxide Production ». *Biochemical Society Symposium*, n° 71: 203-13.
- Briston, Thomas, Malcolm Roberts, Sian Lewis, Ben Powney, James M Staddon, Gyorgy Szabadkai, et Michael R. Duchon. 2017. « Mitochondrial Permeability Transition Pore: Sensitivity to Opening and Mechanistic Dependence on Substrate Availability ». *Scientific Reports* 7 (1): 10492. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10673-8>.
- Brookes, Paul S., Yisang Yoon, James L. Robotham, M. W. Anders, et Shey-Shing Sheu. 2004. « Calcium, ATP, and ROS: A Mitochondrial Love-Hate Triangle ». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 287 (4): C817-833. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00139.2004>.
- Brooks, Joshua D., Erik S. Musiek, Tyler R. Koestner, Jeannette N. Stankowski, Jocelyn R. Howard, Enrico M. Brunoldi, Alessio Porta, et al. 2011. « The Fatty Acid Oxidation Product 15-A3t-Isoprostane Is a Potent Inhibitor of NFκB Transcription and Macrophage Transformation ». *Journal of Neurochemistry* 119 (3): 604-16. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07422.x>.
- Brossard, N., M. Croset, C. Pachiaudi, J. P. Riou, J. L. Tayot, et M. Lagarde. 1996. « Retroconversion and Metabolism of [13C]22:6n-3 in Humans and Rats after Intake of a Single Dose of [13C]22:6n-3-Triacylglycerols ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 64 (4): 577-86. <https://doi.org/10.1093/ajcn/64.4.577>.
- Brownlee, M. 2001. « Biochemistry and Molecular Cell Biology of Diabetic Complications ». *Nature* 414 (6865): 813-20. <https://doi.org/10.1038/414813a>.
- Brunet, Anne, Lora B. Sweeney, J. Fitzhugh Sturgill, Katrin F. Chua, Paul L. Greer, Yingxi Lin, Hien Tran, et al. 2004. « Stress-Dependent Regulation of FOXO Transcription Factors by the SIRT1 Deacetylase ». *Science (New York, N.Y.)* 303 (5666): 2011-15. <https://doi.org/10.1126/science.1094637>.
- Burr, M. L., A. M. Fehily, J. F. Gilbert, S. Rogers, R. M. Holliday, P. M. Sweetnam, P. C. Elwood, et N. M. Deadman. 1989. « Effects of Changes in Fat, Fish, and Fibre Intakes on Death and Myocardial Reinfarction: Diet and Reinfarction Trial (DART) ». *Lancet (London, England)* 2 (8666): 757-61. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(89\)90828-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(89)90828-3).
- Burr, Michael L. 2007. « Secondary Prevention of CHD in UK Men: The Diet and Reinfarction Trial and Its Sequel ». *The Proceedings of the Nutrition Society* 66 (1): 9-15. <https://doi.org/10.1017/S0029665107005241>.
- Cadenas, Susana. 2018. « Mitochondrial Uncoupling, ROS Generation and Cardioprotection ». *Biochimica Et Biophysica Acta. Bioenergetics* 1859 (9): 940-50. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2018.05.019>.
- Calder, P. C. 2003. « Long-Chain n-3 Fatty Acids and Inflammation: Potential Application in Surgical and Trauma Patients ». *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas* 36 (4): 433-46. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2003000400004>.
- Calder, Philip C. 2015. « Marine Omega-3 Fatty Acids and Inflammatory Processes: Effects, Mechanisms and Clinical Relevance ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1851 (4): 469-84. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2014.08.010>.
- Calder. 2017. « Omega-3 Fatty Acids and Inflammatory Processes: From Molecules to Man ». *Biochemical Society Transactions* 45 (5): 1105-15. <https://doi.org/10.1042/BST20160474>.
- Capel, Frederic, Alain Geloën, Carole Vaysse, Gaelle Pineau, Luc Demaison, Jean-Michel Chardigny, Marie-Caroline Michalski, et Corinne Malpuech-Brugère. 2018. « Rapeseed Oil Fortified with Micronutrients Can Reduce Glucose Intolerance during a High Fat

- Challenge in Rats ». *Nutrition & Metabolism* 15: 22. <https://doi.org/10.1186/s12986-018-0259-x>.
- « Cardiovascular Disease and Diabetes ». s. d. Www.Heart.Org. Consulté le 22 septembre 2019. <https://www.heart.org/en/health-topics/diabetes/why-diabetes-matters/cardiovascular-disease--diabetes>.
- Casanova, Ester, Josepa Salvadó, Anna Crescenti, et Albert Gibert-Ramos. 2019. « Epigallocatechin Gallate Modulates Muscle Homeostasis in Type 2 Diabetes and Obesity by Targeting Energetic and Redox Pathways: A Narrative Review ». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (3). <https://doi.org/10.3390/ijms20030532>.
- Cervantes Gracia, Karla, Daniel Llanas-Cornejo, et Holger Husi. 2017. « CVD and Oxidative Stress ». *Journal of Clinical Medicine* 6 (2). <https://doi.org/10.3390/jcm6020022>.
- Chan, Clement T. Y., Yan Ling Joy Pang, Wenjun Deng, I. Ramesh Babu, Madhu Dyavaiah, Thomas J. Begley, et Peter C. Dedon. 2012. « Reprogramming of tRNA Modifications Controls the Oxidative Stress Response by Codon-Biased Translation of Proteins ». *Nature Communications* 3 (juillet): 937. <https://doi.org/10.1038/ncomms1938>.
- Chan, David C. 2006. « Mitochondria: Dynamic Organelles in Disease, Aging, and Development ». *Cell* 125 (7): 1241-52. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.010>.
- Chapkin, R. S., C. C. Akoh, et C. C. Miller. 1991. « Influence of Dietary N-3 Fatty Acids on Macrophage Glycerophospholipid Molecular Species and Peptidoleukotriene Synthesis ». *Journal of Lipid Research* 32 (7): 1205-13.
- Charnock, J. S., K. Sundram, M. Y. Abeywardena, P. L. McLennan, et D. T. Tan. 1991. « Dietary Fats and Oils in Cardiac Arrhythmia in Rats ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 53 (4 Suppl): 1047S-1049S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/53.4.1047S>.
- Chen, Chun-Ju, Chun-Cheng Chen, et Shinn-Jyh Ding. 2016. « Effectiveness of Hypochlorous Acid to Reduce the Biofilms on Titanium Alloy Surfaces in Vitro ». *International Journal of Molecular Sciences* 17 (7). <https://doi.org/10.3390/ijms17071161>.
- Chen, Chun-Juan, Yu-Cai Fu, Wei Yu, et Wei Wang. 2013. « SIRT3 Protects Cardiomyocytes from Oxidative Stress-Mediated Cell Death by Activating NF- κ B ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 430 (2): 798-803. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.11.066>.
- Chen, Jinghai, Gregory C. Shearer, Quanhai Chen, Chastity L. Healy, April J. Beyer, Vijaya B. Nareddy, A. Martin Gerdes, William S. Harris, Timothy D. O'Connell, et Dajun Wang. 2011. « Omega-3 Fatty Acids Prevent Pressure Overload-Induced Cardiac Fibrosis through Activation of Cyclic GMP/Protein Kinase G Signaling in Cardiac Fibroblasts ». *Circulation* 123 (6): 584-93. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.971853>.
- Chen, Le, Tingting Liu, Alice Tran, Xiyuan Lu, Alexey A. Tomilov, Vanessa Davies, Gino Cortopassi, et al. 2012. « OPA1 Mutation and Late-Onset Cardiomyopathy: Mitochondrial Dysfunction and mtDNA Instability ». *Journal of the American Heart Association: Cardiovascular and Cerebrovascular Disease* 1 (5). <https://doi.org/10.1161/JAHA.112.003012>.
- Chen, Ying-Jr, Nathaniel G. Mahieu, Xiaojing Huang, Manmilian Singh, Peter A. Crawford, Stephen L. Johnson, Richard W. Gross, Jacob Schaefer, et Gary J. Patti. 2016. « Lactate Metabolism Is Associated with Mammalian Mitochondria ». *Nature Chemical Biology* 12 (11): 937-43. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2172>.
- Chikara, Shireen, Lokesh Dalasanur Nagaprashantha, Jyotsana Singhal, David Horne, Sanjay Awasthi, et Sharad S. Singhal. 2018. « Oxidative Stress and Dietary Phytochemicals: Role in Cancer Chemoprevention and Treatment ». *Cancer Letters* 413: 122-34. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.11.002>.

- Chin, Kai Yee, Lisa Michel, Cheng Xue Qin, Nga Cao, Owen L. Woodman, et Rebecca H. Ritchie. 2016. « The HNO Donor Angeli's Salt Offers Potential Haemodynamic Advantages over NO or Dobutamine in Ischaemia-Reperfusion Injury in the Rat Heart Ex Vivo ». *Pharmacological Research* 104 (février): 165-75. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.12.006>.
- Citerio, Giuseppe, Jan Bakker, Matteo Bassetti, Dominique Benoit, Maurizio Cecconi, J. Randall Curtis, Gordon S. Doig, et al. 2015. « Year in review in Intensive Care Medicine 2014: I. Cardiac dysfunction and cardiac arrest, ultrasound, neurocritical care, ICU-acquired weakness, nutrition, acute kidney injury, and miscellaneous ». *Intensive Care Medicine* 41: 179-91. <https://doi.org/10.1007/s00134-015-3665-9>.
- Cooke, Marcus S., Mark D. Evans, Miral Dizdaroglu, et Joseph Lunec. 2003. « Oxidative DNA Damage: Mechanisms, Mutation, and Disease ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17 (10): 1195-1214. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0752rev>.
- Correa, Francisco, Virgilia Soto, et Cecilia Zazueta. 2007. « Mitochondrial Permeability Transition Relevance for Apoptotic Triggering in the Post-Ischemic Heart ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39 (4): 787-98. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.01.013>.
- Costantini, Lara, Romina Molinari, Barbara Farinon, et Nicolò Merendino. 2017. « Impact of Omega-3 Fatty Acids on the Gut Microbiota ». *International Journal of Molecular Sciences* 18 (12). <https://doi.org/10.3390/ijms18122645>.
- Cotter, David G., Rebecca C. Schugar, et Peter A. Crawford. 2013. « Ketone Body Metabolism and Cardiovascular Disease ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 304 (8): H1060-1076. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00646.2012>.
- Crofts, Antony R. 2004. « The Cytochrome Bc1 Complex: Function in the Context of Structure ». *Annual Review of Physiology* 66: 689-733. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.66.032102.150251>.
- Croston, Tara L., Dharendra Thapa, Anthony A. Holden, Kevin J. Tveter, Sara E. Lewis, Danielle L. Shepherd, Cody E. Nichols, et al. 2014. « Functional Deficiencies of Subsarcolemmal Mitochondria in the Type 2 Diabetic Human Heart ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 307 (1): H54-65. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00845.2013>.
- Csepe, Thomas A., Jichao Zhao, Brian J. Hansen, Ning Li, Lidiya V. Sul, Praise Lim, Yufeng Wang, et al. 2016. « Human Sinoatrial Node Structure: 3D Microanatomy of Sinoatrial Conduction Pathways ». *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 120 (1-3): 164-78. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2015.12.011>.
- Csige, Imre, Dóra Ujvárosy, Zoltán Szabó, István Lőrincz, György Paragh, Mariann Harangi, et Sándor Somodi. 2018. « The Impact of Obesity on the Cardiovascular System ». Research article. *Journal of Diabetes Research*. 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/3407306>.
- Dai, D.-F., Y.-A. Chiao, G. M. Martin, D. J. Marcinek, N. Basisty, E. K. Quarles, et P. S. Rabinovitch. 2017. « Mitochondrial-Targeted Catalase: Extended Longevity and the Roles in Various Disease Models ». *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 146: 203-41. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2016.12.015>.
- Dali-Youcef, N. 2010. « Les produits de fin de glycation des protéines (AGEs) et leur récepteur en pathologie ». [/data/revues/19572557/00040006/623/](https://www.em-consulte.com/en/article/277759), décembre. <https://www.em-consulte.com/en/article/277759>.
- Dalli, Jesmond, Romain A. Colas, Carolina Quintana, Diana Barragan-Bradford, Shelley Hurwitz, Bruce D. Levy, Augustine M. Choi, Charles N. Serhan, et Rebecca M. Baron. 2017. « Human Sepsis Eicosanoid and Proresolving Lipid Mediator Temporal Profiles:

- Correlations With Survival and Clinical Outcomes ». *Critical Care Medicine* 45 (1): 58-68. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000002014>.
- Dare, Anna J., Anthony R. J. Phillips, Anthony J. R. Hickey, Anubhav Mittal, Benjamin Loveday, Nichola Thompson, et John A. Windsor. 2009. « A Systematic Review of Experimental Treatments for Mitochondrial Dysfunction in Sepsis and Multiple Organ Dysfunction Syndrome ». *Free Radical Biology & Medicine* 47 (11): 1517-25. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.08.019>.
- Darley-USmar, V., et B. Halliwell. 1996. « Blood Radicals: Reactive Nitrogen Species, Reactive Oxygen Species, Transition Metal Ions, and the Vascular System ». *Pharmaceutical Research* 13 (5): 649-62. <https://doi.org/10.1023/a:1016079012214>.
- D'Autréaux, Benoît, et Michel B. Toledano. 2007. « ROS as Signalling Molecules: Mechanisms That Generate Specificity in ROS Homeostasis ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8 (10): 813-24. <https://doi.org/10.1038/nrm2256>.
- De Caterina, R., et A. Zampolli. 2001. « N-3 Fatty Acids: Antiatherosclerotic Effects ». *Lipids* 36 Suppl: S69-78. <https://doi.org/10.1007/s11745-001-0685-9>.
- De Lorenzo, Antonino, Laura Soldati, Francesca Sarlo, Menotti Calvani, Nicola Di Lorenzo, et Laura Di Renzo. 2016. « New Obesity Classification Criteria as a Tool for Bariatric Surgery Indication ». *World Journal of Gastroenterology* 22 (2): 681-703. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i2.681>.
- Dedkova, Elena N., et Lothar A. Blatter. 2008. « Mitochondrial Ca²⁺ and the Heart ». *Cell Calcium* 44 (1): 77-91. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2007.11.002>.
- Demaison, L., et D. Moreau. 2002. « Dietary N-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Coronary Heart Disease-Related Mortality: A Possible Mechanism of Action ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 59 (3): 463-77.
- Demaison, L., J. P. Sergiel, D. Moreau, et A. Grynberg. 1994. « Influence of the Phospholipid N-6/n-3 Polyunsaturated Fatty Acid Ratio on the Mitochondrial Oxidative Metabolism before and after Myocardial Ischemia ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1227 (1-2): 53-59. [https://doi.org/10.1016/0925-4439\(94\)90106-6](https://doi.org/10.1016/0925-4439(94)90106-6).
- Demaison, Luc, Thibault Leger, Catherine Vergely, Luc Rochette, et Kasra Azarnoush. 2019. « About the Controversies of the Cardioprotective Effect of N-3 Polyunsaturated Fatty Acids (PUFAs) between Animal Studies and Clinical Meta-Analyses: A Review with Several Strategies to Enhance the Beneficial Effects of n-3 PUFAs ». *Journal of Physiology and Biochemistry* 75 (3): 241-51. <https://doi.org/10.1007/s13105-019-00670-y>.
- Demaison, Luc, Daniel Moreau, Fabienne Clauw, Catherine Vergely, et Luc Rochette. 2013. « Mitochondrial Basis of the Anti-Arrhythmic Action of Lidocaine and Modulation by the n-6 to n-3 PUFA Ratio of Cardiac Phospholipids ». *Fundamental & Clinical Pharmacology* 27 (4): 373-86. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2012.01031.x>.
- Dennis, Kathleen E., Salisha Hill, Kristie L. Rose, Uchechukwu K. A. Sampson, et Michael F. Hill. 2013. « Augmented Cardiac Formation of Oxidatively-Induced Carbonylated Proteins Accompanies the Increased Functional Severity of Post-Myocardial Infarction Heart Failure in the Setting of Type 1 Diabetes Mellitus ». *Cardiovascular Pathology: The Official Journal of the Society for Cardiovascular Pathology* 22 (6): 473-80. <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2013.03.001>.
- Devaraj, Sridevi, Scott Leonard, Maret G. Traber, et Ishwarlal Jialal. 2008. « Gamma-Tocopherol Supplementation Alone and in Combination with Alpha-Tocopherol Alters Biomarkers of Oxidative Stress and Inflammation in Subjects with Metabolic Syndrome ». *Free Radical Biology & Medicine* 44 (6): 1203-8. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.12.018>.

- Devenish, R. J., M. Prescott, G. M. Boyle, et P. Nagley. 2000. « The Oligomycin Axis of Mitochondrial ATP Synthase: OSCP and the Proton Channel ». *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 32 (5): 507-15.
- Diabetes Control and Complications Trial Research Group, D. M. Nathan, S. Genuth, J. Lachin, P. Cleary, O. Crofford, M. Davis, L. Rand, et C. Siebert. 1993. « The Effect of Intensive Treatment of Diabetes on the Development and Progression of Long-Term Complications in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus ». *The New England Journal of Medicine* 329 (14): 977-86. <https://doi.org/10.1056/NEJM199309303291401>.
- « Dietary Supplementation with N-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Vitamin E after Myocardial Infarction: Results of the GISSI-Prevenzione Trial. Gruppo Italiano per Lo Studio Della Sopravvivenza Nell'Infarto Miocardico ». 1999. *Lancet (London, England)* 354 (9177): 447-55.
- Dikalova, Anna E., Hana A. Itani, Rafal R. Nazarewicz, William G. McMaster, Charles R. Flynn, Roman Uzhachenko, Joshua P. Fessel, Jorge L. Gamboa, David G. Harrison, et Sergey I. Dikalov. 2017. « Sirt3 Impairment and SOD2 Hyperacetylation in Vascular Oxidative Stress and Hypertension ». *Circulation Research* 121 (5): 564-74. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.310933>.
- Dorn II, Gerald W. 2015. « Mitochondrial dynamism and heart disease: changing shape and shaping change ». *EMBO Molecular Medicine* 7 (7): 865-77. <https://doi.org/10.15252/emmm.201404575>.
- Dourado, Daniel F. A. R., Marcel Swart, et Alexandra T. P. Carvalho. 2018. « Why the Flavin Adenine Dinucleotide (FAD) Cofactor Needs To Be Covalently Linked to Complex II of the Electron-Transport Chain for the Conversion of FADH2 into FAD ». *Chemistry (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)* 24 (20): 5246-52. <https://doi.org/10.1002/chem.201704622>.
- Duda, Monika K., Karen M. O'Shea, Anselm Tintinu, Wenhong Xu, Ramzi J. Khairallah, Brian R. Barrows, David J. Chess, et al. 2009. « Fish Oil, but Not Flaxseed Oil, Decreases Inflammation and Prevents Pressure Overload-Induced Cardiac Dysfunction ». *Cardiovascular Research* 81 (2): 319-27. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvn310>.
- Duerrschmid, Clemens, JoAnn Trial, Yanlin Wang, Mark L. Entman, et Sandra B. Haudek. 2015. « Tumor Necrosis Factor: A Mechanistic Link between Angiotensin-II-Induced Cardiac Inflammation and Fibrosis ». *Circulation. Heart failure* 8 (2): 352-61. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.114.001893>.
- Durand, T., V. Bultel-Poncé, A. Guy, S. El Fangour, J. -C. Rossi, et J. -M. Galano. 2011. « Isoprostanes and phytoprostanes: Bioactive lipids ». *Biochimie, Bioactive Lipids, Nutrition and Health*, 93 (1): 52-60. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.05.014>.
- Dyall, Simon C. 2011. « Methodological Issues and Inconsistencies in the Field of Omega-3 Fatty Acids Research ». *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids* 85 (5): 281-85. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2011.04.009>.
- Dyck, Jason R. B., et Gary D. Lopaschuk. 2002. « Malonyl CoA Control of Fatty Acid Oxidation in the Ischemic Heart ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 34 (9): 1099-1109. <https://doi.org/10.1006/jmcc.2002.2060>.
- Eclov, Julie A., Qingwen Qian, Rebecca Redetzke, Quanghai Chen, Steven C. Wu, Chastity L. Healy, Steven B. Ortmeier, Erin Harmon, Gregory C. Shearer, et Timothy D. O'Connell. 2015. « EPA, not DHA, prevents fibrosis in pressure overload-induced heart failure: potential role of free fatty acid receptor 4 ». *Journal of Lipid Research* 56 (12): 2297-2308. <https://doi.org/10.1194/jlr.M062034>.
- Edderkaoui, Mouad, Irina Odinkova, Izumi Ohno, Ilya Gukovsky, Vay Liang W. Go, Stephen J. Pandol, et Anna S. Gukovskaya. 2008. « Ellagic Acid Induces Apoptosis through

- Inhibition of Nuclear Factor Kappa B in Pancreatic Cancer Cells ». *World Journal of Gastroenterology* 14 (23): 3672-80. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.3672>.
- Ellinger, S., N. Müller, P. Stehle, et G. Ulrich-Merzenich. 2011. « Consumption of Green Tea or Green Tea Products: Is There an Evidence for Antioxidant Effects from Controlled Interventional Studies? » *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology* 18 (11): 903-15. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.06.006>.
- Ellis, Jessica M., Shannon M. Mentock, Michael A. Depetrillo, Timothy R. Koves, Shiraj Sen, Steven M. Watkins, Deborah M. Muoio, et al. 2011. « Mouse Cardiac Acyl Coenzyme a Synthetase 1 Deficiency Impairs Fatty Acid Oxidation and Induces Cardiac Hypertrophy ». *Molecular and Cellular Biology* 31 (6): 1252-62. <https://doi.org/10.1128/MCB.01085-10>.
- Engelking, Larry R. 2015. « Chapter 88 - Diabetes Mellitus (Metabolic Acidosis and Potassium Balance) ». In *Textbook of Veterinary Physiological Chemistry (Third Edition)*, édité par Larry R. Engelking, 568-75. Boston: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391909-0.50088-8>.
- Essop, M. Faadiel, Peter Razeghi, Chris McLeod, Martin E. Young, Heinrich Taegtmeyer, et Michael N. Sack. 2004. « Hypoxia-Induced Decrease of UCP3 Gene Expression in Rat Heart Parallels Metabolic Gene Switching but Fails to Affect Mitochondrial Respiratory Coupling ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 314 (2): 561-64. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.12.121>.
- Eussen, Simone R. B. M., Johanna M. Geleijnse, Erik J. Giltay, Cathy J. M. Rompelberg, Olaf H. Klungel, et Daan Kromhout. 2012. « Effects of N-3 Fatty Acids on Major Cardiovascular Events in Statin Users and Non-Users with a History of Myocardial Infarction ». *European Heart Journal* 33 (13): 1582-88. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr499>.
- Fezza, Filomena, Monica Bari, Rita Florio, Emanuela Talamonti, Monica Feole, et Mauro Maccarrone. 2014. « Endocannabinoids, Related Compounds and Their Metabolic Routes ». *Molecules (Basel, Switzerland)* 19 (11): 17078-106. <https://doi.org/10.3390/molecules191117078>.
- Fillmore, Natasha, et Gary D. Lopaschuk. 2013. « Targeting Mitochondrial Oxidative Metabolism as an Approach to Treat Heart Failure ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1833 (4): 857-65. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.08.014>.
- Finck, Brian N., et Daniel P. Kelly. 2007. « Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator-1 (PGC-1) Regulatory Cascade in Cardiac Physiology and Disease ». *Circulation* 115 (19): 2540-48. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.670588>.
- Flaherty, Sarah K., Rachel L. Weber, Maureen Chase, Andrea F. Dugas, Amanda M. Graver, Justin D. Saliccioli, Michael N. Cocchi, et Michael W. Donnino. 2014. « Septic Shock and Adequacy of Early Empiric Antibiotics in the Emergency Department ». *The Journal of Emergency Medicine* 47 (5): 601-7. <https://doi.org/10.1016/j.jemermed.2014.06.037>.
- Flegal, Katherine M., Margaret D. Carroll, Brian K. Kit, et Cynthia L. Ogden. 2012. « Prevalence of Obesity and Trends in the Distribution of Body Mass Index among US Adults, 1999-2010 ». *JAMA* 307 (5): 491-97. <https://doi.org/10.1001/jama.2012.39>.
- Fleischmann, Carolin, André Scherag, Neill K. J. Adhikari, Christiane S. Hartog, Thomas Tsaganos, Peter Schlattmann, Derek C. Angus, Konrad Reinhart, et International Forum of Acute Care Trialists. 2016. « Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-Treated Sepsis. Current Estimates and Limitations ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 193 (3): 259-72. <https://doi.org/10.1164/rccm.201504-0781OC>.

