



Université de Montréal

**Effet des acides gras polyinsaturés EPA et DHA dans un  
modèle d'infarctus du myocarde**

par  
Ness Madingou

Département de pharmacologie  
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès Sciences  
en Pharmacologie

Novembre 2015

© Ness Madingou, 2015

Université de Montréal

Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Effet des acides gras polyinsaturés EPA et DHA dans un modèle d'infarctus du  
myocarde

Présenté par :

Ness Madingou

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Martin Sirois, président-rapporteur

Guy Rousseau, directeur de recherche

Vincent Jacquemet, membre du jury

## **Résumé :**

Plusieurs études montrent que les acides gras (AG) oméga-3 sont bénéfiques pour la santé cardiovasculaire. Une étude antérieure dans notre laboratoire a montré que l'administration des acides gras oméga-3 réduit la taille de l'infarctus du myocarde (IM). Cependant, la question demeure de savoir si les deux principaux acides gras oméga-3 à longue chaîne, l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA) possèdent la même efficacité à réduire la taille de l'infarctus. Le but de ce projet sera de déterminer l'efficacité relative de chacun de ces acides gras oméga-3 à protéger le cœur dans un modèle d'ischémie/reperfusion et d'étudier certaines voies de cardioprotection.

Des rats mâles adultes Sprague-Dawley ont été nourris pendant 14 jours avec une diète comprenant l'un: 1- aucun AG oméga-3; 2- 5 g d'EPA / kg de nourriture; 3- 5 g de DHA / kg de nourriture; 4- 2,5 g de chaque oméga-3 AG / kg de nourriture; 5- 5 g chaque AG oméga-3 / kg de nourriture. Par la suite, les animaux ont été soumis à une ischémie pendant 40 minutes, causée par l'occlusion de l'artère coronaire gauche descendante. Au bout de 24 heures de reperfusion, la taille de l'infarctus est déterminée. Dans un sous-groupe d'animaux, l'activité d'Akt et des caspase-3 sont mesurées dans la région ischémique après 30 minutes de reperfusion. Finalement, à 15 minutes de reperfusion, l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale mPTP est déterminée dans un autre sous-groupe. Les résultats indiquent que les diètes EPA ou DHA réduisent de manière significative la taille de l'infarctus par rapport à la diète sans AG oméga-3, tandis que la combinaison de deux acides gras oméga-3 n'a pas montré de diminution de la taille de l'infarctus. L'activité de la caspase-3 est réduite pour le groupe DHA puis, l'activité d'Akt est augmentée avec les diètes EPA et DHA seules. Finalement, en présence d'une diète enrichie uniquement de DHA, l'ouverture des mPTP est retardée comparativement aux autres diètes.

Une diète enrichie d'EPA ou de DHA est efficace dans la réduction de la taille de l'infarctus tandis que la combinaison de ces deux AG ne l'est pas aux concentrations utilisées. Ces résultats suggèrent qu'une nouvelle approche en matière de suppléments d'acides gras oméga-3 devrait être envisagée.

Mots-clés : Oméga-3, infarctus du myocarde, inflammation, apoptose.

**Abstract:**

Several studies show that fatty acids (FA) Omega-3 are beneficial for cardiovascular health. A previous study in our laboratory has shown that omega-3 intake AG reduced the size of the myocardial infarction. However the question remains whether the two main omega-3 long chain eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) are also effective in reducing infarct size. The purpose of this project is to determine the mechanisms by which one or other of the FA Omega-3 act to protect the myocardium.

For this purpose, Sprague-Dawley adult male rats were fed for 14 days with diets comprising one of: 1- Any FA omega-3; 2- 5 mg EPA / kg diet; 3- 5 mg DHA / kg feed; 4- 2.5 mg of each omega-3 AG / kg diet; 5- 5 mg each AG omega-3 / kg of feed. Thereafter, the animals were subjected to ischemia for 40 minutes, caused by occlusion of the left coronary artery descending. At 24 hours of reperfusion, the infarct size is determined. In a subgroup of animals, the activity of caspase-3 and the activation levels of Akt are measured in the ischemic region to 30 minutes of reperfusion. And finally at 15 minutes of reperfusion, the opening of the permeability transition pore mitochondrial mPTP is determined. The results indicate that diets EPA or DHA significantly reduce the infarct size compared to the diet without FA omega-3 while the combination of two FA omega-3 did not show reduction of the infarct size. The activity of caspase-3 is reduced to the DHA group, then AKT activity is increased with EPA and DHA diets and DHA individually confers a resistance to the opening of the pore mPTP.