- Flynn, Anthony, Bhalaghuru Chokkalingam Mani, et Paul J. Mather. 2010. « Sepsis-Induced Cardiomyopathy: A Review of Pathophysiologic Mechanisms ». *Heart Failure Reviews* 15 (6): 605-11. <https://doi.org/10.1007/s10741-010-9176-4>.
- Folmes, Clifford D. L., et Gary D. Lopaschuk. 2007. « Role of Malonyl-CoA in Heart Disease and the Hypothalamic Control of Obesity ». *Cardiovascular Research* 73 (2): 278-87. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.10.008>.
- Forkink, Marleen, Farhan Basit, José Teixeira, Herman G. Swarts, Werner J. H. Koopman, et Peter H. G. M. Willems. 2015. « Complex I and Complex III Inhibition Specifically Increase Cytosolic Hydrogen Peroxide Levels without Inducing Oxidative Stress in HEK293 Cells ». *Redox Biology* 6 (décembre): 607-16. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.09.003>.
- Förstermann, Ulrich, et William C. Sessa. 2012. « Nitric Oxide Synthases: Regulation and Function ». *European Heart Journal* 33 (7): 829-37, 837a-837d. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>.
- Francis, Gary S., Jason A. Bartos, et Sirtaz Adatya. 2014. « Inotropes ». *Journal of the American College of Cardiology* 63 (20): 2069-78. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.01.016>.
- Frantz, Stefan, Georg Ertl, et Johann Bauersachs. 2007. « Mechanisms of Disease: Toll-like Receptors in Cardiovascular Disease ». *Nature Clinical Practice. Cardiovascular Medicine* 4 (8): 444-54. <https://doi.org/10.1038/ncpcardio0938>.
- Fridovich, I. 1978. « The Biology of Oxygen Radicals ». *Science (New York, N.Y.)* 201 (4359): 875-80. <https://doi.org/10.1126/science.210504>.
- Fubini, Bice, et Andrea Hubbard. 2003. « Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis ». *Free Radical Biology and Medicine* 34 (12): 1507-16. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(03\)00149-7](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(03)00149-7).
- Fujikawa, Makoto, Kanako Sugawara, Tsutomu Tanabe, et Masasuke Yoshida. 2015. « Assembly of Human Mitochondrial ATP Synthase through Two Separate Intermediates, F1-c-Ring and b-e-g Complex ». *FEBS Letters* 589 (19 Pt B): 2707-12. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.08.006>.
- Fukai, Tohru, et Masuko Ushio-Fukai. 2011. « Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases ». *Antioxidants & Redox Signaling* 15 (6): 1583-1606. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.3999>.
- Fukushima, Arata, et Gary D. Lopaschuk. 2016. « Acetylation Control of Cardiac Fatty Acid β -Oxidation and Energy Metabolism in Obesity, Diabetes, and Heart Failure ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1862 (12): 2211-20. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.07.020>.
- Fulghum, Kyle, et Bradford G. Hill. 2018. « Metabolic Mechanisms of Exercise-Induced Cardiac Remodeling ». *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 5: 127. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00127>.
- Galano, Jean-Marie, Jetty Chung-Yung Lee, Cecile Gladine, Blandine Comte, Jean-Yves Le Guennec, Camille Oger, et Thierry Durand. 2015. « Non-Enzymatic Cyclic Oxygenated Metabolites of Adrenic, Docosaehaenoic, Eicosapentaenoic and α -Linolenic Acids; Bioactivities and Potential Use as Biomarkers ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1851 (4): 446-55. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.11.004>.
- Gamcrilidze, M. M., N. A. Intskirveli, K. D. Vardosanidze, Kh E. Chikhladze, L. Sh Goliadze, et L. R. Ratiani. 2015. « Vasoplegia in Septic Shock (Review) ». *Georgian Medical News*, n° 239 (février): 56-62.
- Gao, Huikuan, Qiong Yang, Ruiqing Dong, Fei Hou, et Yongquan Wu. 2016. « Sequential Changes in Autophagy in Diabetic Cardiac Fibrosis ». *Molecular Medicine Reports* 13 (1): 327-32. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4517>.

- Gao, Ling, Jiakun Wang, Konjeti R. Sekhar, Huiyong Yin, Nicholas F. Yared, Scott N. Schneider, Soumya Sasi, et al. 2007. « Novel N-3 Fatty Acid Oxidation Products Activate Nrf2 by Destabilizing the Association between Keap1 and Cullin3 ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (4): 2529-37. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607622200>.
- Gardner, P R, D D Nguyen, et C W White. 1994. « Aconitase is a sensitive and critical target of oxygen poisoning in cultured mammalian cells and in rat lungs. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (25): 12248-52.
- Geiszt, Miklós, et Thomas L. Leto. 2004. « The Nox Family of NAD(P)H Oxidases: Host Defense and Beyond ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (50): 51715-18. <https://doi.org/10.1074/jbc.R400024200>.
- Gerschman, R., D. L. Gilbert, S. W. Nye, P. Dwyer, et W. O. Fenn. 1954. « Oxygen Poisoning and X-Irradiation: A Mechanism in Common ». *Science (New York, N.Y.)* 119 (3097): 623-26. <https://doi.org/10.1126/science.119.3097.623>.
- Gertz, E. W., J. A. Wisneski, W. C. Stanley, et R. A. Neese. 1988. « Myocardial Substrate Utilization during Exercise in Humans. Dual Carbon-Labeled Carbohydrate Isotope Experiments ». *The Journal of Clinical Investigation* 82 (6): 2017-25. <https://doi.org/10.1172/JCI113822>.
- Ghosh, Sanjoy, Daniella DeCoffe, Kirsty Brown, Ethendhar Rajendiran, Mehrbod Estaki, Chuanbin Dai, Ashley Yip, et Deanna L. Gibson. 2013. « Fish Oil Attenuates Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acid-Induced Dysbiosis and Infectious Colitis but Impairs LPS Dephosphorylation Activity Causing Sepsis ». *PloS One* 8 (2): e55468. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055468>.
- Giacco, Ferdinando, et Michael Brownlee. 2010. « Oxidative Stress and Diabetic Complications ». *Circulation Research* 107 (9): 1058-70. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.223545>.
- Giacomello, M., et L. Pellegrini. 2016. « The Coming of Age of the Mitochondria–ER Contact: A Matter of Thickness ». *Cell Death and Differentiation* 23 (9): 1417. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.52>.
- Gibb, Andrew A., Paul N. Epstein, Shizuka Uchida, Yuting Zheng, Lindsey A. McNally, Detlef Obal, Kartik Katragadda, et al. 2017. « Exercise-Induced Changes in Glucose Metabolism Promote Physiological Cardiac Growth ». *Circulation* 136 (22): 2144-57. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.028274>.
- Ginsberg, Henry N., et Paul R. MacCallum. 2009. « The Obesity, Metabolic Syndrome, and Type 2 Diabetes Mellitus Pandemic: Part I. Increased Cardiovascular Disease Risk and the Importance of Atherogenic Dyslipidemia in Persons With the Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes Mellitus ». *Journal of the cardiometabolic syndrome* 4 (2): 113-19. <https://doi.org/10.1111/j.1559-4572.2008.00044.x>.
- Glatz, J. F., J. J. Luiken, et A. Bonen. 2001. « Involvement of Membrane-Associated Proteins in the Acute Regulation of Cellular Fatty Acid Uptake ». *Journal of Molecular Neuroscience: MN* 16 (2-3): 123-32; discussion 151-157. <https://doi.org/10.1385/JMN:16:2-3:123>.
- Glorieux, Christophe, et Pedro Buc Calderon. 2017. « Catalase, a Remarkable Enzyme: Targeting the Oldest Antioxidant Enzyme to Find a New Cancer Treatment Approach ». *Biological Chemistry* 398 (10): 1095-1108. <https://doi.org/10.1515/hsz-2017-0131>.
- Golzari, Mohammad Hassan, Mohammad Hassan Javanbakht, Ehsan Ghaedi, Hamed Mohammadi, et Mahmoud Djalali. 2018. « Effect of Eicosapentaenoic Acid (EPA) Supplementation on Cardiovascular Markers in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial ». *Diabetes & Metabolic Syndrome* 12 (3): 411-15. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.03.003>.

- Gordon, Joseph W., James A. Shaw, et Lorrie A. Kirshenbaum. 2011. « Multiple Facets of NF-KB in the Heart: To Be or Not to NF-KB ». *Circulation Research* 108 (9): 1122-32. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.226928>.
- Granado, Miriam, Nuria Fernández, Luis Monge, Gonzalo Carreño-Tarragona, Juan Carlos Figueras, Sara Amor, et Angel Luis García-Villalón. 2014. « Long-Term Effects of Early Overnutrition in the Heart of Male Adult Rats: Role of the Renin-Angiotensin System ». *PLoS One* 8 (6): e65172. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065172>.
- Gray, Michael J., Wei-Yun Wholey, et Ursula Jakob. 2013. « Bacterial Responses to Reactive Chlorine Species ». *Annual review of microbiology* 67: 141-60. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-102912-142520>.
- Green, David E., et Alexander Tzagoloff. 1966. « The mitochondrial electron transfer chain ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 116 (janvier): 293-304. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(66\)90036-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(66)90036-1).
- Griendling, K. K., D. Sorescu, et M. Ushio-Fukai. 2000. « NAD(P)H Oxidase: Role in Cardiovascular Biology and Disease ». *Circulation Research* 86 (5): 494-501. <https://doi.org/10.1161/01.res.86.5.494>.
- Grivennikova, V. G., et A. D. Vinogradov. 2013. « Mitochondrial Production of Reactive Oxygen Species ». *Biochemistry. Biokhimiia* 78 (13): 1490-1511. <https://doi.org/10.1134/S0006297913130087>.
- Gu, Jiaqi, Lingchun Luo, Qian Wang, Songfan Yan, Jing Lin, Dan Li, Bingbing Cao, et al. 2018. « Maresin 1 Attenuates Mitochondrial Dysfunction through the ALX/CAMP/ROS Pathway in the Cecal Ligation and Puncture Mouse Model and Sepsis Patients ». *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 98 (6): 715-33. <https://doi.org/10.1038/s41374-018-0031-x>.
- Guillet, Christelle. 2010. « Implication des produits terminaux de glycation dans les complications liées au diabète ». */data/revues/09850562/v24i3/S0985056210000336/*, septembre. <https://www.em-consulte.com/en/article/265963>.
- Guo, Runyu, Shuai Zong, Meng Wu, Jinke Gu, et Maojun Yang. 2017. « Architecture of Human Mitochondrial Respiratory Megacomplex I2III2IV2 ». *Cell* 170 (6): 1247-1257.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.050>.
- Gupta, Subash C, Chitra Sundaram, Simone Reuter, et Bharat B Aggarwal. 2010. « Inhibiting NF-κB Activation by Small Molecules As a Therapeutic Strategy ». *Biochimica et biophysica acta* 1799 (10-12): 775-87. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2010.05.004>.
- Habbout, Ahmed, Na Li, Luc Rochette, et Catherine Vergely. 2013. « Postnatal Overfeeding in Rodents by Litter Size Reduction Induces Major Short- and Long-Term Pathophysiological Consequences ». *The Journal of Nutrition* 143 (5): 553-62. <https://doi.org/10.3945/jn.112.172825>.
- Haenen, G. R., J. B. Paquay, R. E. Korthouwer, et A. Bast. 1997. « Peroxynitrite Scavenging by Flavonoids ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 236 (3): 591-93. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7016>.
- Halliwell, Barry. 2012. « Free Radicals and Antioxidants: Updating a Personal View ». *Nutrition Reviews* 70 (5): 257-65. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00476.x>.
- Hamani, Djamel, Mirjam Kuhn, Christine Charrueau, Anne-Judith Waligora-Dupriet, Nathalie Neveux, Marie-José Butel, Luc Cynober, et Christophe Moinard. 2010. « Interactions between Ω3 Polyunsaturated Fatty Acids and Arginine on Nutritional and Immunological Aspects in Severe Inflammation ». *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)* 29 (5): 654-62. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2010.02.011>.
- Hammond, C. L., T. K. Lee, et N. Ballatori. 2001. « Novel Roles for Glutathione in Gene Expression, Cell Death, and Membrane Transport of Organic Solutes ». *Journal of Hepatology* 34 (6): 946-54. [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(01\)00037-x](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(01)00037-x).

- Han, D, E Williams, et E Cadenas. 2001. « Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. » *Biochemical Journal* 353 (Pt 2): 411-16.
- Harman, D. 1956. « Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry ». *Journal of Gerontology* 11 (3): 298-300. <https://doi.org/10.1093/geronj/11.3.298>.
- Hashimoto, M., M. Akishita, M. Eto, K. Kozaki, J. Ako, N. Sugimoto, M. Yoshizumi, K. Toba, et Y. Ouchi. 1998. « The Impairment of Flow-Mediated Vasodilatation in Obese Men with Visceral Fat Accumulation ». *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity* 22 (5): 477-84.
- Haslam, J. M., et H. A. Krebs. 1968. « The permeability of mitochondria to oxaloacetate and malate ». *Biochemical Journal* 107 (5): 659-67.
- He, Ka, Yiqing Song, Martha L. Daviglius, Kiang Liu, Linda Van Horn, Alan R. Dyer, Uri Goldbourt, et Philip Greenland. 2004. « Fish Consumption and Incidence of Stroke: A Meta-Analysis of Cohort Studies ». *Stroke* 35 (7): 1538-42. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000130856.31468.47>.
- He, Ka, Yiqing Song, Martha L. Daviglius, Kiang Liu, Linda Van Horn, Alan R. Dyer, et Philip Greenland. 2004. « Accumulated Evidence on Fish Consumption and Coronary Heart Disease Mortality: A Meta-Analysis of Cohort Studies ». *Circulation* 109 (22): 2705-11. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000132503.19410.6B>.
- Heim, Kelly E., Anthony R. Tagliaferro, et Dennis J. Bobilya. 2002. « Flavonoid Antioxidants: Chemistry, Metabolism and Structure-Activity Relationships ». *The Journal of Nutritional Biochemistry* 13 (10): 572-84.
- Heyland, D. K., F. Novak, J. W. Drover, M. Jain, X. Su, et U. Suchner. 2001. « Should Immunonutrition Become Routine in Critically Ill Patients? A Systematic Review of the Evidence ». *JAMA* 286 (8): 944-53. <https://doi.org/10.1001/jama.286.8.944>.
- Hink, H. Ulrich, Nalini Santanam, Sergey Dikalov, Louise McCann, Andrew D. Nguyen, Sampath Parthasarathy, David G. Harrison, et Tohru Fukai. 2002. « Peroxidase Properties of Extracellular Superoxide Dismutase: Role of Uric Acid in Modulating in Vivo Activity ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 22 (9): 1402-8. <https://doi.org/10.1161/01.atv.0000027524.86752.02>.
- Hirosumi, Jiro, Gürol Tuncman, Lufen Chang, Cem Z. Görgün, K. Teoman Uysal, Kazuhisa Maeda, Michael Karin, et Gökhan S. Hotamisligil. 2002. « A Central Role for JNK in Obesity and Insulin Resistance ». *Nature* 420 (6913): 333-36. <https://doi.org/10.1038/nature01137>.
- Hochstadt, Aviram, Yuval Meroz, et Giora Landesberg. 2011. « Myocardial Dysfunction in Severe Sepsis and Septic Shock: More Questions than Answers? » *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia* 25 (3): 526-35. <https://doi.org/10.1053/j.jvca.2010.11.026>.
- Hooper, Lee, Rachel L Thompson, Roger A Harrison, Carolyn D Summerbell, Andy R Ness, Helen J Moore, Helen V Worthington, et al. 2006. « Risks and benefits of omega 3 fats for mortality, cardiovascular disease, and cancer: systematic review ». *BMJ: British Medical Journal* 332 (7544): 752-60. <https://doi.org/10.1136/bmj.38755.366331.2F>.
- Hsu, Chiao-Po, Shinichi Oka, Dan Shao, Nirmala Hariharan, et Junichi Sadoshima. 2009. « Nicotinamide Phosphoribosyltransferase Regulates Cell Survival through NAD⁺ Synthesis in Cardiac Myocytes ». *Circulation Research* 105 (5): 481-91. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.203703>.
- Hu, Frank B., et JoAnn E. Manson. 2012. « Omega-3 Fatty Acids and Secondary Prevention of Cardiovascular Disease-Is It Just a Fish Tale?: Comment on “Efficacy of Omega-3 Fatty Acid Supplements (Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid) in the

- Secondary Prevention of Cardiovascular Disease” ». *Archives of Internal Medicine* 172 (9): 694-96. <https://doi.org/10.1001/archinternmed.2012.463>.
- Hu, J. P., M. Calomme, A. Lasure, T. De Bruyne, L. Pieters, A. Vlietinck, et D. A. Vanden Berghe. 1995. « Structure-Activity Relationship of Flavonoids with Superoxide Scavenging Activity ». *Biological Trace Element Research* 47 (1-3): 327-31. <https://doi.org/10.1007/BF02790134>.
- Huet, Olivier, Laurent Dupic, Anatole Harrois, et Jacques Duranteau. 2011. « Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction during Sepsis ». *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)* 16 (janvier): 1986-95.
- Hunter, D. J., I. Kazda, A. Chockalingam, et J. G. Fodor. 1988. « Fish Consumption and Cardiovascular Mortality in Canada: An Inter-Regional Comparison ». *American Journal of Preventive Medicine* 4 (1): 5-10.
- Hunter, J. D., et M. Doddi. 2010. « Sepsis and the Heart ». *British Journal of Anaesthesia* 104 (1): 3-11. <https://doi.org/10.1093/bja/aep339>.
- Hwang, Jung Me, Jin Sook Cho, Tae Hyeon Kim, et Young Ik Lee. 2010. « Ellagic Acid Protects Hepatocytes from Damage by Inhibiting Mitochondrial Production of Reactive Oxygen Species ». *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 64 (4): 264-70. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2009.06.013>.
- Hyndman, Kelly A., et Mark A. Knepper. 2017. « Dynamic Regulation of Lysine Acetylation: The Balance between Acetyltransferase and Deacetylase Activities ». *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 313 (4): F842-46. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00313.2017>.
- Iacobellis, Gianluca. 2015. « Local and Systemic Effects of the Multifaceted Epicardial Adipose Tissue Depot ». *Nature Reviews. Endocrinology* 11 (6): 363-71. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.58>.
- Ichimura, Atsuhiko, Akira Hirasawa, Odile Poulain-Godefroy, Amélie Bonnefond, Takafumi Hara, Loïc Yengo, Ikuo Kimura, et al. 2012. « Dysfunction of Lipid Sensor GPR120 Leads to Obesity in Both Mouse and Human ». *Nature* 483 (7389): 350-54. <https://doi.org/10.1038/nature10798>.
- « IDF Diabetes Atlas - 2017 Atlas ». s.d. Consulté le 24 août 2019. <https://diabetesatlas.org/resources/2017-atlas.html>.
- Imai, S., C. M. Armstrong, M. Kaeberlein, et L. Guarente. 2000. « Transcriptional Silencing and Longevity Protein Sir2 Is an NAD-Dependent Histone Deacetylase ». *Nature* 403 (6771): 795-800. <https://doi.org/10.1038/35001622>.
- Indiveri, C., R. Krämer, et F. Palmieri. 1987. « Reconstitution of the Malate/Aspartate Shuttle from Mitochondria ». *The Journal of Biological Chemistry* 262 (33): 15979-83.
- Jacob, Claus. 2006. « A Scent of Therapy: Pharmacological Implications of Natural Products Containing Redox-Active Sulfur Atoms ». *Natural Product Reports* 23 (6): 851-63. <https://doi.org/10.1039/b609523m>.
- Jain, A. P., K. K. Aggarwal, et P.-Y. Zhang. 2015. « Omega-3 Fatty Acids and Cardiovascular Disease ». *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 19 (3): 441-45.
- Jang, Hyun-Ju, Simone D. Ridgeway, et Jeong-A. Kim. 2013. « Effects of the Green Tea Polyphenol Epigallocatechin-3-Gallate on High-Fat Diet-Induced Insulin Resistance and Endothelial Dysfunction ». *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 305 (12): E1444-1451. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00434.2013>.
- Jang, Sehwan, et Sabzali Javadov. 2018. « Elucidating the Contribution of ETC Complexes I and II to the Respirasome Formation in Cardiac Mitochondria ». *Scientific Reports* 8 (1): 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36040-9>.
- Jansen, Felix, Xiaoyan Yang, Bernardo S. Franklin, Marion Hoelscher, Theresa Schmitz, Jörg Bedorf, Georg Nickenig, et Nikos Werner. 2013. « High Glucose Condition Increases

- NADPH Oxidase Activity in Endothelial Microparticles That Promote Vascular Inflammation ». *Cardiovascular Research* 98 (1): 94-106. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt013>.
- Jensen, P. K. 1966. « Antimycin-insensitive oxidation of succinate and reduced nicotinamide-adenine dinucleotide in electron-transport particles I. pH dependency and hydrogen peroxide formation ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology and Biological Oxidation* 122 (2): 157-66. [https://doi.org/10.1016/0926-6593\(66\)90057-9](https://doi.org/10.1016/0926-6593(66)90057-9).
- Jezeek, Petr, et Lydie Hlavatá. 2005. « Mitochondria in Homeostasis of Reactive Oxygen Species in Cell, Tissues, and Organism ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37 (12): 2478-2503. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.05.013>.
- Jia, Guanghong, Vincent G. DeMarco, et James R. Sowers. 2016. « Insulin Resistance and Hyperinsulinaemia in Diabetic Cardiomyopathy ». *Nature Reviews. Endocrinology* 12 (3): 144-53. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.216>.
- Jia, Guanghong, Adam Whaley-Connell, et James R. Sowers. 2018. « Diabetic cardiomyopathy: a hyperglycaemia- and insulin-resistance-induced heart disease ». *Diabetologia* 61 (1): 21-28. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4390-4>.
- Jump, Donald B., Christopher M. Depner, et Sasmita Tripathy. 2012. « Omega-3 Fatty Acid Supplementation and Cardiovascular Disease ». *Journal of Lipid Research* 53 (12): 2525-45. <https://doi.org/10.1194/jlr.R027904>.
- Jung, Seung-Nam, Woo Kyeom Yang, Joungmok Kim, Hak Su Kim, Eun Ju Kim, Hee Yun, Hyunsung Park, et al. 2008. « Reactive Oxygen Species Stabilize Hypoxia-Inducible Factor-1 Alpha Protein and Stimulate Transcriptional Activity via AMP-Activated Protein Kinase in DU145 Human Prostate Cancer Cells ». *Carcinogenesis* 29 (4): 713-21. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn032>.
- Kajiya, K., M. Ichiba, M. Kuwabara, S. Kumazawa, et T. Nakayama. 2001. « Role of Lipophilicity and Hydrogen Peroxide Formation in the Cytotoxicity of Flavonols ». *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 65 (5): 1227-29. <https://doi.org/10.1271/bbb.65.1227>.
- Kammermeier, H. 1987. « Why Do Cells Need Phosphocreatine and a Phosphocreatine Shuttle ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 19 (1): 115-18. [https://doi.org/10.1016/s0022-2828\(87\)80550-3](https://doi.org/10.1016/s0022-2828(87)80550-3).
- Kao, Yung-Hsi, Hsin-Huei Chang, Meng-Jung Lee, et Chia-Lin Chen. 2006. « Tea, Obesity, and Diabetes ». *Molecular Nutrition & Food Research* 50 (2): 188-210. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200500109>.
- Kapiotis, Stylianos, Gregor Holzer, Georg Schaller, Markus Haumer, Harald Widhalm, Daniel Weghuber, Bernd Jilma, et al. 2006. « A Proinflammatory State Is Detectable in Obese Children and Is Accompanied by Functional and Morphological Vascular Changes ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26 (11): 2541-46. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000245795.08139.70>.
- Karam, Basil S., Alejandro Chavez-Moreno, Wonjoon Koh, Joseph G. Akar, et Fadi G. Akar. 2017. « Oxidative Stress and Inflammation as Central Mediators of Atrial Fibrillation in Obesity and Diabetes ». *Cardiovascular Diabetology* 16 (1): 120. <https://doi.org/10.1186/s12933-017-0604-9>.
- Karamanlidis, Georgios, Chi Fung Lee, Lorena Garcia-Menendez, Stephen C. Kolwicz, Wichit Suthammarak, Guohua Gong, Margaret M. Sedensky, Philip G. Morgan, Wang Wang, et Rong Tian. 2013. « Mitochondrial Complex I Deficiency Increases Protein Acetylation and Accelerates Heart Failure ». *Cell Metabolism* 18 (2): 239-50. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.07.002>.
- Karg, Kathrin, Verena M. Dirsch, Angelika M. Vollmar, Jean-Luc Cracowski, François Laporte, et Martin J. Mueller. 2007. « Biologically Active Oxidized Lipids

- (Phytosteranes) in the Plant Diet and Parenteral Lipid Nutrition ». *Free Radical Research* 41 (1): 25-37. <https://doi.org/10.1080/10715760600939734>.
- Karlenius, Therese Christina, et Kathryn Fay Tonissen. 2010. « Thioredoxin and Cancer: A Role for Thioredoxin in all States of Tumor Oxygenation ». *Cancers* 2 (2): 209-32. <https://doi.org/10.3390/cancers2020209>.
- Karmazyn, M., J. V. Sostaric, et X. T. Gan. 2001. « The Myocardial Na⁺/H⁺ Exchanger: A Potential Therapeutic Target for the Prevention of Myocardial Ischaemic and Reperfusion Injury and Attenuation of Postinfarction Heart Failure ». *Drugs* 61 (3): 375-89. <https://doi.org/10.2165/00003495-200161030-00006>.
- Kazemian, Pedram, Seyyed M. R. Kazemi-Bajestani, Aws Alherbish, Justin Steed, et Gavin Y. Oudit. 2012. « The Use of ω -3 Poly-Unsaturated Fatty Acids in Heart Failure: A Preferential Role in Patients with Diabetes ». *Cardiovascular Drugs and Therapy* 26 (4): 311-20. <https://doi.org/10.1007/s10557-012-6397-x>.
- Kerner, J., et C. Hoppel. 2000. « Fatty Acid Import into Mitochondria ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1486 (1): 1-17. [https://doi.org/10.1016/s1388-1981\(00\)00044-5](https://doi.org/10.1016/s1388-1981(00)00044-5).
- Khalil, Raouf A. 2011. « Modulators of the Vascular Endothelin Receptor in Blood Pressure Regulation and Hypertension ». *Current Molecular Pharmacology* 4 (3): 176-86.
- Khan, Nagma, et Hasan Mukhtar. 2013. « Tea and Health: Studies in Humans ». *Current Pharmaceutical Design* 19 (34): 6141-47. <https://doi.org/10.2174/1381612811319340008>.
- Khor, Boon-Siang, Shiumn-Jen Liaw, Hsin-Chin Shih, et Liang-Shun Wang. 2011. « Randomized, Double Blind, Placebo-Controlled Trial of Fish-Oil-Based Lipid Emulsion Infusion for Treatment of Critically Ill Patients with Severe Sepsis ». *Asian Journal of Surgery* 34 (1): 1-10. [https://doi.org/10.1016/S1015-9584\(11\)60011-0](https://doi.org/10.1016/S1015-9584(11)60011-0).
- Kim, Eun Hee, Eun Hee Koh, Joong-Yeol Park, et Ki-Up Lee. 2010. « Adenine Nucleotide Translocator as a Regulator of Mitochondrial Function: Implication in the Pathogenesis of Metabolic Syndrome ». *Korean Diabetes Journal* 34 (3): 146-53. <https://doi.org/10.4093/kdj.2010.34.3.146>.
- Kim, Hyung J., Oleh Khalimonchuk, Pamela M. Smith, et Dennis R. Winge. 2012. « Structure, Function, and Assembly of Heme Centers in Mitochondrial Respiratory Complexes ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1823 (9): 1604-16. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.04.008>.
- Kim, Seok Jai, Mei Li, Cheol Won Jeong, Hong Beom Bae, Sang Hyun Kwak, Seong Heon Lee, Hyun Jung Lee, Bong Ha Heo, Keun Bae Yook, et Kyung Yeon Yoo. 2014. « Epigallocatechin-3-Gallate, a Green Tea Catechin, Protects the Heart against Regional Ischemia-Reperfusion Injuries through Activation of RISK Survival Pathways in Rats ». *Archives of Pharmacal Research* 37 (8): 1079-85. <https://doi.org/10.1007/s12272-013-0309-x>.
- Kipp, Anna P. 2017. « Selenium-Dependent Glutathione Peroxidases During Tumor Development ». *Advances in Cancer Research* 136: 109-38. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2017.07.004>.
- Kirkman, Henry N., et Gian F. Gaetani. 2007. « Mammalian Catalase: A Venerable Enzyme with New Mysteries ». *Trends in Biochemical Sciences* 32 (1): 44-50. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.11.003>.
- Kirsch, A., et F. Savabi. 1992. « Effect of Food Restriction on the Phosphocreatine Energy Shuttle Components in Rat Heart ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 24 (8): 821-30. [https://doi.org/10.1016/0022-2828\(92\)91096-n](https://doi.org/10.1016/0022-2828(92)91096-n).
- Kleinbongard, Petra, Nilguen Gedik, Mucella Kirca, Leanda Stoian, Ulrich Frey, Afsaneh Zandi, Matthias Thielmann, et al. 2018. « Mitochondrial and Contractile Function of Human Right Atrial Tissue in Response to Remote Ischemic Conditioning ». *Journal of*

- the American Heart Association* 7 (15): e009540. <https://doi.org/10.1161/JAHA.118.009540>.
- Konior, Anna, Agata Schramm, Marta Czesnikiewicz-Guzik, et Tomasz J. Guzik. 2014. « NADPH Oxidases in Vascular Pathology ». *Antioxidants & Redox Signaling* 20 (17): 2794-2814. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5607>.
- Körner, Andreas, Martin Schlegel, Julia Theurer, Hannes Frohnmeyer, Michael Adolph, Marieke Heijink, Martin Giera, Peter Rosenberger, et Valbona Mirakaj. 2018. « Resolution of Inflammation and Sepsis Survival Are Improved by Dietary Ω -3 Fatty Acids ». *Cell Death and Differentiation* 25 (2): 421-31. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.177>.
- Korshunov, S. S., O. V. Korkina, E. K. Ruuge, V. P. Skulachev, et A. A. Starkov. 1998. « Fatty Acids as Natural Uncouplers Preventing Generation of O₂·- and H₂O₂ by Mitochondria in the Resting State ». *FEBS Letters* 435 (2-3): 215-18. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)01073-4](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)01073-4).
- Koves, Timothy R., John R. Ussher, Robert C. Noland, Dorothy Slentz, Merrie Mosedale, Olga Ilkayeva, James Bain, et al. 2008. « Mitochondrial Overload and Incomplete Fatty Acid Oxidation Contribute to Skeletal Muscle Insulin Resistance ». *Cell Metabolism* 7 (1): 45-56. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.10.013>.
- Kowalczyk, Agata, Paulina Kleniewska, Michal Kolodziejczyk, Beata Skibska, et Anna Goraca. 2015. « The Role of Endothelin-1 and Endothelin Receptor Antagonists in Inflammatory Response and Sepsis ». *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis* 63 (1): 41-52. <https://doi.org/10.1007/s00005-014-0310-1>.
- Koyama, Tetsuro, Shinji Kume, Daisuke Koya, Shin-ichi Araki, Keiji Isshiki, Masami Chin-Kanasaki, Toshiro Sugimoto, et al. 2011. « SIRT3 Attenuates Palmitate-Induced ROS Production and Inflammation in Proximal Tubular Cells ». *Free Radical Biology & Medicine* 51 (6): 1258-67. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.028>.
- Kris-Etherton, Penny M., William S. Harris, Lawrence J. Appel, et American Heart Association. Nutrition Committee. 2002. « Fish Consumption, Fish Oil, Omega-3 Fatty Acids, and Cardiovascular Disease ». *Circulation* 106 (21): 2747-57. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000038493.65177.94>.
- Kromhout, Daan, Erik J. Giltay, Johanna M. Geleijnse, et Alpha Omega Trial Group. 2010. « N-3 Fatty Acids and Cardiovascular Events after Myocardial Infarction ». *The New England Journal of Medicine* 363 (21): 2015-26. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1003603>.
- Kudryavtseva, Anna V., George S. Krasnov, Alexey A. Dmitriev, Boris Y. Alekseev, Olga L. Kardymon, Asiya F. Sadritdinova, Maria S. Fedorova, et al. 2016. « Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Aging and Cancer ». *Oncotarget* 7 (29): 44879-905. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9821>.
- Kwak, Sang Mi, Seung-Kwon Myung, Young Jae Lee, Hong Gwan Seo, et Korean Meta-analysis Study Group. 2012. « Efficacy of Omega-3 Fatty Acid Supplements (Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid) in the Secondary Prevention of Cardiovascular Disease: A Meta-Analysis of Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trials ». *Archives of Internal Medicine* 172 (9): 686-94. <https://doi.org/10.1001/archinternmed.2012.262>.
- Lai, Heidi Tm, Marcia C. de Oliveira Otto, Rozenn N. Lemaitre, Barbara McKnight, Xiaoling Song, Irena B. King, Paulo Hm Chaves, et al. 2018. « Serial Circulating Omega 3 Polyunsaturated Fatty Acids and Healthy Ageing among Older Adults in the Cardiovascular Health Study: Prospective Cohort Study ». *BMJ (Clinical Research Ed.)* 363: k4067. <https://doi.org/10.1136/bmj.k4067>.

- Larsen, Rune, Karl-Erik Eilertsen, et Edel O. Elvevoll. 2011. « Health Benefits of Marine Foods and Ingredients ». *Biotechnology Advances* 29 (5): 508-18. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.017>.
- Lastra, Guido, Camila Manrique, Guanghong Jia, Annayya R. Aroor, Melvin R. Hayden, Brady J. Barron, Brett Niles, Jaume Padilla, et James R. Sowers. 2017. « Xanthine Oxidase Inhibition Protects against Western Diet-Induced Aortic Stiffness and Impaired Vasorelaxation in Female Mice ». *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 313 (2): R67-77. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00483.2016>.
- Lee, Je Min, Hyungjae Lee, SeokBeom Kang, et Woo Jung Park. 2016. « Fatty Acid Desaturases, Polyunsaturated Fatty Acid Regulation, and Biotechnological Advances ». *Nutrients* 8 (1). <https://doi.org/10.3390/nu8010023>.
- Lee, Mak-Soon, Chong-Tai Kim, et Yangha Kim. 2009. « Green Tea (-)-Epigallocatechin-3-Gallate Reduces Body Weight with Regulation of Multiple Genes Expression in Adipose Tissue of Diet-Induced Obese Mice ». *Annals of Nutrition & Metabolism* 54 (2): 151-57. <https://doi.org/10.1159/000214834>.
- Legrand, Philippe, B. Schmitt, J. Mourot, D. Catheline, G. Chesneau, M. Mireaux, N. Kerhoas, et P. Weill. 2010. « The Consumption of Food Products from Linseed-Fed Animals Maintains Erythrocyte Omega-3 Fatty Acids in Obese Humans ». *Lipids* 45 (1): 11-19. <https://doi.org/10.1007/s11745-009-3376-5>.
- Lenaz, Giorgio, Romana Fato, Maria Luisa Genova, Christian Bergamini, Cristina Bianchi, et Annalisa Biondi. 2006. « Mitochondrial Complex I: Structural and functional aspects ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, Mitochondria: from Molecular Insight to Physiology and Pathology*, 1757 (9): 1406-20. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.05.007>.
- Lepretti, Marilena, Stefania Martucciello, Mario Alberto Burgos Aceves, Rosalba Putti, et Lilla Lionetti. 2018. « Omega-3 Fatty Acids and Insulin Resistance: Focus on the Regulation of Mitochondria and Endoplasmic Reticulum Stress ». *Nutrients* 10 (3). <https://doi.org/10.3390/nu10030350>.
- « Les chiffres du diabète en France ». s.d. Consulté le 22 septembre 2019. <https://www.federationdesdiabetiques.org/information/diabete/chiffres-france>.
- Letts, James A., et Leonid A. Sazanov. 2017. « Clarifying the Supercomplex: The Higher-Order Organization of the Mitochondrial Electron Transport Chain ». *Nature Structural & Molecular Biology* 24 (10): 800-808. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3460>.
- Leveille, Cameron F., John S. Mikhail, Kelli D. Turner, Sebastian Silvera, Jennifer Wilkinson, et Val A. Fajardo. 2017. « Mitochondrial cristae density: a dynamic entity that is critical for energy production and metabolic power in skeletal muscle ». *The Journal of Physiology* 595 (9): 2779-80. <https://doi.org/10.1113/JP274158>.
- Levy, Richard J. 2007. « Mitochondrial Dysfunction, Bioenergetic Impairment, and Metabolic down-Regulation in Sepsis ». *Shock (Augusta, Ga.)* 28 (1): 24-28. <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000235089.30550.2d>.
- Ley, Sylvia H., Osama Hamdy, Viswanathan Mohan, et Frank B. Hu. 2014. « Prevention and Management of Type 2 Diabetes: Dietary Components and Nutritional Strategies ». *Lancet (London, England)* 383 (9933): 1999-2007. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60613-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60613-9).
- Li, Duo. 2015. « Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Non-Communicable Diseases: Meta-Analysis Based Systematic Review ». *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 24 (1): 10-15. <https://doi.org/10.6133/apjcn.2015.24.1.21>.
- Li, Juan, Hang Li, Haibin Li, Weili Guo, Zhen An, Xiang Zeng, Wen Li, Huijun Li, Jie Song, et Weidong Wu. 2019. « Amelioration of PM2.5-Induced Lung Toxicity in Rats by

- Nutritional Supplementation with Fish Oil and Vitamin E ». *Respiratory Research* 20 (1): 76. <https://doi.org/10.1186/s12931-019-1045-7>.
- Li, Xiaole, Jia Li, Lulu Wang, Aiyun Li, Zhixia Qiu, Lian-Wen Qi, Junping Kou, Kang Liu, Baolin Liu, et Fang Huang. 2016. « The Role of Metformin and Resveratrol in the Prevention of Hypoxia-Inducible Factor 1 α Accumulation and Fibrosis in Hypoxic Adipose Tissue ». *British Journal of Pharmacology* 173 (12): 2001-15. <https://doi.org/10.1111/bph.13493>.
- Liesa, Marc, Manuel Palacín, et Antonio Zorzano. 2009. « Mitochondrial Dynamics in Mammalian Health and Disease ». *Physiological Reviews* 89 (3): 799-845. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2008>.
- Ling, Binbing, Fei Peng, Jane Alcorn, Katharina Lohmann, Brian Bandy, et Gordon A Zello. 2012. « D-Lactate altered mitochondrial energy production in rat brain and heart but not liver ». *Nutrition & Metabolism* 9 (février): 6. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-9-6>.
- Liu, J., Y. Tang, Z. Feng, J. Liu, J. Liu, et J. Long. 2014. « (-)-Epigallocatechin-3-Gallate Attenuated Myocardial Mitochondrial Dysfunction and Autophagy in Diabetic Goto-Kakizaki Rats ». *Free Radical Research* 48 (8): 898-906. <https://doi.org/10.3109/10715762.2014.920955>.
- Liu, Li, Yin Wang, Zhi-Yong Cao, Meng-Meng Wang, Xue-Mei Liu, Ting Gao, Qi-Kuan Hu, Wen-Jun Yuan, et Li Lin. 2015. « Up-Regulated TLR4 in Cardiomyocytes Exacerbates Heart Failure after Long-Term Myocardial Infarction ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 19 (12): 2728-40. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12659>.
- Lopaschuk, G. D., D. D. Belke, J. Gamble, T. Itoi, et B. O. Schönekeess. 1994. « Regulation of Fatty Acid Oxidation in the Mammalian Heart in Health and Disease ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1213 (3): 263-76. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(94\)00082-4](https://doi.org/10.1016/0005-2760(94)00082-4).
- Lopaschuk, Gary D., et William C. Stanley. 2006. « Malonyl-CoA Decarboxylase Inhibition as a Novel Approach to Treat Ischemic Heart Disease ». *Cardiovascular Drugs and Therapy* 20 (6): 433-39. <https://doi.org/10.1007/s10557-006-0634-0>.
- Lorente-Cebrián, Silvia, André G. V. Costa, Santiago Navas-Carretero, María Zabala, J. Alfredo Martínez, et María J. Moreno-Aliaga. 2013. « Role of Omega-3 Fatty Acids in Obesity, Metabolic Syndrome, and Cardiovascular Diseases: A Review of the Evidence ». *Journal of Physiology and Biochemistry* 69 (3): 633-51. <https://doi.org/10.1007/s13105-013-0265-4>.
- Lu, Clara, Sunjay Sharma, Lauralyn McIntyre, Andrew Rhodes, Laura Evans, Saleh Almenawer, Lori Leduc, Derek C. Angus, et Waleed Alhazzani. 2017. « Omega-3 Supplementation in Patients with Sepsis: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Trials ». *Annals of Intensive Care* 7 (1): 58. <https://doi.org/10.1186/s13613-017-0282-5>.
- Lu, Jun, et Arne Holmgren. 2014. « The thioredoxin antioxidant system ». *Free Radical Biology and Medicine*, Antioxidants, 66 (janvier): 75-87. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.036>.
- Luo, Suxin, Han Lei, Honghua Qin, et Yong Xia. 2014. « Molecular Mechanisms of Endothelial NO Synthase Uncoupling ». *Current Pharmaceutical Design* 20 (22): 3548-53. <https://doi.org/10.2174/13816128113196660746>.
- Lushchak, Volodymyr I. 2014. « Free Radicals, Reactive Oxygen Species, Oxidative Stress and Its Classification ». *Chemico-Biological Interactions* 224 (décembre): 164-75. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.10.016>.
- Maehara, K., T. Hasegawa, et K. I. Isobe. 2000. « A NF-KappaB P65 Subunit Is Indispensable for Activating Manganese Superoxide: Dismutase Gene Transcription Mediated by Tumor Necrosis Factor-Alpha ». *Journal of Cellular Biochemistry* 77 (3): 474-86.

- Margis, Rogerio, Christophe Dunand, Felipe K. Teixeira, et Marcia Margis-Pinheiro. 2008. « Glutathione Peroxidase Family - an Evolutionary Overview ». *The FEBS Journal* 275 (15): 3959-70. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06542.x>.
- Mariappan, Nithya, Carrie M. Elks, Srinivas Sriramula, Anuradha Guggilam, Zhizhen Liu, Olga Borkhsenius, et Joseph Francis. 2010. « NF-KappaB-Induced Oxidative Stress Contributes to Mitochondrial and Cardiac Dysfunction in Type II Diabetes ». *Cardiovascular Research* 85 (3): 473-83. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp305>.
- Martin, Julie M., et Renee D. Stapleton. 2010. « Omega-3 Fatty Acids in Critical Illness ». *Nutrition Reviews* 68 (9): 531-41. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00313.x>.
- Martínez, M. Carmen, et Ramarosan Andriantsitohaina. 2009. « Reactive Nitrogen Species: Molecular Mechanisms and Potential Significance in Health and Disease ». *Antioxidants & Redox Signaling* 11 (3): 669-702. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1993>.
- Martins, Julian G. 2009. « EPA but Not DHA Appears to Be Responsible for the Efficacy of Omega-3 Long Chain Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation in Depression: Evidence from a Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials ». *Journal of the American College of Nutrition* 28 (5): 525-42. <https://doi.org/10.1080/07315724.2009.10719785>.
- Mas, Emilie, Richard J. Woodman, Valerie Burke, Ian B. Puddey, Lawrence J. Beilin, Thierry Durand, et Trevor A. Mori. 2010. « The Omega-3 Fatty Acids EPA and DHA Decrease Plasma F(2)-Isoprostanes: Results from Two Placebo-Controlled Interventions ». *Free Radical Research* 44 (9): 983-90. <https://doi.org/10.3109/10715762.2010.492830>.
- Masella, Roberta, Roberta Di Benedetto, Rosaria Vari, Carmela Filesi, et Claudio Giovannini. 2005. « Novel Mechanisms of Natural Antioxidant Compounds in Biological Systems: Involvement of Glutathione and Glutathione-Related Enzymes ». *The Journal of Nutritional Biochemistry* 16 (10): 577-86. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.05.013>.
- Massaad, Cynthia A., et Eric Klann. 2011. « Reactive Oxygen Species in the Regulation of Synaptic Plasticity and Memory ». *Antioxidants & Redox Signaling* 14 (10): 2013-54. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3208>.
- Massaro, Marika, Egeria Scoditti, Maria Annunziata Carluccio, Maria Rosa Montinari, et Raffaele De Caterina. 2008. « Omega-3 Fatty Acids, Inflammation and Angiogenesis: Nutrigenomic Effects as an Explanation for Anti-Atherogenic and Anti-Inflammatory Effects of Fish and Fish Oils ». *Lifestyle Genomics* 1 (1-2): 4-23. <https://doi.org/10.1159/000109871>.
- Matés, J. M., C. Pérez-Gómez, et I. Núñez de Castro. 1999. « Antioxidant Enzymes and Human Diseases ». *Clinical Biochemistry* 32 (8): 595-603. [https://doi.org/10.1016/s0009-9120\(99\)00075-2](https://doi.org/10.1016/s0009-9120(99)00075-2).
- Matteucci, E., S. I. Rizvi, et O. Giampietro. 2001. « Erythrocyte Sodium/Hydrogen Exchange Inhibition by (-) Epicatechin ». *Cell Biology International* 25 (8): 771-76. <https://doi.org/10.1006/cbir.2000.0719>.
- McCord, J. M., et I. Fridovich. 1969. « Superoxide Dismutase. An Enzymic Function for Erythrocyte (Hemocuprein) ». *The Journal of Biological Chemistry* 244 (22): 6049-55.
- McDougle, Daniel R., Josephine E. Watson, Amr A. Abdeen, Rehemana Adili, Megan P. Caputo, John E. Krapf, Rodney W. Johnson, Kristopher A. Kilian, Michael Holinstat, et Aditi Das. 2017. « Anti-Inflammatory ω -3 Endocannabinoid Epoxides ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (30): E6034-43. <https://doi.org/10.1073/pnas.1610325114>.