EPA and DHA are individually effective in reducing infarct size while the combination of 2 FA is not at low concentrations.

Keywords: Omega-3, myocardial infarction, inflammation, caspase

# Table des matières

<b>Chapitre 1 : Infarctus du myocarde</b> .....	1
<b>1.1 Ischémie</b> .....	2
<b>1.2 Reperfusion</b> .....	5
<b>1.2.1 Lésions de Reperfusion</b> .....	6
<b>1.2.1.1 L'implication de l'oxygène</b> .....	7
<b>1.2.1.2 L'implication du calcium</b> .....	8
<b>1.2.1.3 L'implication du pore de transition de perméabilité mitochondrial (mPTP)</b> .....	8
<b>1.2.1.4 Apoptose</b> .....	9
Figure 1 : Voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose .....	13
<b>1.2.1.5 Inflammation</b> .....	14
Figure 2: Activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B .....	18
<b>1.3 Cardioprotection</b> .....	18
<b>1.3.1 Voie "Reperfusion Injury Salvage Kinase" (RISK)</b> .....	20
<b>1.3.2 Voie "Survivor Activating Factor Enhancement" (SAFE)</b> .....	22
Figure 3 : Voies de cardioprotection : RISK et SAFE .....	23
<b>Chapitre 2: Acide Gras Polyinsaturé: les Oméga-3</b> .....	24
<b>2.1 Structure et nomenclature</b> .....	25
Figure 4 : Structure et nomenclature des acides gras .....	26
<b>2.2 Métabolisme des acides gras</b> .....	27
Figure 5: Structure et synthèse d'EPA et DHA à partir de ALA .....	28
<b>2.2.1 Voie des prostaglandines</b> .....	29
<b>2.2.2 Voie des leucotriènes</b> .....	31
<b>2.3 EPA et DHA</b> .....	32
Figure 6: EPA inhibe de manière compétitive la formation de PGE2 par la COX-1 et COX-2 .....	34
<b>2.4 Maladies Cardiovasculaires</b> .....	35
<b>2.4.1 Infarctus du myocarde et oméga 3</b> .....	36
<b>Chapitre 3 : Hypothèse et objectifs</b> .....	39
<b>Chapitre 4 : Article</b> .....	40
<b>Chapitre 5 : Discussion</b> .....	62

## Liste des figures

Figure 1 : Voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose -----	13
Figure 2 : Activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B -----	18
Figure 3 : Voies de cardioprotection : RISK et SAFE -----	23
Figure 4 : Structure et nomenclature des acides gras -----	26
Figure 5 : Structure et synthèse d'EPA et DHA à partir d'ALA-----	28
Figure 6 : EPA inhibe de manière compétitive la formation de PGE <sub>2</sub> par la COX-1 et COX-2 -----	34

## **Abréviations**

AA= acide arachidonique

AG=acide gras

ALA= acide alpha-linolénique

AR= area at risk

ATP= adénosine triphosphate

COX= cyclooxygénase

DHA= acide docosahexaénoïque

DISC= death-inducing signaling complex

DR= death receptor

eNOS= synthase de l'oxyde nitrique endothéliale

EPA= acide eicosapentaénoïque

GABA= acide gamma-aminobutyrique

GC= glucocorticoïde

GR= récepteur des glucocorticoïdes

I= infarct size

IAP= facteur qui induit l'apoptose

IAP= protéines inhibitrices d'apoptose

IκB= kinase de NF-κB

IL= interleukine

IM = infarctus du myocarde

JAK= janus kinase

KO=knock out

LA= acide linoléique

LOX= lipoxygénase

LPS= lipopolysaccharide

LT= leucotriène

LV= left ventricule

MAPK= mitogen-activated protein kinase

mPTP = pore de transition de perméabilité mitochondriale

NF- $\kappa$ B = nuclear factor kappa-B  
NMDA= N-methyl-D-aspartate  
NO= oxyde nitrique  
PI3K= phosphoinositide 3-kinase  
PG= prostaglandine  
PK= protéine kinase  
PPAR= peroxisome proliferator-activated receptors  
ROS= espèce réactive d'oxygène  
TLR= toll-like receptor  
TNF= facteur de nécrose tumorale  
TNFR = récepteur du facteur de nécrose tumorale  
TX= thromboxane  
RCPG= récepteur couplé aux protéines G  
RISK= Reperfusion Injury Kinase Signalling  
SAFE= Survivor Activating Factor Enhancement  
STAT= Signal transducer and activator of transcription  
VLDL= very low density lipoprotein  
 $\omega$ -3= oméga-3  
 $\omega$ -6= oméga-6