- McGinnis, Woody R. 2004. « Oxidative Stress in Autism ». *Alternative Therapies in Health and Medicine* 10 (6): 22-36; quiz 37, 92.
- McLennan, Peter L. 2014. « Cardiac Physiology and Clinical Efficacy of Dietary Fish Oil Clarified through Cellular Mechanisms of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids ». *European Journal of Applied Physiology* 114 (7): 1333-56. <https://doi.org/10.1007/s00421-014-2876-z>.
- McLennan, Peter L., Mahinda Y. Abeywardena, Julie A. Dallimore, et Daniel Raederstorff. 2012. « Dietary Fish Oil Preserves Cardiac Function in the Hypertrophied Rat Heart ». *The British Journal of Nutrition* 108 (4): 645-54. <https://doi.org/10.1017/S0007114511005915>.
- Meydani, S. N., S. Endres, M. M. Woods, B. R. Goldin, C. Soo, A. Morrill-Labrode, C. A. Dinarello, et S. L. Gorbach. 1991. « Oral (n-3) Fatty Acid Supplementation Suppresses Cytokine Production and Lymphocyte Proliferation: Comparison between Young and Older Women ». *The Journal of Nutrition* 121 (4): 547-55. <https://doi.org/10.1093/jn/121.4.547>.
- Meynier, Alexandra, Hafida Razik, Catherine Cordelet, Stéphane Grégoire, et Luc Demaison. 2003. « Involvement of Oxygen Free Radicals in the Respiratory Uncoupling Induced by Free Calcium and ADP-Magnesium in Isolated Cardiac Mitochondria: Comparing Reoxygenation in Cultured Cardiomyocytes ». *Molecular and Cellular Biochemistry* 243 (1-2): 55-64. <https://doi.org/10.1023/a:1021650807032>.
- Micek, Scott T, Colleen McEvoy, Matthew McKenzie, Nicholas Hampton, Joshua A Doherty, et Marin H Kollef. 2013. « Fluid balance and cardiac function in septic shock as predictors of hospital mortality ». *Critical Care* 17 (5): R246. <https://doi.org/10.1186/cc13072>.
- Micha, Renata, Shahab Khatibzadeh, Peilin Shi, Saman Fahimi, Stephen Lim, Kathryn G. Andrews, Rebecca E. Engell, et al. 2014. « Global, Regional, and National Consumption Levels of Dietary Fats and Oils in 1990 and 2010: A Systematic Analysis Including 266 Country-Specific Nutrition Surveys ». *BMJ (Clinical Research Ed.)* 348 (avril): g2272. <https://doi.org/10.1136/bmj.g2272>.
- Milstien, S., et Z. Katusic. 1999. « Oxidation of Tetrahydrobiopterin by Peroxynitrite: Implications for Vascular Endothelial Function ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 263 (3): 681-84. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1422>.
- Mio, Yasushi, Martin W. Bienengraeber, Jasna Marinovic, David D. Gutterman, Mladen Rakic, Zeljko J. Bosnjak, et Anna Stadnicka. 2008. « Age-Related Attenuation of Isoflurane Preconditioning in Human Atrial Cardiomyocytes: Roles for Mitochondrial Respiration and Sarcolemmal Adenosine Triphosphate-Sensitive Potassium Channel Activity ». *Anesthesiology* 108 (4): 612-20. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e318167af2d>.
- Mitchell, P. 1961. « Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic Type of Mechanism ». *Nature* 191 (juillet): 144-48. <https://doi.org/10.1038/191144a0>.
- Mladěnka, Přemysl, Lenka Applová, Jiří Patočka, Vera Marisa Costa, Fernando Remiao, Jana Pourová, Aleš Mladěnka, et al. 2018. « Comprehensive review of cardiovascular toxicity of drugs and related agents ». *Medicinal Research Reviews* 38 (4): 1332-1403. <https://doi.org/10.1002/med.21476>.
- Monick, Martha M., Linda S. Powers, Christopher W. Barrett, Sara Hinde, Alix Ashare, Dayna J. Groskreutz, Toru Nyunoya, Mitchell Coleman, Douglas R. Spitz, et Gary W. Hunninghake. 2008. « Constitutive ERK MAPK Activity Regulates Macrophage ATP Production and Mitochondrial Integrity ». *The Journal of Immunology* 180 (11): 7485-96. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.11.7485>.

- Mookerjee, Shona A., Akos A. Gerencser, David G. Nicholls, et Martin D. Brand. 2017. « Quantifying Intracellular Rates of Glycolytic and Oxidative ATP Production and Consumption Using Extracellular Flux Measurements ». *The Journal of Biological Chemistry* 292 (17): 7189-7207. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.774471>.
- Moore, Rosalind J., Kim G. Jackson, et Anne M. Minihane. 2009. « Green Tea (Camellia Sinensis) Catechins and Vascular Function ». *The British Journal of Nutrition* 102 (12): 1790-1802. <https://doi.org/10.1017/S0007114509991218>.
- Morgan, Michael J, et Zheng-gang Liu. 2011. « Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling ». *Cell Research* 21 (1): 103-15. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.178>.
- Mori, T. A., V. Burke, I. B. Puddey, G. F. Watts, D. N. O'Neal, J. D. Best, et L. J. Beilin. 2000. « Purified Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acids Have Differential Effects on Serum Lipids and Lipoproteins, LDL Particle Size, Glucose, and Insulin in Mildly Hyperlipidemic Men ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 71 (5): 1085-94. <https://doi.org/10.1093/ajcn/71.5.1085>.
- Mori, Trevor A., Richard J. Woodman, Valerie Burke, Ian B. Puddey, Kevin D. Croft, et Lawrence J. Beilin. 2003. « Effect of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid on Oxidative Stress and Inflammatory Markers in Treated-Hypertensive Type 2 Diabetic Subjects ». *Free Radical Biology & Medicine* 35 (7): 772-81. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(03\)00407-6](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(03)00407-6).
- Morin, Didier, Julien Musman, Sandrine Pons, Alain Berdeaux, et Bijan Ghaleh. 2016. « Mitochondrial Translocator Protein (TSPO): From Physiology to Cardioprotection ». *Biochemical Pharmacology* 105 (avril): 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.12.003>.
- Morota, Saori, Theodor Manolopoulos, Atli Eijolfsson, Per-Ola Kimblad, Per Wierup, Carsten Metzsch, Sten Blomquist, et Magnus J. Hansson. 2013. « Functional and Pharmacological Characteristics of Permeability Transition in Isolated Human Heart Mitochondria ». *PloS One* 8 (6): e67747. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067747>.
- Mourmoura, Evangelia, Valérie Chaté, Karine Couturier, Brigitte Laillet, Guillaume Vial, Jean-Paul Rigaudière, Béatrice Morio, Corinne Malpuech-Brugère, Kasra Azarnoush, et Luc Demaison. 2014. « Body Adiposity Dictates Different Mechanisms of Increased Coronary Reactivity Related to Improved in Vivo Cardiac Function ». *Cardiovascular Diabetology* 13 (février): 54. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-13-54>.
- Mourmoura, Evangelia, Jean-Paul Rigaudière, Karine Couturier, Isabelle Hininger, Brigitte Laillet, Corinne Malpuech-Brugère, Kasra Azarnoush, et Luc Demaison. 2016. « Long-Term Abdominal Adiposity Activates Several Parameters of Cardiac Energy Function ». *Journal of Physiology and Biochemistry* 72 (3): 525-37. <https://doi.org/10.1007/s13105-015-0427-7>.
- Mourmoura, Evangelia, Guillaume Vial, Brigitte Laillet, Jean-Paul Rigaudière, Isabelle Hininger-Favier, Hervé Dubouchaud, Beatrice Morio, et Luc Demaison. 2013. « Preserved Endothelium-Dependent Dilatation of the Coronary Microvasculature at the Early Phase of Diabetes Mellitus despite the Increased Oxidative Stress and Depressed Cardiac Mechanical Function Ex Vivo ». *Cardiovascular Diabetology* 12 (mars): 49. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-12-49>.
- Mozaffarian, Dariush, Rozenn N. Lemaitre, Lewis H. Kuller, Gregory L. Burke, Russell P. Tracy, David S. Siscovick, et Cardiovascular Health Study. 2003. « Cardiac Benefits of Fish Consumption May Depend on the Type of Fish Meal Consumed: The Cardiovascular Health Study ». *Circulation* 107 (10): 1372-77. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000055315.79177.16>.
- Mozaffarian, Dariush, et Jason H. Y. Wu. 2011. « Omega-3 Fatty Acids and Cardiovascular Disease: Effects on Risk Factors, Molecular Pathways, and Clinical Events ». *Journal*

- of the American College of Cardiology 58 (20): 2047-67. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.06.063>.
- Muller, Florian L., Yuhong Liu, et Holly Van Remmen. 2004. « Complex III Releases Superoxide to Both Sides of the Inner Mitochondrial Membrane ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (47): 49064-73. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407715200>.
- Murphy, Michael P. 2009. « How Mitochondria Produce Reactive Oxygen Species ». *Biochemical Journal* 417 (1): 1-13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>.
- Murray, Sally. 2006. « Is waist-to-hip ratio a better marker of cardiovascular risk than body mass index? ». *CMAJ: Canadian Medical Association Journal* 174 (3): 308. <https://doi.org/10.1503/cmaj.051561>.
- Nagoshi, Tomohisa, Michihiro Yoshimura, Giuseppe M. C. Rosano, Gary D. Lopaschuk, et Seibu Mochizuki. 2011. « Optimization of Cardiac Metabolism in Heart Failure ». *Current Pharmaceutical Design* 17 (35): 3846-53. <https://doi.org/10.2174/138161211798357773>.
- Nair, Anroop B., et Shery Jacob. 2016. « A simple practice guide for dose conversion between animals and human ». *Journal of Basic and Clinical Pharmacy* 7 (2): 27-31. <https://doi.org/10.4103/0976-0105.177703>.
- Nascimben, L., J. S. Ingwall, P. Pauletto, J. Friedrich, J. K. Gwathmey, V. Saks, A. C. Pessina, et P. D. Allen. 1996. « Creatine Kinase System in Failing and Nonfailing Human Myocardium ». *Circulation* 94 (8): 1894-1901. <https://doi.org/10.1161/01.cir.94.8.1894>.
- Nath, Sayantan, Sankar Kumar Ghosh, et Yashmin Choudhury. 2017. « A Murine Model of Type 2 Diabetes Mellitus Developed Using a Combination of High Fat Diet and Multiple Low Doses of Streptozotocin Treatment Mimics the Metabolic Characteristics of Type 2 Diabetes Mellitus in Humans ». *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 84 (avril): 20-30. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2016.10.007>.
- Navarro-Yepes, Juliana, Michaela Burns, Annadurai Anandhan, Oleh Khalimonchuk, Luz Maria del Razo, Betzabet Quintanilla-Vega, Aglaia Pappa, Mihalis I. Panayiotidis, et Rodrigo Franco. 2014. « Oxidative Stress, Redox Signaling, and Autophagy: Cell Death versus Survival ». *Antioxidants & Redox Signaling* 21 (1): 66-85. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.5837>.
- Neill, William A., Peter E. Jensen, Gerald B. Rich, et John D. Werschkul. 1969. « Effect of Decreased O₂ Supply to Tissue on the Lactate:Pyruvate Ratio in Blood ». *The Journal of Clinical Investigation* 48 (10): 1862-69. <https://doi.org/10.1172/JCI106152>.
- Nerbonne, Jeanne M., et Robert S. Kass. 2005. « Molecular Physiology of Cardiac Repolarization ». *Physiological Reviews* 85 (4): 1205-53. <https://doi.org/10.1152/physrev.00002.2005>.
- Newman, John C., et Eric Verdin. 2014. « Ketone Bodies as Signaling Metabolites ». *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 25 (1): 42-52. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2013.09.002>.
- Niki, Etsuo. 2008. « Lipid Peroxidation Products as Oxidative Stress Biomarkers ». *BioFactors (Oxford, England)* 34 (2): 171-80.
- Nisoli, Enzo, Emilio Clementi, Clara Paolucci, Valeria Cozzi, Cristina Tonello, Clara Sciorati, Renata Bracale, et al. 2003. « Mitochondrial Biogenesis in Mammals: The Role of Endogenous Nitric Oxide ». *Science (New York, N.Y.)* 299 (5608): 896-99. <https://doi.org/10.1126/science.1079368>.
- Norouzirad, Reza, Pedro González-Muniesa, et Asghar Ghasemi. 2017. « Hypoxia in Obesity and Diabetes: Potential Therapeutic Effects of Hyperoxia and Nitrate ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/5350267>.

- Nshimiyimana, Project, Long Liu, et Guocheng Du. 2019. « Engineering of L-Amino Acid Deaminases for the Production of α -Keto Acids from L-Amino Acids ». *Bioengineered* 10 (1): 43-51. <https://doi.org/10.1080/21655979.2019.1595990>.
- O'Connell, Timothy D., Robert C. Block, Shue P. Huang, et Gregory C. Shearer. 2017. « Ω 3-Polyunsaturated Fatty Acids for Heart Failure: Effects of Dose on Efficacy and Novel Signaling through Free Fatty Acid Receptor 4 ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 103: 74-92. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2016.12.003>.
- Oh, Da Young, Evelyn Walenta, Taro E. Akiyama, William S. Lagakos, Denise Lackey, Ariane R. Pessentheiner, Roman Sasik, et al. 2014. « A Gpr120-Selective Agonist Improves Insulin Resistance and Chronic Inflammation in Obese Mice ». *Nature Medicine* 20 (8): 942-47. <https://doi.org/10.1038/nm.3614>.
- Ohye, Hidemi, et Masahiro Sugawara. 2010. « Dual Oxidase, Hydrogen Peroxide and Thyroid Diseases ». *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)* 235 (4): 424-33. <https://doi.org/10.1258/ebm.2009.009241>.
- « OMS | À propos des maladies cardiovasculaires ». s. d. WHO. Consulté le 8 septembre 2019. http://www.who.int/entity/cardiovascular_diseases/about_cvd/fr/index.html.
- Oniki, Hideyuki, Koji Fujii, Yasuo Kansui, Kenichi Goto, et Mitsuo Iida. 2006. « Effects of Angiotensin II Receptor Antagonist on Impaired Endothelium-Dependent and Endothelium-Independent Relaxations in Type II Diabetic Rats ». *Journal of Hypertension* 24 (2): 331-38. <https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000200518.34980.cc>.
- Orr, Adam L., Casey L. Quinlan, Irina V. Perevoshchikova, et Martin D. Brand. 2012. « A Refined Analysis of Superoxide Production by Mitochondrial sn-Glycerol 3-Phosphate Dehydrogenase ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (51): 42921-35. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.397828>.
- Ortsäter, Henrik, Nina Grankvist, Swen Wolfram, Nicolas Kuehn, et Ake Sjöholm. 2012. « Diet Supplementation with Green Tea Extract Epigallocatechin Gallate Prevents Progression to Glucose Intolerance in Db/Db Mice ». *Nutrition & Metabolism* 9 (février): 11. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-9-11>.
- O'Shea, Karen M., Ramzi J. Khairallah, Genevieve C. Sparagna, Wenhong Xu, Peter A. Hecker, Isabelle Robillard-Frayne, Christine Des Rosiers, et al. 2009. « Dietary Omega-3 Fatty Acids Alter Cardiac Mitochondrial Phospholipid Composition and Delay Ca²⁺-Induced Permeability Transition ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 47 (6): 819-27. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.08.014>.
- Ott, Juliane, Christopher Hiesgen, et Konstantin Mayer. 2011. « Lipids in Critical Care Medicine ». *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids* 85 (5): 267-73. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2011.04.011>.
- Ouattara, Alexandre, Patrick Lecomte, Yannick Le Manach, Marc Landi, Sophie Jacqueminet, Igor Platonov, Nicolas Bonnet, Bruno Riou, et Pierre Coriat. 2005. « Poor Intraoperative Blood Glucose Control Is Associated with a Worsened Hospital Outcome after Cardiac Surgery in Diabetic Patients ». *Anesthesiology* 103 (4): 687-94. <https://doi.org/10.1097/00000542-200510000-00006>.
- Ouchi, Noriyuki, Koji Ohashi, Rei Shibata, et Toyooki Murohara. 2012. « Adipocytokines and Obesity-Linked Disorders ». *Nagoya Journal of Medical Science* 74 (1-2): 19-30.
- Owen, Joshua B., et D. Allan Butterfield. 2010. « Measurement of Oxidized/Reduced Glutathione Ratio ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 648: 269-77. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-756-3_18.
- Oyama, Jun-Ichi, Aya Shiraki, Toshiyuki Nishikido, Toyoki Maeda, Hiroshi Komoda, Takahiko Shimizu, Naoki Makino, et Koichi Node. 2017. « EGCG, a Green Tea Catechin, Attenuates the Progression of Heart Failure Induced by the Heart/Muscle-

- Specific Deletion of MnSOD in Mice ». *Journal of Cardiology* 69 (2): 417-27. <https://doi.org/10.1016/j.jjcc.2016.05.019>.
- Pabst, M. J., et R. B. Johnston. 1980. « Increased Production of Superoxide Anion by Macrophages Exposed in Vitro to Muramyl Dipeptide or Lipopolysaccharide ». *The Journal of Experimental Medicine* 151 (1): 101-14. <https://doi.org/10.1084/jem.151.1.101>.
- Paniker, N. V., S. K. Srivastava, et E. Beutler. 1970. « Glutathione Metabolism of the Red Cells. Effect of Glutathione Reductase Deficiency on the Stimulation of Hexose Monophosphate Shunt under Oxidative Stress ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 215 (3): 456-60. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(70\)90096-6](https://doi.org/10.1016/0304-4165(70)90096-6).
- Park, Hye Sun, Seung Hye Lee, Dongeun Park, Jun Sung Lee, Sung Ho Ryu, Won Jae Lee, Sue Goo Rhee, et Yun Soo Bae. 2004. « Sequential Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase, BPix, Rac1, and Nox1 in Growth Factor-Induced Production of H₂O₂ ». *Molecular and Cellular Biology* 24 (10): 4384-94. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.10.4384-4394.2004>.
- Park, Jin-Sun, Yu-Young Lee, Jisun Kim, Hyemyung Seo, et Hee-Sun Kim. 2016. « β -Lapachone Increases Phase II Antioxidant Enzyme Expression via NQO1-AMPK/PI3K-Nrf2/ARE Signaling in Rat Primary Astrocytes ». *Free Radical Biology & Medicine* 97: 168-78. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.05.024>.
- Pataki, Tunde, Istvan Bak, Peter Kovacs, Debasis Bagchi, Dipak K. Das, et Arpad Tosaki. 2002. « Grape Seed Proanthocyanidins Improved Cardiac Recovery during Reperfusion after Ischemia in Isolated Rat Hearts ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 75 (5): 894-99. <https://doi.org/10.1093/ajcn/75.5.894>.
- Peltier, S., W. J. Malaisse, L. Portois, L. Demaison, V. Novel-Chate, J. M. Chardigny, J. L. Sebedio, Y. A. Carpentier, et X. M. Lerverve. 2006. « Acute in Vivo Administration of a Fish Oil-Containing Emulsion Improves Post-Ischemic Cardiac Function in n-3-Depleted Rats ». *International Journal of Molecular Medicine* 18 (4): 741-49. <https://doi.org/10.3892/ijmm.18.4.741>.
- Perevoshchikova, Irina V., Casey L. Quinlan, Adam L. Orr, Akos A. Gerencser, et Martin D. Brand. 2013. « Sites of superoxide and hydrogen peroxide production during fatty acid oxidation in rat skeletal muscle mitochondria ». *Free radical biology & medicine* 0 (août): 298-309. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.04.006>.
- Perrino, Cinzia, Gabriele G. Schiattarella, Anna Sannino, Gianluigi Pironti, Maria Piera Petretta, Alessandro Cannavo, Giuseppe Gargiulo, et al. 2013. « Genetic Deletion of Uncoupling Protein 3 Exaggerates Apoptotic Cell Death in the Ischemic Heart Leading to Heart Failure ». *Journal of the American Heart Association* 2 (3): e000086. <https://doi.org/10.1161/JAHA.113.000086>.
- Petrosillo, Giuseppe, Mariagiuseppa Matera, Nicola Moro, Francesca M. Ruggiero, et Giuseppe Paradies. 2009. « Mitochondrial Complex I Dysfunction in Rat Heart with Aging: Critical Role of Reactive Oxygen Species and Cardiolipin ». *Free Radical Biology & Medicine* 46 (1): 88-94. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.09.031>.
- Peuhkurinen, K. J. 1984. « Regulation of the Tricarboxylic Acid Cycle Pool Size in Heart Muscle ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 16 (6): 487-95. [https://doi.org/10.1016/s0022-2828\(84\)80637-9](https://doi.org/10.1016/s0022-2828(84)80637-9).
- Pillai, Vinodkumar B., Sadhana Samant, Nagalingam R. Sundaresan, Hariharasundaram Raghuraman, Gene Kim, Michael Y. Bonner, Jack L. Arbiser, et al. 2015. « Honokiol Blocks and Reverses Cardiac Hypertrophy in Mice by Activating Mitochondrial Sirt3 ». *Nature Communications* 6 (avril): 6656. <https://doi.org/10.1038/ncomms7656>.
- Pinel, Alexandre, Elodie Pitois, Jean-Paul Rigaudiere, Chrystele Jouve, Sarah De Saint-Vincent, Brigitte Laillet, Christophe Montaurier, Alain Huertas, Beatrice Morio, et

- Frederic Capel. 2016. « EPA Prevents Fat Mass Expansion and Metabolic Disturbances in Mice Fed with a Western Diet ». *Journal of Lipid Research* 57 (8): 1382-97. <https://doi.org/10.1194/jlr.M065458>.
- Piquereau, Jerome, Fanny Caffin, Marta Novotova, Alexandre Prola, Anne Garnier, Philippe Mateo, Dominique Fortin, et al. 2012. « Down-regulation of OPA1 alters mouse mitochondrial morphology, PTP function, and cardiac adaptation to pressure overload ». *Cardiovascular Research* 94 (3): 408-17. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs117>.
- Plourde, Mélanie, et Stephen C. Cunnane. 2007. « Extremely Limited Synthesis of Long Chain Polyunsaturates in Adults: Implications for Their Dietary Essentiality and Use as Supplements ». *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism = Physiologie Appliquée, Nutrition Et Metabolisme* 32 (4): 619-34. <https://doi.org/10.1139/H07-034>.
- Pohl, Elena E., Anne Rupprecht, Gabriel Macher, et Karolina E. Hilse. 2019. « Important Trends in UCP3 Investigation ». *Frontiers in Physiology* 10 (avril). <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00470>.
- Porcelli, Anna Maria, Anna Ghelli, Claudia Zanna, Paolo Pinton, Rosario Rizzuto, et Michela Rugolo. 2005. « PH Difference across the Outer Mitochondrial Membrane Measured with a Green Fluorescent Protein Mutant ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 326 (4): 799-804. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.11.105>.
- Porporato, Paolo E., Valéry L. Payen, Bjorn Baselet, et Pierre Sonveaux. 2016. « Metabolic Changes Associated with Tumor Metastasis, Part 2: Mitochondria, Lipid and Amino Acid Metabolism ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 73 (7): 1349-63. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2100-2>.
- Potthast, Arne Björn, Theresa Heuer, Simone Johanna Warneke, et Anibh Martin Das. 2017. « Alterations of Sirtuins in Mitochondrial Cytochrome C-Oxidase Deficiency ». *PLoS One* 12 (10): e0186517. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186517>.
- Prauchner, Carlos André. 2017. « Oxidative Stress in Sepsis: Pathophysiological Implications Justifying Antioxidant Co-Therapy ». *Burns: Journal of the International Society for Burn Injuries* 43 (3): 471-85. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2016.09.023>.
- Pryor, W. A., et G. L. Squadrito. 1995. « The Chemistry of Peroxynitrite: A Product from the Reaction of Nitric Oxide with Superoxide ». *The American Journal of Physiology* 268 (5 Pt 1): L699-722. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1995.268.5.L699>.
- Pugsley, M. K., et R. Tabrizchi. 2000. « The Vascular System. An Overview of Structure and Function ». *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 44 (2): 333-40.
- Rahman, Motiur, Niraj K. Nirala, Alka Singh, Lihua Julie Zhu, Kaori Taguchi, Takeshi Bamba, Eiichiro Fukusaki, et al. 2014. « Drosophila Sirt2/Mammalian SIRT3 Deacetylates ATP Synthase β and Regulates Complex V Activity ». *The Journal of Cell Biology* 206 (2): 289-305. <https://doi.org/10.1083/jcb.201404118>.
- Ramana, Kota V., Sanjay Srivastava, et Sharad S. Singhal. 2017. « Lipid Peroxidation Products in Human Health and Disease 2016 ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017: 2163285. <https://doi.org/10.1155/2017/2163285>.
- Rardin, Matthew J., John C. Newman, Jason M. Held, Michael P. Cusack, Dylan J. Sorensen, Biao Li, Birgit Schilling, et al. 2013. « Label-Free Quantitative Proteomics of the Lysine Acetylome in Mitochondria Identifies Substrates of SIRT3 in Metabolic Pathways ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (16): 6601-6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1302961110>.
- Ratnam, D. Venkat, D. D. Ankola, V. Bhardwaj, D. K. Sahana, et M. N. V. Ravi Kumar. 2006. « Role of Antioxidants in Prophylaxis and Therapy: A Pharmaceutical Perspective ». *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 113 (3): 189-207. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.04.015>.

- Ray, Paul D., Bo-Wen Huang, et Yoshiaki Tsuji. 2012. « Reactive Oxygen Species (ROS) Homeostasis and Redox Regulation in Cellular Signaling ». *Cellular Signalling* 24 (5): 981-90. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>.
- Rees, Dinka, Elizabeth A. Miles, Tapati Banerjee, Solenne J. Wells, Catherine E. Roynette, Klaus Wj Wahle, et Philip C. Calder. 2006. « Dose-Related Effects of Eicosapentaenoic Acid on Innate Immune Function in Healthy Humans: A Comparison of Young and Older Men ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 83 (2): 331-42. <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.2.331>.
- Rhodes, Andrew, Laura E. Evans, Waleed Alhazzani, Mitchell M. Levy, Massimo Antonelli, Ricard Ferrer, Anand Kumar, et al. 2017. « Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016 ». *Intensive Care Medicine* 43 (3): 304-77. <https://doi.org/10.1007/s00134-017-4683-6>.
- Richter, C., V. Gogvadze, R. Laffranchi, R. Schlapbach, M. Schweizer, M. Suter, P. Walter, et M. Yaffee. 1995. « Oxidants in Mitochondria: From Physiology to Diseases ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1271 (1): 67-74. [https://doi.org/10.1016/0925-4439\(95\)00012-s](https://doi.org/10.1016/0925-4439(95)00012-s).
- Rimm, Eric B., Lawrence J. Appel, Stephanie E. Chiuve, Luc Djoussé, Mary B. Engler, Penny M. Kris-Etherton, Dariush Mozaffarian, David S. Siscovick, Alice H. Lichtenstein, et American Heart Association Nutrition Committee of the Council on Lifestyle and Cardiometabolic Health; Council on Epidemiology and Prevention; Council on Cardiovascular Disease in the Young; Council on Cardiovascular and Stroke Nursing; and Council on Clinical Cardiology. 2018. « Seafood Long-Chain n-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Cardiovascular Disease: A Science Advisory From the American Heart Association ». *Circulation* 138 (1): e35-47. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000574>.
- Riojas-Hernández, Adriana, Judith Bernal-Ramírez, David Rodríguez-Mier, Flor E. Morales-Marroquín, Elvia M. Domínguez-Barragán, Cuauhtémoc Borja-Villa, Irais Rivera-Álvarez, Gerardo García-Rivas, Julio Altamirano, et Noemí García. 2015. « Enhanced Oxidative Stress Sensitizes the Mitochondrial Permeability Transition Pore to Opening in Heart from Zucker Fa/Fa Rats with Type 2 Diabetes ». *Life Sciences* 141 (novembre): 32-43. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.09.018>.
- Rival, Thomas, Christel Cinq-Frais, Stein Silva-Sifontes, Jésus Garcia, Béatrice Riu, Robert Salvayre, Michèle Genestal, et Sylvie Caspar-Bauguil. 2013. « Alteration of Plasma Phospholipid Fatty Acid Profile in Patients with Septic Shock ». *Biochimie* 95 (11): 2177-81. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.08.006>.
- Rizos, Evangelos C., Evangelia E. Ntzani, Eftychia Bika, Michael S. Kostapanos, et Moses S. Elisaf. 2012. « Association between Omega-3 Fatty Acid Supplementation and Risk of Major Cardiovascular Disease Events: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *JAMA* 308 (10): 1024-33. <https://doi.org/10.1001/2012.jama.11374>.
- Robinson, Jennifer G., et Neil J. Stone. 2006. « Antiatherosclerotic and Antithrombotic Effects of Omega-3 Fatty Acids ». *The American Journal of Cardiology* 98 (4A): 39i-49i. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2005.12.026>.
- Rochweg, Bram, Waleed Alhazzani, Anees Sindi, Diane Heels-Ansdell, Lehana Thabane, Alison Fox-Robichaud, Lawrence Mbuagbaw, et al. 2014. « Fluid Resuscitation in Sepsis: A Systematic Review and Network Meta-Analysis ». *Annals of Internal Medicine* 161 (5): 347-55. <https://doi.org/10.7326/M14-0178>.
- Roger, Andrew J., Sergio A. Muñoz-Gómez, et Ryoma Kamikawa. 2017. « The Origin and Diversification of Mitochondria ». *Current Biology: CB* 27 (21): R1177-92. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.015>.

- Rolfe, D. F., et G. C. Brown. 1997. « Cellular Energy Utilization and Molecular Origin of Standard Metabolic Rate in Mammals ». *Physiological Reviews* 77 (3): 731-58. <https://doi.org/10.1152/physrev.1997.77.3.731>.
- Rudiger, Alain, et Mervyn Singer. 2013. « The Heart in Sepsis: From Basic Mechanisms to Clinical Management ». *Current Vascular Pharmacology* 11 (2): 187-95.
- Russell, Clark D, et Jürgen Schwarze. 2014. « The role of pro-resolution lipid mediators in infectious disease ». *Immunology* 141 (2): 166-73. <https://doi.org/10.1111/imm.12206>.
- Rütten, Simon, Gerald F. Schusser, Getu Abraham, et Wieland Schrödl. 2016. « Release kinetics of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 receptor antagonist in the equine whole blood ». *BMC Veterinary Research* 12 (juin). <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0742-4>.
- Saber, Hamidreza, Mohammad Yawar Yakoob, Peilin Shi, WT Longstreth, Rozenn N. Lemaitre, David Siscovick, Kathryn M. Rexrode, Walter C. Willett, et Dariush Mozaffarian. 2017. « Omega-3 fatty acids and incident ischemic stroke and its atherothrombotic and cardioembolic subtypes in 3 US cohorts ». *Stroke* 48 (10): 2678-85. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.117.018235>.
- Sagan, L. 1967. « On the Origin of Mitosing Cells ». *Journal of Theoretical Biology* 14 (3): 255-74. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(67\)90079-3](https://doi.org/10.1016/0022-5193(67)90079-3).
- Saito, Yasushi, Mitsuhiro Yokoyama, Hideki Origasa, Masunori Matsuzaki, Yuji Matsuzawa, Yuichi Ishikawa, Shinichi Oikawa, et al. 2008. « Effects of EPA on Coronary Artery Disease in Hypercholesterolemic Patients with Multiple Risk Factors: Sub-Analysis of Primary Prevention Cases from the Japan EPA Lipid Intervention Study (JELIS) ». *Atherosclerosis* 200 (1): 135-40. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2008.06.003>.
- Salimi, Ahmad, Mehryar Habibi Roudkenar, Leila Sadeghi, Alireza Mohseni, Enayatollah Seydi, Nahal Pirahmadi, et Jalal Pourahmad. 2015. « Ellagic Acid, a Polyphenolic Compound, Selectively Induces ROS-Mediated Apoptosis in Cancerous B-Lymphocytes of CLL Patients by Directly Targeting Mitochondria ». *Redox Biology* 6 (décembre): 461-71. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.021>.
- Sam, Chong-Hou, et Hsein-Kun Lu. 2009. « The role of hypochlorous acid as one of the reactive oxygen species in periodontal disease ». *Journal of Dental Sciences* 4 (2): 45-54. [https://doi.org/10.1016/S1991-7902\(09\)60008-8](https://doi.org/10.1016/S1991-7902(09)60008-8).
- Sansbury, Brian E., et Bradford G. Hill. 2014. « Antiobesogenic Role of Endothelial Nitric Oxide Synthase ». *Vitamins and Hormones* 96: 323-46. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800254-4.00013-1>.
- Santiano, Randy L., et Joseph S. Francisco. 2004. « Protonation Study of Peroxynitric Acid and Peroxynitrous Acid ». *The Journal of Chemical Physics* 121 (19): 9498-9509. <https://doi.org/10.1063/1.1784779>.
- Schägger, Hermann, et Kathy Pfeiffer. 2001. « The Ratio of Oxidative Phosphorylation Complexes I–V in Bovine Heart Mitochondria and the Composition of Respiratory Chain Supercomplexes ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (41): 37861-67.
- Schipper, David A., Ryan Palsma, Katherine M. Marsh, Connor O'Hare, Destiny S. Dicken, Scott Lick, Toshinobu Kazui, et al. 2017. « Chronic Myocardial Ischemia Leads to Loss of Maximal Oxygen Consumption and Complex I Dysfunction ». *The Annals of Thoracic Surgery* 104 (4): 1298-1304. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2017.03.004>.
- Schmitz, Gerd, et Josef Ecker. 2008. « The Opposing Effects of N-3 and n-6 Fatty Acids ». *Progress in Lipid Research* 47 (2): 147-55. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2007.12.004>.

- Schon, Eric A., Salvatore DiMauro, et Michio Hirano. 2012. « Human Mitochondrial DNA: Roles of Inherited and Somatic Mutations ». *Nature Reviews. Genetics* 13 (12): 878-90. <https://doi.org/10.1038/nrg3275>.
- Schönekeess, B. O. 1997. « Competition between Lactate and Fatty Acids as Sources of ATP in the Isolated Working Rat Heart ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 29 (10): 2725-33. <https://doi.org/10.1006/jmcc.1997.0504>.
- Schönfeld, Peter, Mariusz R. Wieckowski, Magdalena Lebedzińska, et Lech Wojtczak. 2010. « Mitochondrial Fatty Acid Oxidation and Oxidative Stress: Lack of Reverse Electron Transfer-Associated Production of Reactive Oxygen Species ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1797 (6-7): 929-38. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.01.010>.
- Schuchardt, Mirjam, Jaqueline Herrmann, Markus Tolle, et Markus van der Giet. 2017. « Xanthine Oxidase and Its Role as Target in Cardiovascular Disease: Cardiovascular Protection by Enzyme Inhibition? ». *Current Pharmaceutical Design* 23 (23): 3391-3404. <https://doi.org/10.2174/1381612823666170417130115>.
- Schultz, B. E., et S. I. Chan. 2001. « Structures and Proton-Pumping Strategies of Mitochondrial Respiratory Enzymes ». *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 30: 23-65. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.30.1.23>.
- Sergiel, J -P, L Martine, D Raederstorff, A Grynberg, et L Demaison. 1998. « Individual effects of dietary EPA and DHA on the functioning of the isolated working rat heart ». *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 76 (7-8): 728-36. <https://doi.org/10.1139/y98-079>.
- Serini, Simona, Elena Fasano, Elisabetta Piccioni, Achille R. M. Cittadini, et Gabriella Calviello. 2011. « Dietary N-3 Polyunsaturated Fatty Acids and the Paradox of Their Health Benefits and Potential Harmful Effects ». *Chemical Research in Toxicology* 24 (12): 2093-2105. <https://doi.org/10.1021/tx200314p>.
- Sies, H., W. Stahl, et A. R. Sundquist. 1992. « Antioxidant Functions of Vitamins. Vitamins E and C, Beta-Carotene, and Other Carotenoids ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 669 (septembre): 7-20. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1992.tb17085.x>.
- Silverstein, Todd P. 2014. « An Exploration of How the Thermodynamic Efficiency of Bioenergetic Membrane Systems Varies with C-Subunit Stoichiometry of F₁F_o ATP Synthases ». *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 46 (3): 229-41. <https://doi.org/10.1007/s10863-014-9547-y>.
- Simon, Jillian N., Drew Duglan, Barbara Casadei, et Ricardo Carnicer. 2014. « Nitric Oxide Synthase Regulation of Cardiac Excitation-Contraction Coupling in Health and Disease ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 73 (août): 80-91. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.03.004>.
- Simopoulos, Artemis P. 2016. « An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity ». *Nutrients* 8 (3): 128. <https://doi.org/10.3390/nu8030128>.
- Singh, Chandra K., Gagan Chhabra, Mary Ann Ndiaye, Liz Mariely Garcia-Peterson, Nicholas J. Mack, et Nihal Ahmad. 2018. « The Role of Sirtuins in Antioxidant and Redox Signaling ». *Antioxidants & Redox Signaling* 28 (8): 643-61. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7290>.
- Siscovick, David S., Thomas A. Barringer, Amanda M. Fretts, Jason H. Y. Wu, Alice H. Lichtenstein, Rebecca B. Costello, Penny M. Kris-Etherton, et al. 2017. « Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid (Fish Oil) Supplementation and the Prevention of Clinical Cardiovascular Disease: A Science Advisory From the American Heart Association ». *Circulation* 135 (15): e867-84. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000482>.
- Skrzydłowska, E., J. Ostrowska, R. Farbiszewski, et K. Michalak. 2002. « Protective Effect of Green Tea against Lipid Peroxidation in the Rat Liver, Blood Serum and the Brain ».

- Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology* 9 (3): 232-38. <https://doi.org/10.1078/0944-7113-00119>.
- Skyler, J. S. 2013. « Primary and Secondary Prevention of Type 1 Diabetes ». *Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association* 30 (2): 161-69. <https://doi.org/10.1111/dme.12100>.
- Slauch, James M. 2011. « How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria? Still an open question ». *Molecular microbiology* 80 (3): 580-83. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07612.x>.
- Smeding, Lonneke, Frans B. Plötz, A. B. Johan Groeneveld, et Martin C. J. Kneyber. 2012. « Structural Changes of the Heart during Severe Sepsis or Septic Shock ». *Shock (Augusta, Ga.)* 37 (5): 449-56. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e31824c3238>.
- Sokolova, Niina, Shi Pan, Sarah Provazza, Gisela Beutner, Marko Vendelin, Rikke Birkedal, et Shey-Shing Sheu. 2013. « ADP Protects Cardiac Mitochondria under Severe Oxidative Stress ». *PloS One* 8 (12): e83214. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083214>.
- Sol, Eri Maria, Sebastian A. Wagner, Brian T. Weinert, Amit Kumar, Hyun-Seok Kim, Chu-Xia Deng, et Chunaram Choudhary. 2012. « Proteomic Investigations of Lysine Acetylation Identify Diverse Substrates of Mitochondrial Deacetylase Sirt3 ». *PLOS ONE* 7 (12): e50545. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050545>.
- Soumura, Mariko, Shinji Kume, Keiji Isshiki, Naoko Takeda, Shin-ichi Araki, Yuki Tanaka, Toshiro Sugimoto, et al. 2010. « Oleate and Eicosapentaenoic Acid Attenuate Palmitate-Induced Inflammation and Apoptosis in Renal Proximal Tubular Cell ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 402 (2): 265-71. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.10.012>.
- Sprecher, H. 2000. « Metabolism of Highly Unsaturated N-3 and n-6 Fatty Acids ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1486 (2-3): 219-31. [https://doi.org/10.1016/s1388-1981\(00\)00077-9](https://doi.org/10.1016/s1388-1981(00)00077-9).
- Stanley, Brian A., Vidhya Sivakumaran, Sa Shi, Iain McDonald, David Lloyd, Walter H. Watson, Miguel A. Aon, et Nazareno Paolocci. 2011. « Thioredoxin Reductase-2 Is Essential for Keeping Low Levels of H₂O₂ Emission from Isolated Heart Mitochondria ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (38): 33669-77. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.284612>.
- Stanley, William C., Fabio A. Recchia, et Gary D. Lopaschuk. 2005. « Myocardial Substrate Metabolism in the Normal and Failing Heart ». *Physiological Reviews* 85 (3): 1093-1129. <https://doi.org/10.1152/physrev.00006.2004>.
- Stepanova, Anna, Yevgeniya Shurubor, Federica Valsecchi, Giovanni Manfredi, et Alexander Galkin. 2016. « Differential Susceptibility of Mitochondrial Complex II to Inhibition by Oxaloacetate in Brain and Heart ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1857 (9): 1561-68. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.06.002>.
- Stirban, Alin, Simona Nandrea, Christian Götting, Ronald Tamler, Alexandra Pop, Monica Negrean, Thomas Gawlowski, Bernd Stratmann, et Diethelm Tschoepe. 2010. « Effects of N-3 Fatty Acids on Macro- and Microvascular Function in Subjects with Type 2 Diabetes Mellitus ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 91 (3): 808-13. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.28374>.
- Stockbridge, N. 1988. « Etiology of the supernormal period. » *Biophysical Journal* 54 (5): 777-80.
- Stone, N. J. 2000. « The Gruppo Italiano per Lo Studio Della Sopravvivenza Nell'Infarto Miocardio (GISSI)-Prevenzione Trial on Fish Oil and Vitamin E Supplementation in Myocardial Infarction Survivors ». *Current Cardiology Reports* 2 (5): 445-51.

- Sugamura, Koichi, et John F. Keane. 2011. « Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Disease ». *Free Radical Biology & Medicine* 51 (5): 978-92. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.004>.
- Sugden, Mary C., et Mark J. Holness. 2003. « Recent Advances in Mechanisms Regulating Glucose Oxidation at the Level of the Pyruvate Dehydrogenase Complex by PDKs ». *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 284 (5): E855-862. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00526.2002>.
- Sun, Xiao-Qing, Shuo Chen, Liang-Fang Wang, et Zhi-Wu Chen. 2018. « Total Flavones of Rhododendron Simsii Planch Flower Protect Isolated Rat Heart from Ischaemia-Reperfusion Injury and Its Mechanism of UTR-RhoA-ROCK Pathway Inhibition ». *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 70 (12): 1713-22. <https://doi.org/10.1111/jphp.13016>.
- Swietach, Pawel, Patrizia Camelliti, Alzbeta Hulikova, Peter Kohl, et Richard D. Vaughan-Jones. 2010. « Spatial Regulation of Intracellular PH in Multicellular Strands of Neonatal Rat Cardiomyocytes ». *Cardiovascular Research* 85 (4): 729-38. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp343>.
- Szanto, Ildiko, Marc Pusztaszeri, et Maria Mavromati. 2019. « H₂O₂ Metabolism in Normal Thyroid Cells and in Thyroid Tumorigenesis: Focus on NADPH Oxidases ». *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 8 (5). <https://doi.org/10.3390/antiox8050126>.
- Tenore, Gian Carlo, Pietro Campiglia, Daniela Giannetti, et Ettore Novellino. 2015. « Simulated Gastrointestinal Digestion, Intestinal Permeation and Plasma Protein Interaction of White, Green, and Black Tea Polyphenols ». *Food Chemistry* 169 (février): 320-26. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.006>.
- Terada, H. 1990. « Uncouplers of Oxidative Phosphorylation ». *Environmental Health Perspectives* 87 (juillet): 213-18. <https://doi.org/10.1289/ehp.9087213>.
- Testai, Lara, Alma Martelli, Mario Cristofaro, Maria C. Breschi, et Vincenzo Calderone. 2013. « Cardioprotective Effects of Different Flavonoids against Myocardial Ischaemia/Reperfusion Injury in Langendorff-Perfused Rat Hearts ». *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 65 (5): 750-56. <https://doi.org/10.1111/jphp.12032>.
- Tham, Yow Keat, Bianca C. Bernardo, Jenny Y. Y. Ooi, Kate L. Weeks, et Julie R. McMullen. 2015. « Pathophysiology of Cardiac Hypertrophy and Heart Failure: Signaling Pathways and Novel Therapeutic Targets ». *Archives of Toxicology* 89 (9): 1401-38. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1477-x>.
- « The Discovery of Adenosine Triphosphate and the Establishment of Its Structure ». 1991. *Journal of the History of Biology* 24 (1): 145-54. <https://doi.org/10.1007/BF00130477>.
- « The Negative Health Effects of Chlorine - Joseph G. Hattersley ». s. d. Consulté le 20 septembre 2019. <http://orthomolecular.org/library/jom/2000/articles/2000-v15n02-p089.shtml>.
- Theurey, Pierre, Emily Tubbs, Guillaume Vial, Julien Jacquemetton, Nadia Bendridi, Marie-Agnès Chauvin, Muhammad Rizwan Alam, Muriel Le Romancer, Hubert Vidal, et Jennifer Rieusset. 2016. « Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membranes Allow Adaptation of Mitochondrial Metabolism to Glucose Availability in the Liver ». *Journal of Molecular Cell Biology* 8 (2): 129-43. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjw004>.
- Thomas, Celeste C., et Louis H. Philipson. 2015. « Update on Diabetes Classification ». *The Medical Clinics of North America* 99 (1): 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2014.08.015>.
- Thum, Thomas, Daniela Fraccarollo, Maximilian Schultheiss, Sabrina Froese, Paolo Galuppo, Julian D. Widder, Dimitrios Tsikas, Georg Ertl, et Johann Bauersachs. 2007. « Endothelial Nitric Oxide Synthase Uncoupling Impairs Endothelial Progenitor Cell

- Mobilization and Function in Diabetes ». *Diabetes* 56 (3): 666-74. <https://doi.org/10.2337/db06-0699>.
- Treble, Timothy M., Stephen A. Wootton, Elizabeth A. Miles, Mark Mullee, Nigel K. Arden, Anne B. Ballinger, Mike A. Stroud, Graham C. Burdge, et Philip C. Calder. 2003. « Prostaglandin E2 Production and T Cell Function after Fish-Oil Supplementation: Response to Antioxidant Cosupplementation ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 78 (3): 376-82. <https://doi.org/10.1093/ajcn/78.3.376>.
- Trikalinos, Thomas A., Jounghee Lee, Denish Moorthy, Winifred W. Yu, Joseph Lau, Alice H. Lichtenstein, et Mei Chung. 2012. *Effects of Eicosapentanoic Acid and Docosahexanoic Acid on Mortality Across Diverse Settings: Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Trials and Prospective Cohorts: Nutritional Research Series, Vol. 4*. AHRQ Technical Reviews. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK91413/>.
- Trumpower, B. L. 1990. « The Protonmotive Q Cycle. Energy Transduction by Coupling of Proton Translocation to Electron Transfer by the Cytochrome Bc1 Complex ». *The Journal of Biological Chemistry* 265 (20): 11409-12.
- Tsukihara, T., H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, et S. Yoshikawa. 1996. « The Whole Structure of the 13-Subunit Oxidized Cytochrome c Oxidase at 2.8 Å ». *Science (New York, N.Y.)* 272 (5265): 1136-44. <https://doi.org/10.1126/science.272.5265.1136>.
- Uil, Corstian A. den, E. Klijjn, W. K. Lagrand, J. J. Brughts, C. Ince, P. E. Spronk, et M. L. Simoons. 2008. « The Microcirculation in Health and Critical Disease ». *Progress in Cardiovascular Diseases* 51 (2): 161-70. <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2008.07.002>.
- Valko, Marian, Dieter Leibfritz, Jan Moncol, Mark T. D. Cronin, Milan Mazur, et Joshua Telser. 2007. « Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39 (1): 44-84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>.
- Van den Berghe, Greet. 2004. « How Does Blood Glucose Control with Insulin Save Lives in Intensive Care? ». *The Journal of Clinical Investigation* 114 (9): 1187-95. <https://doi.org/10.1172/JCI23506>.
- Vanasco, Virginia, Natalia D. Magnani, María Cecilia Cimolai, Laura B. Valdez, Pablo Evelson, Alberto Boveris, et Silvia Alvarez. 2012. « Endotoxemia Impairs Heart Mitochondrial Function by Decreasing Electron Transfer, ATP Synthesis and ATP Content without Affecting Membrane Potential ». *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 44 (2): 243-52. <https://doi.org/10.1007/s10863-012-9426-3>.
- Vanasco, Virginia, Trinidad Saez, Natalia D. Magnani, Leonardo Pereyra, Timoteo Marchini, Alejandra Corach, María Inés Vaccaro, Daniel Corach, Pablo Evelson, et Silvia Alvarez. 2014. « Cardiac Mitochondrial Biogenesis in Endotoxemia Is Not Accompanied by Mitochondrial Function Recovery ». *Free Radical Biology & Medicine* 77 (décembre): 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.08.009>.
- Vance, J. E. 1990. « Phospholipid Synthesis in a Membrane Fraction Associated with Mitochondria ». *The Journal of Biological Chemistry* 265 (13): 7248-56.
- Vance. 1991. « Newly Made Phosphatidylserine and Phosphatidylethanolamine Are Preferentially Translocated between Rat Liver Mitochondria and Endoplasmic Reticulum ». *The Journal of Biological Chemistry* 266 (1): 89-97.
- Vásquez-Vivar, Jeannette, B. Kalyanaraman, et Mary Claire Kennedy. 2000. « Mitochondrial Aconitase Is a Source of Hydroxyl Radical AN ELECTRON SPIN RESONANCE INVESTIGATION ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (19): 14064-69. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.19.14064>.

- Velayutham, Pon, Anandh Babu, et Dongmin Liu. 2008. « Green Tea Catechins and Cardiovascular Health: An Update ». *Current medicinal chemistry* 15 (18): 1840-50.
- Ventura-Clapier, R. 1998. « Créatine kinases et transferts d'énergie dans le myocyte cardiaque. » *M/S. Médecine sciences [revue papier, ISSN : 0767-0974], 1998, Vol. 14, N° 10; p.1017-24.* <https://doi.org/10.4267/10608/906>.
- Verma, Richa, Zhishan Huang, Clifford S. Deutschman, et Richard J. Levy. 2009. « Caffeine Restores Myocardial Cytochrome Oxidase Activity and Improves Cardiac Function during Sepsis ». *Critical Care Medicine* 37 (4): 1397-1402. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31819cecd6>.
- Vernaglione, Luigi, Claudio Cristofano, et Stefano Chimienti. 2008. « Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Proxies of Cardiovascular Disease in Hemodialysis: A Prospective Cohort Study ». *Journal of Nephrology* 21 (1): 99-105.
- Vial, G., H. Dubouchaud, K. Couturier, M. Lanson, X. Leverve, et L. Demaison. 2008. « Na⁺/H⁺ Exchange Inhibition with Cariporide Prevents Alterations of Coronary Endothelial Function in Streptozotocin-Induced Diabetes. » *Molecular and Cellular Biochemistry* 310 (1-2): 93-102. <https://doi.org/10.1007/s11010-007-9669-1>.
- Vinson, Joe A., Karolyn Teufel, et Nancy Wu. 2004. « Green and Black Teas Inhibit Atherosclerosis by Lipid, Antioxidant, and Fibrinolytic Mechanisms ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (11): 3661-65. <https://doi.org/10.1021/jf0352551>.
- Vusse, G. J. van der, M. van Bilsen, et J. F. Glatz. 2000. « Cardiac Fatty Acid Uptake and Transport in Health and Disease ». *Cardiovascular Research* 45 (2): 279-93. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(99\)00263-1](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(99)00263-1).
- Wada, Masayuki, Cynthia J. DeLong, Yu H. Hong, Caroline J. Rieke, Inseok Song, Ranjinder S. Sidhu, Chong Yuan, et al. 2007. « Enzymes and Receptors of Prostaglandin Pathways with Arachidonic Acid-Derived versus Eicosapentaenoic Acid-Derived Substrates and Products ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (31): 22254-66. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703169200>.
- Waguri, Toshiharu, Toshinao Goda, Nobuhiko Kasezawa, et Kimiko Yamakawa-Kobayashi. 2013. « The Combined Effects of Genetic Variations in the GPR120 Gene and Dietary Fat Intake on Obesity Risk ». *Biomedical Research (Tokyo, Japan)* 34 (2): 69-74.
- Wanders, Ronald J. A., Hans R. Waterham, et Sacha Ferdinandusse. 2016. « Metabolic Interplay between Peroxisomes and Other Subcellular Organelles Including Mitochondria and the Endoplasmic Reticulum ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 3 (janvier). <https://doi.org/10.3389/fcell.2015.00083>.
- Wang, Chenchen, William S. Harris, Mei Chung, Alice H. Lichtenstein, Ethan M. Balk, Bruce Kupelnick, Harmon S. Jordan, et Joseph Lau. 2006. « N-3 Fatty Acids from Fish or Fish-Oil Supplements, but Not Alpha-Linolenic Acid, Benefit Cardiovascular Disease Outcomes in Primary- and Secondary-Prevention Studies: A Systematic Review ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 84 (1): 5-17. <https://doi.org/10.1093/ajcn/84.1.5>.
- Wang, Fei, Margaret Nguyen, F. Xiao-Feng Qin, et Qiang Tong. 2007. « SIRT2 Deacetylates FOXO3a in Response to Oxidative Stress and Caloric Restriction ». *Aging Cell* 6 (4): 505-14. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00304.x>.
- Wang, Tao, James Malone, Haoda Fu, Cory Heilmann, Yongming Qu, et William J. Huster. 2016. « Crossover Design and Its Application in Late-Phase Diabetes Studies ». *Journal of Diabetes* 8 (5): 610-18. <https://doi.org/10.1111/1753-0407.12412>.
- Wang, Thomas J., Martin G. Larson, Ramachandran S. Vasan, Susan Cheng, Eugene P. Rhee, Elizabeth McCabe, Gregory D. Lewis, et al. 2011. « Metabolite Profiles and the Risk of Developing Diabetes ». *Nature Medicine* 17 (4): 448-53. <https://doi.org/10.1038/nm.2307>.

- Wang, Xiaoqin, Zhengyu Zhang, Gang Wu, Changlong Nan, Wen Shen, Yimin Hua, et Xupei Huang. 2016. « Green Tea Extract Catechin Improves Internal Cardiac Muscle Relaxation in RCM Mice ». *Journal of Biomedical Science* 23 (1): 51. <https://doi.org/10.1186/s12929-016-0264-1>.
- Warbrick, Ian, et Simon W. Rabkin. 2019. « Hypoxia-Inducible Factor 1-Alpha (HIF-1 α) as a Factor Mediating the Relationship between Obesity and Heart Failure with Preserved Ejection Fraction ». *Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity* 20 (5): 701-12. <https://doi.org/10.1111/obr.12828>.
- Watt, Ian N., Martin G. Montgomery, Michael J. Runswick, Andrew G. W. Leslie, et John E. Walker. 2010. « Bioenergetic Cost of Making an Adenosine Triphosphate Molecule in Animal Mitochondria ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (39): 16823-27. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011099107>.
- Watts, J. A., J. A. Kline, L. R. Thornton, R. M. Grattan, et S. S. Brar. 2004. « Metabolic Dysfunction and Depletion of Mitochondria in Hearts of Septic Rats ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 36 (1): 141-50. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2003.10.015>.
- Weiss, S. J., G. W. King, et A. F. LoBuglio. 1977. « Evidence for Hydroxyl Radical Generation by Human Monocytes ». *The Journal of Clinical Investigation* 60 (2): 370-73. <https://doi.org/10.1172/JCI108785>.
- Wentz, Anna E., D. André d'Avignon, Mary L. Weber, David G. Cotter, Jason M. Doherty, Robnet Kerns, Rakesh Nagarajan, Naveen Reddy, Nandakumar Sambandam, et Peter A. Crawford. 2010. « Adaptation of Myocardial Substrate Metabolism to a Ketogenic Nutrient Environment ». *The Journal of Biological Chemistry* 285 (32): 24447-56. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.100651>.
- Whelton, Seamus Paul, Jiang He, Paul Kieran Whelton, et Paul Muntner. 2004. « Meta-Analysis of Observational Studies on Fish Intake and Coronary Heart Disease ». *The American Journal of Cardiology* 93 (9): 1119-23. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2004.01.038>.
- White, A. A., K. M. Crawford, C. S. Patt, et P. J. Lad. 1976. « Activation of Soluble Guanylate Cyclase from Rat Lung by Incubation or by Hydrogen Peroxide ». *The Journal of Biological Chemistry* 251 (23): 7304-12.
- Wiesner, R. J., J. C. Rüegg, et I. Morano. 1992. « Counting Target Molecules by Exponential Polymerase Chain Reaction: Copy Number of Mitochondrial DNA in Rat Tissues ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 183 (2): 553-59. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(92\)90517-o](https://doi.org/10.1016/0006-291x(92)90517-o).
- Wiklund, Petri K., Satu Pekkala, Reija Autio, Eveliina Munukka, Leiting Xu, Juha Saltevo, ShuMei Cheng, Urho M. Kujala, Markku Alen, et Sulin Cheng. 2014. « Serum metabolic profiles in overweight and obese women with and without metabolic syndrome ». *Diabetology & Metabolic Syndrome* 6 (1): 40. <https://doi.org/10.1186/1758-5996-6-40>.
- Wisneski, J. A., E. W. Gertz, R. A. Neese, L. D. Gruenke, et J. C. Craig. 1985. « Dual Carbon-Labeled Isotope Experiments Using D-[6-¹⁴C] Glucose and L-[1,2,3-¹³C₃] Lactate: A New Approach for Investigating Human Myocardial Metabolism during Ischemia ». *Journal of the American College of Cardiology* 5 (5): 1138-46. [https://doi.org/10.1016/s0735-1097\(85\)80016-4](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(85)80016-4).
- Wolfram, Swen, Daniel Raederstorff, Mareike Preller, Ying Wang, Sandra R. Teixeira, Christoph Riegger, et Peter Weber. 2006. « Epigallocatechin Gallate Supplementation Alleviates Diabetes in Rodents ». *The Journal of Nutrition* 136 (10): 2512-18. <https://doi.org/10.1093/jn/136.10.2512>.

- Wong, C.-Y., K.-H. Yiu, S.-W. Li, S. Lee, S. Tam, C.-P. Lau, et H.-F. Tse. 2010. « Fish-Oil Supplement Has Neutral Effects on Vascular and Metabolic Function but Improves Renal Function in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus ». *Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association* 27 (1): 54-60. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2009.02869.x>.
- Woodman, Richard J., Trevor A. Mori, Valerie Burke, Ian B. Puddey, Anne Barden, Gerald F. Watts, et Lawrence J. Beilin. 2003. « Effects of Purified Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid on Platelet, Fibrinolytic and Vascular Function in Hypertensive Type 2 Diabetic Patients ». *Atherosclerosis* 166 (1): 85-93. [https://doi.org/10.1016/s0021-9150\(02\)00307-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9150(02)00307-6).
- Woodman, Richard J., Trevor A. Mori, Valerie Burke, Ian B. Puddey, Gerald F. Watts, et Lawrence J. Beilin. 2002. « Effects of Purified Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acids on Glycemic Control, Blood Pressure, and Serum Lipids in Type 2 Diabetic Patients with Treated Hypertension ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 76 (5): 1007-15. <https://doi.org/10.1093/ajcn/76.5.1007>.
- Wu, Hui, Ming Ye, Di Liu, Jian Yang, Jia-Wang Ding, Jing Zhang, Xin-An Wang, Wu-Song Dong, Zhi-Xing Fan, et Jun Yang. 2019. « UCP2 Protect the Heart from Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury via Induction of Mitochondrial Autophagy ». *Journal of Cellular Biochemistry* 120 (9): 15455-66. <https://doi.org/10.1002/jcb.28812>.
- Würtz, Peter, Pasi Soinenen, Antti J. Kangas, Tapani Rönnemaa, Terho Lehtimäki, Mika Kähönen, Jorma S. Viikari, Olli T. Raitakari, et Mika Ala-Korpela. 2013. « Branched-Chain and Aromatic Amino Acids Are Predictors of Insulin Resistance in Young Adults ». *Diabetes Care* 36 (3): 648-55. <https://doi.org/10.2337/dc12-0895>.
- Xu, Jiqu, Congcong Ma, Ling Han, Hui Gao, Qi Zhou, Mei Yang, Chang Chen, Qianchun Deng, Qingde Huang, et Fenghong Huang. 2014. « Optimized Rapeseed Oils Rich in Endogenous Micronutrients Ameliorate Risk Factors of Atherosclerosis in High Fat Diet Fed Rats ». *Lipids in Health and Disease* 13 (octobre): 166. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-13-166>.
- Xu, Jiqu, Xiaoqi Zhou, Qianchun Deng, Qingde Huang, Jin'e Yang, et Fenghong Huang. 2011. « Rapeseed Oil Fortified with Micronutrients Reduces Atherosclerosis Risk Factors in Rats Fed a High-Fat Diet ». *Lipids in Health and Disease* 10 (juin): 96. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-10-96>.
- Xu, Jiqu, Xiaoqi Zhou, Hui Gao, Chang Chen, Qianchun Deng, Qingde Huang, Jing Ma, Zhengyang Wan, Jin'e Yang, et Fenghong Huang. 2013. « Micronutrients-Fortified Rapeseed Oil Improves Hepatic Lipid Accumulation and Oxidative Stress in Rats Fed a High-Fat Diet ». *Lipids in Health and Disease* 12 (mars): 28. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-12-28>.
- Xuan, Y. T., X. L. Tang, Y. Qiu, S. Banerjee, H. Takano, H. Han, et R. Bolli. 2000. « Biphasic Response of Cardiac NO Synthase Isoforms to Ischemic Preconditioning in Conscious Rabbits ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 279 (5): H2360-2371. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2000.279.5.H2360>.
- Yamada, Takumi, Hugh Thomas McElderry, Vance J. Plumb, Harish Doppalapudi, Andrew E. Epstein, et George Neal Kay. 2008. « Duplicated Coronary Sinus with a Connecting Branch ». *Europace: European Pacing, Arrhythmias, and Cardiac Electrophysiology: Journal of the Working Groups on Cardiac Pacing, Arrhythmias, and Cardiac Cellular Electrophysiology of the European Society of Cardiology* 10 (7): 880-81. <https://doi.org/10.1093/europace/eun088>.
- Yamakura, Fumiyuki, et Hiroaki Kawasaki. 2010. « Post-Translational Modifications of Superoxide Dismutase ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1804 (2): 318-25. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.10.010>.

- Yang, Hong, Yingyi Zhang, et Ulrich Pöschl. 2010. « Quantification of Nitrotyrosine in Nitrated Proteins ». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397 (2): 879-86. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3557-3>.
- Ye, Jianping. 2013. « Mechanisms of insulin resistance in obesity ». *Frontiers of medicine* 7 (1): 14-24. <https://doi.org/10.1007/s11684-013-0262-6>.
- Yu, Tianzheng, Bong Sook Jhun, et Yisang Yoon. 2011. « High-Glucose Stimulation Increases Reactive Oxygen Species Production through the Calcium and Mitogen-Activated Protein Kinase-Mediated Activation of Mitochondrial Fission ». *Antioxidants & Redox Signaling* 14 (3): 425-37. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3284>.
- Yu, Tianzheng, James L. Robotham, et Yisang Yoon. 2006. « Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (8): 2653-58. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511154103>.
- Yu, Yang, Yuan Deng, Bang-Min Lu, Yong-Xi Liu, Jian Li, et Jin-Ku Bao. 2014. « Green Tea Catechins: A Fresh Flavor to Anticancer Therapy ». *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death* 19 (1): 1-18. <https://doi.org/10.1007/s10495-013-0908-5>.
- Zambrano, Lysien I., Roberto B. Pontes, Michelle L. Garcia, Erika E. Nishi, Fernando N. Nogueira, Elisa M. S. Higa, Juliana G. Cespedes, Cassia T. Bergamaschi, et Ruy R. Campos. 2019. « Pattern of Sympathetic Vasomotor Activity in a Model of Hypertension Induced by Nitric Oxide Synthase Blockade ». *Physiological Reports* 7 (14): e14183. <https://doi.org/10.14814/phy2.14183>.
- Zeeshan, Hafiz Maher Ali, Geum Hwa Lee, Hyung-Ryong Kim, et Han-Jung Chae. 2016. « Endoplasmic Reticulum Stress and Associated ROS ». *International Journal of Molecular Sciences* 17 (3): 327. <https://doi.org/10.3390/ijms17030327>.
- Zehr, Kayla R., et Mary K. Walker. 2018. « Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Improve Endothelial Function in Humans at Risk for Atherosclerosis: A Review ». *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 134: 131-40. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2017.07.005>.
- Zelko, Igor N., Thomas J. Mariani, et Rodney J. Folz. 2002. « Superoxide Dismutase Multigene Family: A Comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) Gene Structures, Evolution, and Expression ». *Free Radical Biology & Medicine* 33 (3): 337-49. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)00905-x](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)00905-x).
- Zern, Tosca L., et Maria Luz Fernandez. 2005. « Cardioprotective Effects of Dietary Polyphenols ». *The Journal of Nutrition* 135 (10): 2291-94. <https://doi.org/10.1093/jn/135.10.2291>.
- Zervou, Sevasti, Hannah J. Whittington, Angela J. Russell, et Craig A. Lygate. 2016. « Augmentation of Creatine in the Heart ». *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 16 (1): 19-28.
- Zhang, Chi, Ying-Yi Qin, Xin Wei, Fei-Fei Yu, Yu-Hao Zhou, et Jia He. 2015. « Tea Consumption and Risk of Cardiovascular Outcomes and Total Mortality: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Observational Studies ». *European Journal of Epidemiology* 30 (2): 103-13. <https://doi.org/10.1007/s10654-014-9960-x>.
- Zhang, Jianhua, et D. Allan Butterfield. 2017. « Oxidative Stress and Neurodegeneration ». *Brain Research Bulletin* 133: 1-3. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.04.018>.
- Zhang, Junmin, Xinming Li, Xiao Han, Ruijuan Liu, et Jianguo Fang. 2017. « Targeting the Thioredoxin System for Cancer Therapy ». *Trends in Pharmacological Sciences* 38 (9): 794-808. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.06.001>.
- Zhang, Yu, Yanwen Wang, Joseph Yanni, Mohammed Anwar Qureshi, Sunil Jit R. J. Logantha, Sarah Kassab, Mark R. Boyett, et al. 2019. « Electrical Conduction System Remodeling

- in Streptozotocin-Induced Diabetes Mellitus Rat Heart ». *Frontiers in Physiology* 10: 826. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00826>.
- Zheng, Jusheng, Tao Huang, Yinghua Yu, Xiaojie Hu, Bin Yang, et Duo Li. 2012. « Fish Consumption and CHD Mortality: An Updated Meta-Analysis of Seventeen Cohort Studies ». *Public Health Nutrition* 15 (4): 725-37. <https://doi.org/10.1017/S1368980011002254>.
- Zhuang, Chunlin, Zhenyuan Miao, Chunquan Sheng, et Wannian Zhang. 2014. « Updated Research and Applications of Small Molecule Inhibitors of Keap1-Nrf2 Protein-Protein Interaction: A Review ». *Current Medicinal Chemistry* 21 (16): 1861-70. <https://doi.org/10.2174/0929867321666140217104648>.
- Zorov, Dmitry B., Magdalena Juhaszova, et Steven J. Sollott. 2014. « Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release ». *Physiological Reviews* 94 (3): 909-50. <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2013>.

Annexes

Annexe 1: Demaison L, Leger T, Vergely C, Rochette L, Azarnoush K.
About the controversies of the cardioprotective effect of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) between animal studies and clinical meta-analyses: a review with several strategies to enhance the beneficial effects of n-3 PUFAs.
J Physiol Biochem. 2019 Mar 1. Review.
doi: 10.1007/s13105-019-00670-y.



About the controversies of the cardioprotective effect of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) between animal studies and clinical meta-analyses: a review with several strategies to enhance the beneficial effects of n-3 PUFAs

Luc Demaison¹ · Thibault Leger¹ · Catherine Vergely² · Luc Rochette² · Kasra Azarnoush³

Received: 4 September 2018 / Accepted: 21 February 2019
© University of Navarra 2019

Abstract

Several meta-analyses describing the effect of n-3 polyunsaturated fatty acids on the survival rate of the victims of an acute coronary event do not clearly support a beneficial impact of these fatty acids. Yet, animal studies consistently show n-3 PUFA-induced protection against ischemia-reperfusion-induced myocardial injuries. The impact on reperfusion arrhythmias of these PUFAs is more controversial. The literature shows the anti-arrhythmic properties of circulating n-3 PUFAs. However, when these fatty acids are incorporated in the cardiac membrane, they protect the myocardial tissue vis a vis cellular damage but they can be either pro- or anti-arrhythmic during reperfusion, depending on the severity of tissue injuries. The latter elements can explain the lack of beneficial effect observed in the meta-analyses, but a proper use of n-3 PUFAs may provide advantages in terms of survival rate. This review discusses the different results obtained in humans and animals and presents several strategies to enhance the beneficial effects of n-3 PUFAs.

Keywords N-3 PUFAs · Heart · Infarction · Cellular damages · Arrhythmias · Cardiac death

Introduction

In industrialized societies and numerous emerging countries, a large portion of the population eats what is called a Western diet. This diet is characterized, among other things, by a too large n-6 polyunsaturated fatty acid (PUFAs) supply and a too low n-3 PUFAs intake [1].

Several meta-analyses have indicated that cardiovascular disease-related mortality and sudden death are

decreased by n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) [2–4]. However, other meta-analyses have not observed any beneficial effects on these endpoints [5, 6]. The discrepancies can result from the nature of the chosen n-3 PUFAs, the doses used, and/or the duration of the treatments. They can also result from the selection of clinical trials included in the different meta-analyses, some of them being considered reliable and others not credible. Thus, the cardioprotective effect of n-3 PUFAs on survival after a cardiac event is far from being obvious in the light of the published meta-analyses [7].

Cardiac-related mortality mainly results from three factors: the incidence of coronary events, the severity of myocardial damages, and the seriousness of arrhythmias. Several meta-analyses [4, 8] showed that n-3 PUFAs are inoperative in preventing the occurrence of myocardial infarction which mainly arises through atherosclerosis and/or thrombosis. This lack of beneficial effect is explained by the amount of n-3 PUFAs administered which seems to be too low to be efficient. Indeed, a recent long-term randomized clinical trial conducted in Japan [9]

✉ Luc Demaison
luc.demaison@inra.fr

¹ INRA, UNH, Unité de Nutrition Humaine, Université Clermont Auvergne, CRNH Auvergne, 63000 Clermont-Ferrand, France

² Research team Pathophysiology and Epidemiology of Cerebro-Cardiovascular Diseases (PEC2, EA7460), University of Bourgogne Franche-Comté, UFR des Sciences de Santé, Dijon, France

³ Heart Surgery Department, G. Montpied Hospital, Clermont-Ferrand University Hospital, Clermont-Ferrand, France

indicated that the use of much higher n-3 PUFAs doses led to a significant protection against atherosclerosis and a reduction of the incidence of coronary events. That study is encouraging as regards a reduction of cardiac mortality, but other cardiac events, notably myocardial tissue survival and ventricular arrhythmias during and after ischemia, must be examined.

The protection of myocardial tissues is an important factor in that it may explain a possible beneficial effect of n-3 PUFAs. A meta-analysis highlighted the possible protective action of n-3 PUFAs from cardiac failure [10]. The study showed that PUFAs of the n-3 series increased the left ventricular ejection fraction in a subgroup of patients with dilated cardiomyopathy, although the improvement was not noticed in the overall studied population of cardiac failure patients. Regarding acute myocardial infarction (AMI), a meta-analysis showed that a small quantity of fish oil reduced the risk of AMI but increasing the dose of fish oil (FO) did not reduce this risk any more [3]. In contrast, the same small quantity of FO reduced coronary heart disease-related lethality, but increasing the dose improved survival. This suggests that, in addition to its effects on AMI incidence, FO is also able to protect the myocardium. The observation was confirmed by Wen et al.'s meta-analysis [4] indicating that patients with coronary heart diseases were subject to lower sudden and cardiac deaths without any alteration of coronary event incidence. Finally, it seems that cardiac patients can be protected either through the preservation of the myocardial cell viability or the reduction of lethal ventricular arrhythmia occurrence.

The involvement of ventricular arrhythmias in the potential n-3 PUFAs protective effect has also been investigated in humans, and the results published until now in meta-analyses seem to be clear. PUFAs of the n-3 family do not protect the heart against severe ventricular arrhythmias in patients with implantable cardioverter defibrillators [5, 11]. Thus, it seems that n-3 PUFAs, although not protective against fatal arrhythmias, improve myocardial cell viability during AMIs. The phenomenon is still to be demonstrated however, i.e., by studying fibrosis and/or apoptosis in human cardiac tissues directly after the occurrence of a coronary event. Nevertheless, as it will be developed further, animal studies perfectly enlightened the studies performed in humans and solutions do exist in order to potentiate the beneficial effects of n-3 PUFAs.

This review aims at explaining the discrepancies between the cardiac effects of n-3 PUFAs in the human literature as compared to the studies performed with laboratory animals. Two aspects will be taken into consideration: the influence of n-3 PUFAs on cell viability after a coronary event and their effects on the occurrence and severity of reperfusion arrhythmias.

Cardioprotection by n-3 PUFAs

Numerous animal studies showed that n-3 PUFAs protect the myocardial tissue during ischemia-reperfusion episodes. The observation was ascertained by a reduction of the infarct size [12–17], an improved recovery of mechanical functions after reperfusion [13, 14, 17–24], a lower release of myocardial enzymes such as lactate dehydrogenase and creatine kinase [17, 19, 22, 24–26], and a lower acidosis and lactate release [22] during the ischemia-reperfusion episodes. This consensus, obtained either in *in vivo* models or *ex vivo* isolated hearts, has found only few contradictors. Ku et al. [27] found that dietary eicosapentaenoic acid (C20:5 n-3 or EPA) was efficient in improving the recovery of the cardiac mechanical function after cold storage only when it was administrated in association with a cholesterol-rich diet; Huggins et al. [28] did not mention any cardioprotective effect of fish oil in female mice subjected to global ischemia-reperfusion; and finally, Hlavackova et al. [29] published that a n-6 PUFAs-rich diet decreased the infarct size in male rats compared with a fish oil-rich diet. These contradictory pieces of information, although not insignificant, cannot however counteract the numerous studies describing the positive effect of n-3 PUFAs in ischemia-reperfusion. This is all the more important as such a n-3 PUFAs-induced cardioprotection has been shown after coronary artery bypasses in humans [30]: it was demonstrated by improved myocardial lactate and oxygen extractions and reduced troponin T and creatine kinase releases after the surgery.

A possible explanation of the n-3 PUFAs-related cardioprotective effect during ischemia-reperfusion is the beneficial effect of these fatty acids on the recovery of the coronary flow during reperfusion. As soon as 1993, Yang et al. [24] observed an improvement of this recovery in fish oil-fed rats. The ascertainment was confirmed by Sergiel et al. [31], although these authors noted just a tendency. Taken together, these observations indicate that the coronary arteries, mainly the micro-vessels, take part in the effects of n-3 PUFAs by favoring the coronary flow and improving cardiac mechanical performances. However, several studies performed in cultured cardiomyocytes reported that n-3 PUFAs also act directly on the contractile cells [23, 32]. The n-3 PUFAs-induced cardioprotection thus seems to result from a valuable action on all the cardiac cell types.

The extended researches about n-3 PUFAs as cardioprotective agents [33, 34] did not neglect the question of the efficient fatty acid responsible for the cardioprotective effect. N-3 PUFAs represent a family of several fatty acids including alpha-linolenic (C18:3 n-3 or ALA), eicosapentaenoic (C20:5 n-3 or EPA), docosapentaenoic (C22:5 n-3 or DPA), and docosahexaenoic (C22:6 n-3 or DHA) acids (Fig. 1). ALA is essential, since it cannot be

and 3-series prostaglandins, respectively. However, the estimation of the fatty acid involved is more difficult than it seems. Indeed, prostaglandins are synthesized from PUFAs released from membrane phospholipids by the phospholipase A2. Yet, feeding animals with fish oil is known to increase EPA, DPA, and DHA in cardiac phospholipids and to reduce ArA [19]. So, it is difficult to know whether the increase in membrane EPA or DPA or DHA or the decrease in ArA is responsible for the cardioprotective effect. This question has however been partially answered by feeding rodents or incubating cardiomyocytes with individual n-3 PUFAs (EPA or DHA). EPA seems to be the effective agent compared with DHA [31, 35–37], since this fatty acid was cardioprotective and DHA had no beneficial effect. Both dietary EPA and DHA reduced the ArA proportion of cardiac membranes [31], which excludes the decrease in ArA as the vector of the n-3 PUFAs-related cardioprotective effect. This ascertainment must however be modulated by the work of Ip et al. [38] which showed that the replacement of saturated fat in the diet by n-6 PUFAs was detrimental for the heart. The pro-inflammatory properties of n-6 PUFAs [39] thus also could partially intervene. ALA is also cardioprotective [18, 21, 40] since it can be transformed in the organism and incorporated as EPA in cardiac phospholipids. However, it must be ingested in a threefold larger quantity than fish oil to allow the similar EPA incorporation in myocardial membranes [41].

The mechanism of EPA-related cardioprotection obviously involves prostanoid synthesis [21, 42]. At the cardiomyocyte level, it was shown to imply the mitochondrial function [19, 20]. The fatty acid prevented ischemia-reperfusion-induced decrease in oxidative phosphorylation. This was explained by a lower matrix calcium accumulation during the pathology [43]. Calcium, a known effector of the mitochondrial permeability transition pore, favors the leak of matrix hydro-soluble elements, reduces oxidative phosphorylation, and triggers apoptosis. Nitric oxide production and calcium-activated potassium channel opening are involved in the cardioprotection [15]. However, the prevention of oxidative stress seems to be an important element in the EPA beneficial effect: n-3 PUFAs were reported to increase the enzymatic antioxidant defenses (superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase) [13, 14], preserve the reduced glutathione to oxidized glutathione ratio [13], and decrease oxidative stress [13, 14, 20]. The protective action might be related to an activation of the nuclear factor Nrf2 known to favor the formation of enzymatic antioxidant defenses and inhibition of the pro-apoptotic NF- κ B [14]. It might also result from the activation of PPAR- δ [23]. Importantly, n-3 PUFAs not only act when they are administrated before ischemia but also have a beneficial influence as post-conditioning agents [17].

Effects of n-3 PUFAs on arrhythmia severity

N-3 PUFAs act on arrhythmogenesis directly as circulating fatty acids or indirectly after their incorporation into membrane phospholipids. Numerous studies have shown the anti-arrhythmic action of acute n-3 PUFAs administration. These beneficial properties are mainly based on electrophysiological studies on cultured neonatal or adult isolated ventricular myocytes. The first work suggesting an impact of n-3 PUFAs on cardiac electrical activity reported an EPA- and DHA-induced decrease in contraction frequency of cultured neonatal rat cardiomyocytes [44]. Thereafter, Kang and Leaf [45] showed that EPA and DHA reduced cardiomyocyte arrhythmias induced by lysophosphatidylcholine and palmitoylecarnitine. Numerous investigations were then conducted to understand the mechanism of this effect. They concluded that EPA and DHA stabilized the cardiomyocyte electrical activity via the inhibition of ionic channels. In contrast with saturated and monounsaturated fatty acids, EPA and DHA inhibit sodium [46], L-type calcium [47], and outward potassium currents [48]. A higher electrical activity is thus necessary to trigger an action potential, the refractory period is prolonged [49], and acute n-3 PUFAs administration displays anti-arrhythmic properties. If the effect of n-3 PUFAs on the sodium current is important to determine the cardiomyocyte excitability, modulating the L-type calcium current is also of utmost importance in the anti-arrhythmic action of these molecules: they were shown to suppress calcium sparks triggered by cardiomyocyte electrical stimulation [47, 50] maybe through the reduction of calcium availability for sarcoplasmic reticulum calcium uptake and a decrease of calcium release via ryanodine receptors [51]. However, other mechanisms can explain a lower calcium uptake by the cardiomyocytes, notably n-3 PUFAs-induced inhibition of the sodium/proton [52] and sodium/calcium [53] exchanges. The anti-arrhythmic properties of circulating n-3 PUFAs were ascertained during ischemia and/or reperfusion in the *in vivo* situation in animal models and even in humans. In the running dog, n-3 PUFAs infused before ischemia decreased the occurrence of arrhythmias developing during the ischemic episode [54]. In the pig subjected to cardiac ischemia and reperfusion, pericardial delivery of DHA from the 40th min before ischemia to the 5th min of reperfusion reduced the infarct size and the incidence of arrhythmias, resulting in no animal death [55]. In a model of long QT interval of isolated rabbit heart, EPA and DHA decreased the incidence of afterdepolarizations and torsades de pointe [56]. Finally, in humans, recent n-3 PUFAs ingestion reduced the risk of sudden cardiac death [57]. The beneficial effect of circulating n-3 PUFAs on the incidence of malignant arrhythmias compared with saturated and monounsaturated fatty acids is thus obvious, but there is no clear evidence showing that n-6 PUFAs exert less anti-arrhythmic activity. This might explain the results of the meta-analyses showing

the n-3 PUFAs' inefficiency in the reduction of fatal cardiac arrhythmias. However, other animal studies evaluating the effects of n-3 PUFAs incorporated in cardiac phospholipids clearly show a strong influence of these fatty acids on cardiac arrhythmogenicity.

Long-term dietary treatment with n-3 PUFAs leads to an incorporation of these fatty acids in cardiac phospholipids at the detriment of n-6 PUFAs. The effects of these changes in membrane composition on the severity of arrhythmias have been studied for a long time. The first studies mentioning a protective effect of n-3 PUFAs on arrhythmogenicity have been performed in the marmoset monkey [58, 59]. They showed that dietary PUFAs, particularly those of the n-3 series, increased the ventricular fibrillation threshold compared with dietary saturated fatty acids in paced animal and during ischemia. The anti-arrhythmic properties of n-3 PUFAs have been confirmed in several other animal models including *in vivo* and *ex vivo* preparations [12, 60–62]. These anti-arrhythmic effects have been observed during ischemia [12, 58, 59, 61, 62], although several studies did not observe any beneficial effect during coronary occlusion [15, 63, 64].

Severe ventricular arrhythmias potentially leading to cardiac death are observed during ischemia, but their incidence and duration are low compared with those occurring during reperfusion. Yet, reperfusion is currently performed in cardiology units to keep the cardiac tissue from an inevitable necrosis. Reperfusion arrhythmias explode soon after the ischemic event during a critical period whose duration depends on the species studied. In man, this period can last approximately 10 days. Since these arrhythmias are lethal, it is important to determine the influence of n-3 PUFAs on these electrical abnormalities after the re-establishment of the coronary flow in the ischemic area. Opinions are divided as to whether n-3 PUFAs are anti-arrhythmic after an infarction. Performing a coronary artery ligation in the living rat, McLennan [62] observed a reduced mortality in n-3 PUFAs-fed rats compared with their counterparts fed a n-6 PUFAs-rich diet. This was however not explained by the arrhythmia score which was similar in both groups. In contrast, Isensee et al. [61] noted an anti-arrhythmic effect of n-3 PUFAs compared with PUFAs of the n-6 series. Abdukeyum et al. [12] observed the same effect. In contrast, other investigators experimenting the living rabbit or isolated rat heart did not note any effect of n-3 PUFAs on severe reperfusion arrhythmias [15] or even observed a tendency toward a pro-arrhythmic effect [63]. In an unpublished work performed in our laboratory in the isolated working rat heart, we even observed a pro-arrhythmic effect of dietary n-3 PUFAs after coronary artery ligation: the results, presented in Fig. 2, clearly demonstrate the deleterious effect of dietary n-3 PUFAs compared with n-6 PUFAs. Patch-clamp studies in isolated ventricle myocytes of animals fed a n-3 PUFAs-rich diet are also controversial. When the cardiomyocytes are isolated from healthy pig ventricles,

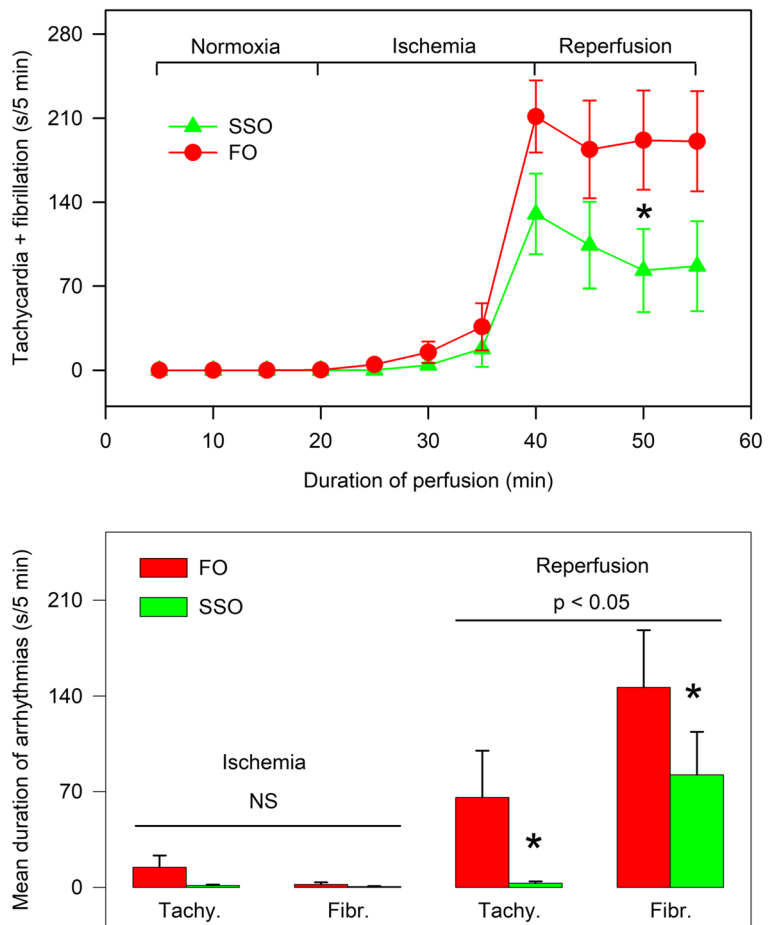
membrane n-3 PUFAs decrease action potential duration, inhibit I(Ca,L) and the Na/Ca exchange, and activate I(K1) et I(Ks), rendering the cell less prone to eventual arrhythmic events [65]. This was confirmed by Den Ruijter et al. [66] who showed that E4031-induced early post-depolarizations in myocytes extracted from healthy pig ventricles were reduced by membrane n-3 PUFAs. This might be due to a reduced ability of n-3 PUFAs-rich cardiomyocytes to produce triphosphate inositol after adrenergic stimulation [67] and consequently to increase calcium sparks. However, researchers patch-clamping myocytes isolated from a post-ischemic ventricle of dogs fed a n-3 PUFAs-rich diet do not share the same opinion. They discriminated myocytes resistant to ventricular fibrillation (VF-) from those that were susceptible to this arrhythmic abnormality (VF+) and found that membrane n-3 PUFAs did not reduce calcium sparks in VF+ and increased them in VF- [68]. They concluded that n-3 PUFAs were pro-arrhythmic in post-ischemic myocardium. This was confirmed by another more recent study using the same model which showed that membrane n-3 PUFAs increased the action potential duration without improving the repolarization phase in myocytes extracted from post-AMI ventricles [69]. Finally, Billman reviewed carefully the effects of n-3 PUFAs [70] and concluded that "Despite initial encouraging results, more recent clinical prevention and animal studies have not only failed to reduce sudden cardiac death but actually increased mortality in angina patients and increased rather than decreased malignant arrhythmias in animal models of regional ischemia."

Harmonization of the opinions about n-3 PUFAs and reperfusion arrhythmias

Rather than exacerbating tensions between those who believe that membrane n-3 PUFAs increase lethal reperfusion arrhythmias and those who think that these fatty acids are anti-arrhythmic, we feel that both opinions are right. To reach this hypothesis, we have started from the two postulates presented earlier in this manuscript: (i) n-3 PUFAs incorporated in membrane phospholipids, namely the eicosapentaenoic acid, reduce ischemia-reperfusion-induced cellular damage; (ii) these membrane fatty acids are either pro- or anti-arrhythmic during post-ischemic reperfusion.

The relation between the duration of ischemia (thus the intensity of cellular damage induced by ischemia-reperfusion) and the severity of reperfusion arrhythmias is well known: it is a bell-shaped curve [71]. Since membrane n-3 PUFAs reduce ischemia-reperfusion-induced cellular damage compared with n-6 PUFAs, these fatty acids help shift the curve toward the right (Fig. 3). The shape of the curve is easily explained by the electrical conductivity of the reperfused myocardium: when cellular damage is low, the

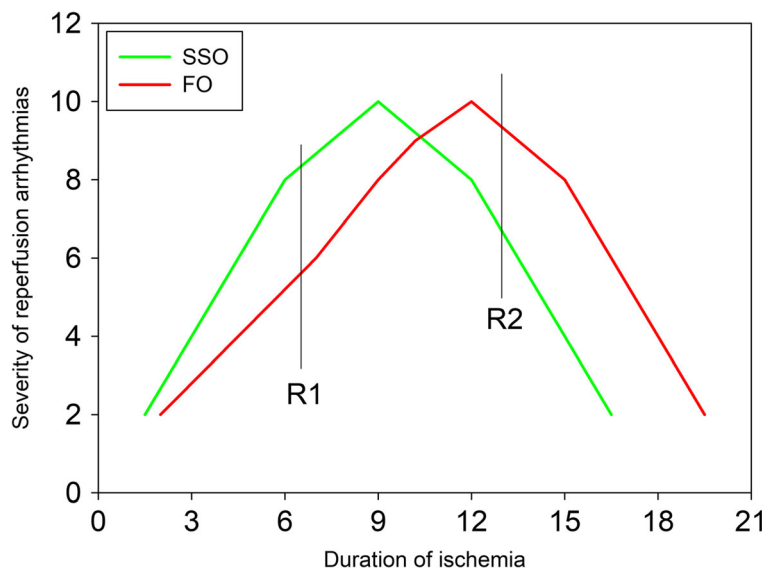
Fig. 2 Influence of dietary sunflower seed and fish oils on the severity of ischemic and reperfusion arrhythmias. After a 6-week feeding, rat hearts were perfused according to the working mode with a Krebs-Heinselett medium which was rich in calcium (2.5 mM), low in magnesium (1.2 mM), and low in potassium (3 mM). After 30 min of equilibration, a local ischemia was performed by left anterior descending artery ligation for 20 min. The ligation was then released to reperfuse the heart for 20 min. Upper panel: time-evolution of tachycardia and fibrillation during normoxia, ischemia, and reperfusion. Lower panel: cumulative duration of tachycardia (Tachy.) and fibrillation (Fibr.) during the ischemic episode and reperfusion. SSO: rats fed with 10% of n-6 PUFA-rich sunflower seed oil; FO: rats fed with 5% of n-3 PUFA-rich fish oil + 5% of sunflower seed oil. The number of experiments was 12 per group. *Significantly different by one-way analysis of variance



conductivity of the tissue is still good, but the electrical stimulus is slowed in some zones and reaches the non-ischemic healthy myocardium with a delay compared with the normal stimulus. This triggers a post-depolarization phenomenon also called re-entry loop. The more damaged the myocardium, the more re-entry loops and the more arrhythmic the heart is. This

thus leads to tachycardia with periodic re-entry loops and fibrillation when these loops are irregular in their frequency. In the first part of the curve, arrhythmia severity thus increases proportionally with the intensity of cellular damage. However, the death of cardiomyocytes switches off the electrical activity in the unhealthy zone, progressively reducing the number of

Fig. 3 Schematic representation of the influence of n-6 (SSO, sunflower seed oil) and n-3 (FO, fish oil) polyunsaturated fatty acids on the relationship between the severity of reperfusion arrhythmias and duration of ischemia. The longer the duration of ischemia, the more severe the cellular damage. R1: marker for low cellular damage; R2: marker for high cellular damage



re-entry loops and severity of reperfusion arrhythmias. When cellular damage increases, the occurrence and duration of reperfusion arrhythmias are thus progressively decreased: this is the second part of the curve. Since membrane n-3 PUFAs slow down the occurrence of cellular damage, they also reduce the severity of reperfusion arrhythmias in the first part of the curve (point R1 in Fig. 3). However, this is completely different in the second part of the curve (point R2 in Fig. 3): membrane n-3 PUFAs become pro-arrhythmic.

The severity of cellular damage during ischemia-reperfusion can be modulated by the duration of ischemia, but other factors as well: the temperature of the animals or perfusion fluid, calcium and magnesium concentrations of the liquid irrigating the heart or other environmental modifications altering intrinsic regulatory elements induced by the diet, long-term pharmacological treatments, or other factors. Notably, all the publications showing an anti-arrhythmic effect of membrane n-3 PUFAs during post-ischemic reperfusion were based on an ischemic event of low intensity. This is the case for the study by McLennan [62] in the living rat which showed that the mortality during reperfusion was decreased by membrane n-3 PUFAs after an ischemic episode of only 5 min. Interestingly, in the same study, the author also performed a 15-min ischemia in the same model and did not observe any difference in the severity of reperfusion arrhythmias after feeding saturated, n-6 or n-3 PUFAs. This clearly indicates that the effects of dietary PUFAs on the severity of reperfusion arrhythmias depend on the duration of ischemia and intensity of cellular damage. This is also the case for the work by Isensee and Jacob [61] who performed a short-duration (10 min) ischemia and observed an anti-arrhythmic activity of long-term dietary fish oil. The study published by Abdukeyum et al. [12] in the isolated rat heart describing the effect of 30-min ischemia with high-calcium (2.5 mM) but also high-magnesium concentrations (1.6 mM) in the perfusion medium agrees with this postulate. Magnesium is recognized as a performant anti-calcium compound, and its high concentration in the perfusion fluid probably contributed to reduce the severity of ischemia-reperfusion cellular damage drastically. The only exception to this rule is the study in the living rabbit by Ogita et al. [15] who performed a 30-min occlusion followed by a 3-h reperfusion. Despite the long-duration ischemia, they showed a tendency toward an anti-arrhythmic effect of membrane n-3 PUFAs based on the occurrence of ventricular premature contractions. These results can be related to the characteristics of the animal model. Rabbit calcemia is high (3.4 mM compared with approximately 1.5 mM in the rat) depending mainly on the dietary supply. Moreover, its cellular calcium metabolism may be different from that of rodents. Furthermore, the authors were not able to display the results about the duration of fibrillation probably because of animal death: they only stated that the occurrence of fibrillation during reperfusion did not vary among the

groups. It thus cannot be said for sure that dietary n-3 PUFAs are truly anti-arrhythmic.

By contrast, studies performing more severe ischemia showed a pro-arrhythmic effect of dietary n-3 PUFAs compared with n-6 PUFAs. This is the case for the work by Demaison et al. [63] with an ischemia duration of 20 min in the presence of a perfusion fluid rich in calcium (2.5 mM) and poor in magnesium (1.2 mM). They noted that membrane n-3 PUFAs increased reperfusion arrhythmias (Fig. 4). However, reperfusion arrhythmias were almost totally suppressed in the n-3 PUFAs group with a treatment of the heart by lidocaine from the beginning of the perfusion. In contrast, reperfusion arrhythmias noted in the n-6 group were only marginally suppressed by the lidocaine treatment. This suggested that the myocardium of n-3 PUFAs-fed animals was less severely affected by ischemia-reperfusion than the heart of n-6 PUFAs rodents. This was ascertained by the evaluation of the mitochondrial function which was less altered in the n-3 PUFAs group (see [63] for details). However, the more serious arrhythmias in the n-3 PUFAs group indicate that the myocardium was located in the second part of the curve relating the intensity of cellular damage and the severity of reperfusion arrhythmias (point R2). The situation is more lethal in the whole animal compared with n-6 PUFAs-fed rats because of the severity of malignant arrhythmias, but the myocardium is less damaged.

Since n-3 PUFAs can either be pro- or anti-arrhythmic depending on the severity of ischemia-reperfusion-induced cellular damage, it seems logical that the meta-analyses in humans did not show any beneficial effect of these fatty acids on the severity of arrhythmias and coronary heart disease-related mortality: averaging pro-arrhythmic data plus anti-arrhythmic data for the n-3 PUFAs leads to a neutral mean which is comparable to that obtained with the n-6 PUFAs. This translates in an unchanged mortality rate whatever the dietary PUFAs supplied.

Strategies to enhance the beneficial effects of n-3 PUFAs

Patients eating a Western diet rich in n-6 PUFAs and poor in n-3 PUFAs are at a high risk for severe cellular damage during post-infarction revascularization. So, they need to be treated to increase cardioprotection. This can be done through pharmacological treatment with possible secondary effects or via a nutritional modification able to afford the protection. N-3 PUFAs, especially dietary EPA, are good candidates for that purpose. ALA can also act positively since it is elongated and desaturated in EPA in the organism, but this fatty acid must be supplied in greater quantities (approximately 3 times more) as compared with EPA.

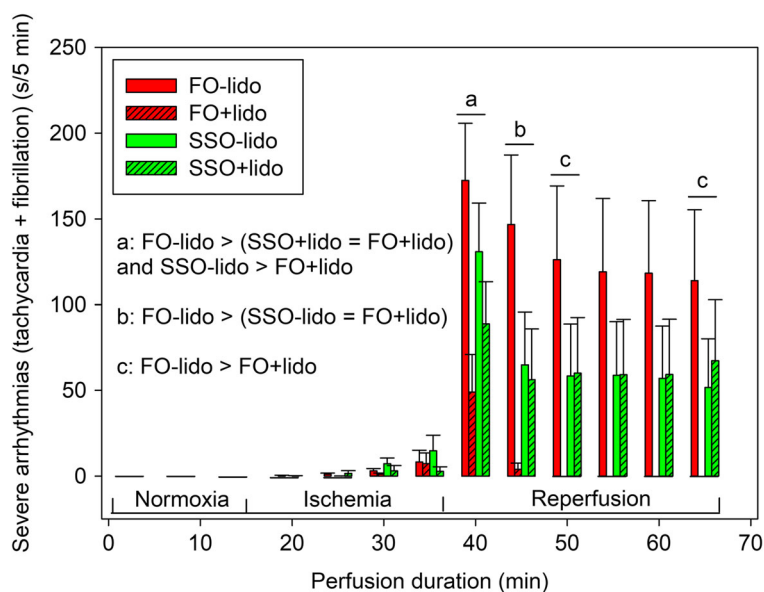


Fig. 4 Influence of the n-6/n-3 polyunsaturated fatty acid ratio and lidocaine treatment (5 μ M) on the duration of severe arrhythmias during normoxia, ischemia, and reperfusion. After a 6-week feeding, rat hearts were perfused according to the working mode with a Krebs-Heinselett medium which was rich in calcium (2.5 mM), low in magnesium (1.2 mM), and low in potassium (3 mM). After 30 min of equilibration, a local ischemia was performed by left anterior descending artery ligation for 20 min. The ligation was then released to reperfuse the

heart for 30 min. The lidocaine treatment was initiated as soon as the beginning of perfusion and maintained throughout the whole period of normoxia, ischemia, and reperfusion. The number of experiments was 12 per group. SSO: rats fed with 10% of n-6 PUFAs-rich sunflower seed oil; FO: rats fed with 5% of n-3 PUFAs-rich fish oil + 5% of sunflower seed oil; lido: lidocaine treatment; when SEM are not visible, the mean value is close to zero; a, b, c: significant differences as described on the figure. This figure is adapted from [63]

N-3 PUFAs can be administered at different stages of the pathology: before infarction, during ischemia, or at the beginning of the period following the revascularization intervention. The results obtained will be different depending on when the n-3 PUFAs are administered, but also according to the severity of ischemia. Whenever n-3 PUFAs are administered, it is of the utmost importance to maintain a steady treatment all the way through the critical post-revascularization period, i.e., during the 10 days following reperfusion. The GISSI prevention study performed this kind of treatment in secondary prevention and obtained excellent results on the survival rate [72]. Performing a regular administration during the critical period allows the optimal manifestation of the anti-arrhythmic effect of circulating n-3 PUFAs. It is thus important to maintain the level of plasma n-3 PUFAs as high as possible to reduce lethality at its lowest level. However, as it can be seen in the study by Demaison et al. [63], some reperfusion arrhythmias are resistant to anti-arrhythmic treatments: this is the case when ischemia-reperfusion-induced cellular damage is severe. In order to minimize these injuries, the best way consists in affording cardioprotection through a pharmacological or dietary treatment: n-3 PUFAs administered before or during the ischemic event can afford strong protection and help decrease cellular injuries. As it was explained in their last paragraph, the treatment will trigger either an anti- or a pro-arrhythmic effect during reperfusion, depending on the extent of the cellular damage. High circulating n-3 PUFAs (or a

pharmacological anti-arrhythmic agent such as lidocaine) during the critical period of reperfusion will be able to suppress arrhythmias either partially or totally and increase patient survival. However, if cellular injuries are too serious, arrhythmias will become resistant to the anti-arrhythmic treatment: this can even occur with n-3 PUFAs' administration before reperfusion if the pathology is too serious, but the use of these fatty acids allows physicians to gain ground on the pathology by retarding cellular damage. The use of n-3 PUFAs before revascularization is thus of utmost importance to increase the survival rate, especially if the treatment is maintained throughout the critical reperfusion phase.

For the primary prevention of patients eating a Western diet, the problem is more complex, since n-3 PUFAs cannot be given before the ischemic event. Patients can be subjected to a sudden coronary artery occlusion by thrombus formation. They are then running a serious risk of fibrillation and sudden cardiac death. One of the main care then performed by the medical staff is a thrombolytic intervention. Alternatively, other patients can be subjected to atherosclerosis which slowly develops and allows the formation of new coronary vessels irrigating the unhealthy myocardium: they run fewer risks of malignant arrhythmias and sudden death, but they will have to undergo a revascularization intervention (a percutaneous coronary intervention or coronary artery bypass surgery) which can lead to abnormal electrical activity.

In the first patients with thrombus formation, n-3 PUFAs can be given as soon as the thrombolytic therapy is performed: an increase in circulating n-3 PUFAs may reduce malignant arrhythmias and somehow prevent sudden cardiac death provided the irrigation of the diseased myocardium is restored and if the cellular injuries are not too severe. The period of time between the infarction onset and medical care is thus crucial. For patients with no risk of sudden cardiac death (atherosclerotic individuals), the n-3 PUFAs treatment can be administered several days before the revascularization intervention: this allows the reduction of cellular injury and reperfusion arrhythmias, especially if a regular n-3 PUFAs treatment is performed during the critical period of reperfusion to maintain their level in the circulation as high as possible.

Conclusion

N-3 PUFAs in the circulation are anti-arrhythmic whereas those which are incorporated in membrane phospholipids are cardioprotective but can display either a pro- or an anti-arrhythmic effect during the re-establishment of the coronary flow. These two properties should allow an improvement of the survival rate after a coronary artery disease. However, they must be performed properly. Administering n-3 PUFAs before revascularization is obviously beneficial as it decreases ischemia-reperfusion-induced cardiomyocyte injuries. Since such an intervention can trigger malignant reperfusion injuries, it is highly recommended to sustain the treatment throughout the critical period of reperfusion in order to maintain a high level of circulating n-3 PUFAs.

Acknowledgements We would like to thank Christophe Cottet for his skillful English editing of the manuscript.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article. The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the National Institute of Agronomical Research.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

References

1. Simopoulos AP (1993) N-3 fatty acid-enriched eggs, lipids, and Western diet: time for change. *Nutr* 9:561–562
2. Clifton PM, Keogh JB (2017) A systematic review of the effect of dietary saturated and polyunsaturated fat on heart disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 27:1060–1080
3. Konig A, Bouzan C, Cohen JT, Connor WE, Kris-Etherton PM, Gray GM, Lawrence RS, Savitz DA, Teutsch SM (2005) A quantitative analysis of fish consumption and coronary heart disease mortality. *Am J Prev Med* 29:335–346
4. Wen YT, Dai JH, Gao Q (2014) Effects of omega-3 fatty acid on major cardiovascular events and mortality in patients with coronary heart disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 24:470–475
5. Khoueiry G, Abi Rafeh N, Sullivan E, Saiful F, Jaffery Z, Kenigsberg DN, Krishnan SC, Khanal S, Bekheit S, Kowalski M (2013) Do omega-3 polyunsaturated fatty acids reduce risk of sudden cardiac death and ventricular arrhythmias? A meta-analysis of randomized trials. *Heart Lung : J Crit Care* 42:251–256
6. Langlois PL, Hardy G, Manzanares W (2017) Omega-3 polyunsaturated fatty acids in cardiac surgery patients: an updated systematic review and meta-analysis. *Clin Nutr* 36:737–746
7. Lorente-Cebrian S, Costa AG, Navas-Carretero S, Zabala M, Martinez JA, Moreno-Aliaga MJ (2013) Role of omega-3 fatty acids in obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular diseases: a review of the evidence. *J Physiol Biochem* 69:633–651
8. Enns JE, Yeganeh A, Zarychanski R, Abou-Setta AM, Friesen C, Zahradka P, Taylor CG (2014) The impact of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on the incidence of cardiovascular events and complications in peripheral arterial disease: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cardiovasc Disord* 14:70
9. Sekikawa A, Doyle MF, Kuller LH (2015) Recent findings of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids (LCn-3 PUFAs) on atherosclerosis and coronary heart disease (CHD) contrasting studies in Western countries to Japan. *Trends Cardiovasc Med* 25:717–723
10. Wang C, Xiong B, Huang J (2016) The role of omega-3 polyunsaturated fatty acids in heart failure: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Nutrients* 9(1):18
11. Brouwer IA, Raitt MH, Dullemeyer C, Kraemer DF, Zock PL, Morris C, Katan MB, Connor WE, Camm JA, Schouten EG et al (2009) Effect of fish oil on ventricular tachyarrhythmia in three studies in patients with implantable cardioverter defibrillators. *Eur Heart J* 30:820–826
12. Abdukeyum GG, Owen AJ, McLennan PL (2008) Dietary (n-3) long-chain polyunsaturated fatty acids inhibit ischemia and reperfusion arrhythmias and infarction in rat heart not enhanced by ischemic preconditioning. *J Nutr* 138:1902–1909
13. Castillo RL, Arias C, Farias JG (2014) Omega 3 chronic supplementation attenuates myocardial ischaemia-reperfusion injury through reinforcement of antioxidant defense system in rats. *Cell Biochem Funct* 32:274–281
14. Farias JG, Carrasco-Pozo C, Carrasco Loza R, Sepulveda N, Alvarez P, Quezada M, Quinones J, Molina V, Castillo RL (2017) Polyunsaturated fatty acid induces cardioprotection against ischemia-reperfusion through the inhibition of NF-kappaB and induction of Nrf2. *Exp Biol Med (Maywood)* 242:1104–1114
15. Ogita H, Node K, Asanuma H, Sanada S, Takashima S, Minamino T, Soma M, Kim J, Hori M, Kitakaze M (2003) Eicosapentaenoic acid reduces myocardial injury induced by ischemia and reperfusion in rabbit hearts. *J Cardiovasc Pharmacol* 41:964–969
16. Zeghichi-Hamri S, de Lorgeril M, Salen P, Chibane M, de Leiris J, Boucher F, Laporte F (2010) Protective effect of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on myocardial resistance to ischemia-reperfusion injury in rats. *Nutr Res* 30:849–857
17. Zhang FW, Tong J, Yan YS, Chen QQ, Zhao XP (2018) Omega-3 polyunsaturated fatty acid postconditioning protects the isolated perfused rat heart from ischemia-reperfusion injury. *Cardiorenal Med* 8:173–182
18. Al-Khalifa A, Maddaford TG, Chahine MN, Austria JA, Edel AL, Richard MN, Ander BP, Gavel N, Kopilas M, Ganguly R et al (2007) Effect of dietary hempseed intake on cardiac ischemia-reperfusion injury. *Am J Phys* 292:R1198–R1203
19. Demaison L, Sergiel JP, Moreau D, Grynberg A (1994) Influence of the phospholipid n-6/n-3 polyunsaturated fatty acid ratio on the

- mitochondrial oxidative metabolism before and after myocardial ischemia. *Biochim Biophys Acta* 1227:53–59
20. Gao K, Chen L, Yang M, Han L, Yiguang S, Zhao H, Chen X, Hu W, Liang H, Luo J et al (2015) Marine n-3 PUFA protects hearts from I/R injury via restoration of mitochondrial function. *Scand Cardiovasc J* 49:264–269
 21. Kukoba TV, Shysh AM, Moibenko OO, Kotsiuruba AV, Kharchenko OV (2006) The effects of alpha-linolenic acid on the functioning of the isolated heart during acute myocardial ischemia/reperfusion. *Fiziol Zh* 52:12–20
 22. Pepe S, McLennan PL (2002) Cardiac membrane fatty acid composition modulates myocardial oxygen consumption and postischemic recovery of contractile function. *Circulation* 105:2303–2308
 23. Shysh AM, Nagibin VS, Kaplinskii SP, Dosenko VE (2016) N-3 long chain polyunsaturated fatty acids increase the expression of PPARgamma-target genes and resistance of isolated heart and cultured cardiomyocytes to ischemic injury. *Pharmacol Rep* 68:1133–1139
 24. Yang BC, Saldeen TG, Bryant JL, Nichols WW, Mehta JL (1993) Long-term dietary fish oil supplementation protects against ischemia-reperfusion-induced myocardial dysfunction in isolated rat hearts. *Am Heart J* 126:1287–1292
 25. Abbas AM (2016) Cardioprotective effect of resveratrol analogue isorhapontigenin versus omega-3 fatty acids in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *J Physiol Biochem* 72:469–484
 26. Derbali A, Mnafgui K, Affes M, Derbali F, Hajji R, Gharsallah N, Allouche N, El Feki A (2015) Cardioprotective effect of linseed oil against isoproterenol-induced myocardial infarction in Wistar rats: a biochemical and electrocardiographic study. *J Physiol Biochem* 71:281–288
 27. Ku K, Oku H, Kaneda T, Onoe M, Zhang Z (1999) Beneficial effects of omega-3 fatty acid treatment on the recovery of cardiac function after cold storage of hyperlipidemic rats. *Metab Clin Exp* 48:1203–1209
 28. Huggins CE, Curl CL, Patel R, McLennan PL, Theiss ML, Pedrazzini T, Pepe S, Delbridge LM (2009) Dietary fish oil is antihypertrophic but does not enhance postischemic myocardial function in female mice. *Am J Phys* 296:H957–H966
 29. Hlavackova M, Neckar J, Jezkova J, Balkova P, Stankova B, Novakova O, Kolar F, Novak F (2007) Dietary polyunsaturated fatty acids alter myocardial protein kinase C expression and affect cardioprotection induced by chronic hypoxia. *Exp Biol Med* (Maywood) 232:823–832
 30. Veljovic M, Popadic A, Vukic Z, Ilic R, Trifunovic Z, Antunovic M, Mandaric V, Tisma S, Markovic Z (2013) Myocardial protection during elective coronary artery bypasses grafting by pretreatment with omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Vojnosanit Pregl* 70:484–492
 31. Sergiel JP, Martine L, Raederstorff D, Grynberg A, Demaison L (1998) Individual effects of dietary EPA and DHA on the functioning of the isolated working rat heart. *Can J Physiol Pharmacol* 76:728–736
 32. Engelbrecht AM, Engelbrecht P, Genade S, Niesler C, Page C, Smuts M, Lochner A (2005) Long-chain polyunsaturated fatty acids protect the heart against ischemia/reperfusion-induced injury via a MAPK dependent pathway. *J Mol Cell Cardiol* 39:940–954
 33. Dyerberg J, Bang HO (1980) Proposed method for the prevention of thrombosis. The Eskimo model. *Ugeskr Laeger* 142:1597–1600
 34. Norell SE, Ahlbom A, Feychting M, Pedersen NL (1986) Fish consumption and mortality from coronary heart disease. *Br Med J* 293:426
 35. Demaison L, Moreau D, Vergely-Vandriessse C, Gregoire S, Degois M, Rochette L (2001) Effects of dietary polyunsaturated fatty acids and hepatic steatosis on the functioning of isolated working rat heart under normoxic conditions and during post-ischemic reperfusion. *Mol Cell Biochem* 224:103–116
 36. Ku K, Nosaka S, Hashimoto M, Kin S, Saitoh Y, Alam MS, Masumura S, Nakayama K (1996) The effects of omega-3 polyunsaturated (correction of polyunsaturated) fatty acids on the recovery of cardiac function following cold preservation and reperfusion in hyperlipidemic rats. *Transplant* 62:735–742
 37. Nasa Y, Hayashi M, Sasaki H, Hayashi J, Takeo S (1998) Long-term supplementation with eicosapentaenoic acid salvages cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced injury in rats fed with fish-oil-deprived diet. *Jap J Pharmacol* 77:137–146
 38. Ip WT, McAlindon A, Miller SE, Bell JR, Curl CL, Huggins CE, Mellor KM, Raaijmakers AJ, Bienvenu LA, McLennan PL et al (2016) Dietary omega-6 fatty acid replacement selectively impairs cardiac functional recovery after ischemia in female (but not male) rats. *Am J Phys* 311:H768–H780
 39. Patterson E, Wall R, Fitzgerald GF, Ross RP, Stanton C (2012) Health implications of high dietary omega-6 polyunsaturated fatty acids. *J Nutr Metab* 2012:539426
 40. Prociuk M, Edel A, Gavel N, Deniset J, Ganguly R, Austria J, Ander B, Lukas A, Pierce G (2006) The effects of dietary hempseed on cardiac ischemia/reperfusion injury in hypercholesterolemic rabbits. *Exp Clin Cardiol* 11:198–205
 41. Demaison L, Grynberg A (1991) Influence of dietary linseed oil and sunflower seed oil on some mechanical and metabolic parameters of isolated working rat hearts. *Reprod Nutr Dev* 31:37–45
 42. Oudot F, Grynberg A, Sergiel JP (1995) Eicosanoid synthesis in cardiomyocytes: influence of hypoxia, reoxygenation, and polyunsaturated fatty acids. *Am J Phys* 268:H308–H315
 43. Pepe S, Tsuchiya N, Lakatta EG, Hansford RG (1999) PUFA and aging modulate cardiac mitochondrial membrane lipid composition and Ca²⁺ activation of PDH. *Am J Phys* 276:H149–H158
 44. Kang JX, Leaf A (1994) Effects of long-chain polyunsaturated fatty acids on the contraction of neonatal rat cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:9886–9890
 45. Kang JX, Leaf A (1996) Protective effects of free polyunsaturated fatty acids on arrhythmias induced by lysophosphatidylcholine or palmitoylecarnitine in neonatal rat cardiac myocytes. *Eur J Pharmacol* 297:97–106
 46. Xiao YF, Kang JX, Morgan JP, Leaf A (1995) Blocking effects of polyunsaturated fatty acids on Na⁺ channels of neonatal rat ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11000–11004
 47. Xiao YF, Gomez AM, Morgan JP, Lederer WJ, Leaf A (1997) Suppression of voltage-gated L-type Ca²⁺ currents by polyunsaturated fatty acids in adult and neonatal rat ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4182–4187
 48. Li HX, Wang RX, Li XR, Guo T, Wu Y, Guo SX, Sun LP, Yang ZY, Yang XJ, Jiang WP (2011) Increasing DHA and EPA concentrations prolong action potential durations and reduce transient outward potassium currents in rat ventricular myocytes. *Lipids* 46:163–170
 49. Leaf A, Kang JX, Xiao YF, Billman GE (1999) N-3 fatty acids in the prevention of cardiac arrhythmias. *Lipids* 34(Suppl):S187–S189
 50. Den Ruijter HM, Berecki G, Verkerk AO, Bakker D, Baartscheer A, Schumacher CA, Belterman CN, de Jonge N, Fiolet JW, Brouwer IA et al (2008) Acute administration of fish oil inhibits triggered activity in isolated myocytes from rabbits and patients with heart failure. *Circulation* 117:536–544
 51. Negretti N, Perez MR, Walker D, O'Neill SC (2000) Inhibition of sarcoplasmic reticulum function by polyunsaturated fatty acids in intact, isolated myocytes from rat ventricular muscle. *J Physiol* 523(Pt 2):367–375
 52. Goel DP, Maddaford TG, Pierce GN (2002) Effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids on cardiac sarcolemmal Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchange. *Am J Phys* 283:H1688–H1694

53. Xiao YF, Ke Q, Chen Y, Morgan JP, Leaf A (2004) Inhibitory effect of n-3 fish oil fatty acids on cardiac $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange currents in HEK293t cells. *Biochem Biophys Res Commun* 321:116–123
54. Billman GE, Kang JX, Leaf A (1997) Prevention of ischemia-induced cardiac sudden death by n-3 polyunsaturated fatty acids in dogs. *Lipids* 32:1161–1168
55. Xiao YF, Sigg DC, Ujhelyi MR, Wilhelm JJ, Richardson ES, Iaizzo PA (2008) Pericardial delivery of omega-3 fatty acid: a novel approach to reducing myocardial infarct sizes and arrhythmias. *Am J Phys* 294:H2212–H2218
56. Milberg P, Frommeyer G, Kleideiter A, Fischer A, Osada N, Breithardt G, Fehr M, Eckardt L (2011) Antiarrhythmic effects of free polyunsaturated fatty acids in an experimental model of LQT2 and LQT3 due to suppression of early afterdepolarizations and reduction of spatial and temporal dispersion of repolarization. *Heart Rhythm* 8:1492–1500
57. Siscovick DS, Raghunathan T, King I, Weinmann S, Bovbjerg VE, Kushi L, Cobb LA, Copass MK, Psaty BM, Lemaitre R et al (2000) Dietary intake of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and the risk of primary cardiac arrest. *Am J Clin Nutr* 71:208S–212S
58. McLennan PL, Bridle TM, Abeywardena MY, Chamock JS (1992) Dietary lipid modulation of ventricular fibrillation threshold in the marmoset monkey. *Am Heart J* 123:1555–1561
59. McLennan PL, Bridle TM, Abeywardena MY, Chamock JS (1993) Comparative efficacy of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids in modulating ventricular fibrillation threshold in marmoset monkeys. *Am J Clin Nutr* 58:666–669
60. Bacova B, Sec P, Radosinska J, Certik M, Vachulova A, Tribulova N (2013) Lower omega-3 index is a marker of increased propensity of hypertensive rat heart to malignant arrhythmias. *Physiol Res* 62(Suppl 1):S201–S208
61. Isensee H, Jacob R (1994) Differential effects of various oil diets on the risk of cardiac arrhythmias in rats. *J Cardiovasc Risk* 1:353–359
62. McLennan PL (1993) Relative effects of dietary saturated, mono-unsaturated, and polyunsaturated fatty acids on cardiac arrhythmias in rats. *Am J Clin Nutr* 57:207–212
63. Demaison L, Moreau D, Clauw F, Vergely C, Rochette L (2013) Mitochondrial basis of the anti-arrhythmic action of lidocaine and modulation by the n-6 to n-3 PUFA ratio of cardiac phospholipids. *Fundam Clin Pharmacol* 27:373–386
64. Maczewski M, Duda M, Marciszek M, Kolodziejczyk J, Dobrzyn P, Dobrzyn A, Mackiewicz U (2016) Omega-3 fatty acids do not protect against arrhythmias in acute nonreperfused myocardial infarction despite some antiarrhythmic effects. *J Cell Biochem* 117: 2570–2582
65. Verkerk AO, van Ginneken AC, Berecki G, den Ruijter HM, Schumacher CA, Veldkamp MW, Baartscheer A, Casini S, Opthof T, Hovenier R, Fiolet JW, Zock PL, Coronel R (2006) Incorporated sarcolemmal fish oil fatty acids shorten pig ventricular action potentials. *Cardiovasc Res* 70:509–520
66. Den Ruijter HM, Verkerk AO, Berecki G, Bakker D, van Ginneken AC, Coronel R (2006) Dietary fish oil reduces the occurrence of early afterdepolarizations in pig ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 41:914–917
67. Nair SS, Leitch J, Garg ML (2000) Suppression of inositol phosphate release by cardiac myocytes isolated from fish oil-fed pigs. *Mol Cell Biochem* 215:57–64
68. Belevych AE, Ho HT, Terentyeva R, Bonilla IM, Terentyev D, Carnes CA, Gyorko S, Billman GE (2013) Dietary omega-3 fatty acids promote arrhythmogenic remodeling of cellular Ca^{2+} handling in a postinfarction model of sudden cardiac death. *PLoS One* 8:e78414
69. Bonilla IM, Nishijima Y, Vargas-Pinto P, Baine SH, Sridhar A, Li C, Billman GE, Carnes CA (2016) Chronic omega-3 polyunsaturated fatty acid treatment variably affects cellular repolarization in a healed post-MI arrhythmia model. *Front Physiol* 7:225
70. Billman GE (2013) The effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids on cardiac rhythm: a critical reassessment. *Pharmacol Therap* 140:53–80
71. Manche A, Edmondson SJ, Hearse DJ (1995) Dynamics of early postischemic myocardial functional recovery. Evidence of reperfusion-induced injury? *Circulation* 92:526–534
72. Tavazzi L, Maggioni AP, Marchioli R, Barlera S, Franzosi MG, Latini R, Lucci D, Nicolosi GL, Porcu M, Tognoni G (2008) Effect of n-3 polyunsaturated fatty acids in patients with chronic heart failure (the GISSI-HF trial): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 372:1223–1230

Annexe 2 : Liste des techniques acquises au cours de la thèse

➤ Expérimentation animale :

- Habilitation à l'expérimentation animale niveau concepteur et réalisateur de procédures expérimentales chez les rongeurs et les lagomorphes (ex niveau 1) obtenue le 23 juin 2017.
- Prélèvements sanguins et de tissus chez le rongeur.

➤ Etude de la fonction cardiaque :

- Mesure de la fonction cardiaque et de la réactivité coronaire *ex vivo* par le système de cœur isolé perfusé selon la méthode de Langendorff.
- Evaluation des pressions intracardiaque et aortique *in vivo* par une sonde de pression Millar.

➤ Etude de la fonction mitochondriale :

- Extraction et isolement de mitochondries cardiaques fonctionnelles de rats et de tissu atrial humain.
- Mesure de la respiration mitochondriale par oxygraphie.
- Evaluation de la libération mitochondriale de ROS par fluorimétrie.
- Analyse de la production d'ATP par bioluminescence.

➤ Etude des lipides :

- Extraction des phospholipides et des lipides neutres pour une analyse de leur composition en acides gras par chromatographie en phase gazeuse.

➤ Analyses biochimiques et biomoléculaires :

- Design d'amorces et RT-qPCR.
- Western-blot.