*À ma famille qui m'a encouragée,  
à mes professeurs qui m'ont formée,  
à mon mari qui m'a supportée*

## Remerciements

*J'aimerais premièrement remercier mon directeur de recherche Guy Rousseau pour sa générosité et pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire. Cette expérience m'a donné un très bon bagage pour la suite de ma carrière. Un merci spécial pour la formation scientifique qui m'a été offerte et merci aussi de m'avoir permis de participer dans différents congrès et réunions scientifiques.*

*Un remerciement particulier pour Docteur Kim Gilbert qui m'a appris les différentes techniques utilisées dans mon projet de recherche. Merci pour tes conseils et aussi pour ton temps que tu m'as accordé.*

*Je tiens également à mentionner l'aide de mes stagiaires, Charles Prud'homme Touchette, François Trudeau, Jessica Moreau et Fanny McLaughlin qui ont grandement aidé dans l'accomplissement de ce projet. Puis, Caroline Bouchard et Louis Chiochio du service de l'animalerie du Centre de recherche de l'Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, merci pour votre soutien, vos réponses et votre aide.*

*Enfin, merci à mon entourage pour votre encouragement et la patience depuis le début dans ce parcours scolaire.*

## Chapitre 1 : Infarctus du myocarde

Le nombre de cas d'infarctus du myocarde (IM) est estimé à 70 000 chaque année au Canada, ce qui représente un événement toutes les 7 minutes [1]. La prévalence de faire un IM augmente avec l'âge et en présence de facteurs comme l'hypertension artérielle, le diabète, le tabagisme et d'autres maladies cardiovasculaires. La mort des cellules du myocarde qui s'observe durant un infarctus du myocarde survient majoritairement à la suite d'une ischémie. Le mot ischémie vient du mot grec *iskhaimos* ce qui veut dire qui arrête le sang. L'ischémie survient donc lorsqu'une ou plusieurs artères coronariennes se bouchent, privant de nutriments et d'oxygène les cardiomyocytes, ce qui nuit à leur fonctionnement. La principale cause de l'occlusion des artères coronaires est la rupture d'une plaque athéromateuse favorisant le développement d'un thrombus (caillot sanguin), obstruant ainsi la lumière du vaisseau sanguin. Les dommages causés par les premières minutes d'ischémie engendrent des lésions aux cardiomyocytes qui sont réversibles, mais qui, avec la prolongation de la durée de l'ischémie, deviennent irréversibles [2]. À plus long terme, les cellules myocardiques seront remplacées par du tissu cicatriciel non contractile.

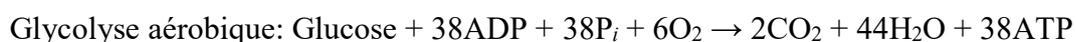
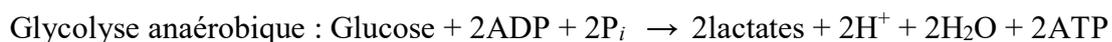
Le moyen le plus efficace pour contrer les effets délétères d'une ischémie est de retirer l'obstruction causée par un caillot sanguin en utilisant des agents thrombolytiques ou en pratiquant une angioplastie percutanée [3]. Toutefois la reperfusion des tissus engendre également des phénomènes délétères pour les cellules myocardiques, qui en atténuent son efficacité.

Au cours de ce chapitre, nous verrons les changements myocardiques associés à l'ischémie et à la reperfusion ainsi que les moyens pharmacologiques associés à la reperfusion pour réduire les dommages myocardiques.

## 1.1 Ischémie :

L'ischémie est définie par une interruption du débit sanguin dans un territoire vasculaire donné, responsable d'une inadaptation entre, d'une part, les apports en oxygène et en substrats énergétiques et, d'autre part, les besoins de la cellule pour son fonctionnement et sa survie [4]. L'occlusion brutale d'une artère coronaire entraîne donc un déséquilibre entre les besoins tissulaires en oxygène et l'apport de sang artériel. Dès les premiers instants où une partie du myocarde est ischémique, cette région passe d'un métabolisme aérobie à un métabolisme anaérobie. Les conséquences qui surviendront seront dues à l'hypoxie et au manque de substrats générés par l'ischémie, mais également à une accumulation des catabolites [3]. Si dans des conditions aérobie le cœur peut maintenir un équilibre énergétique, pendant l'ischémie, la glycolyse anaérobie ne peut satisfaire qu'une partie des besoins énergétiques du myocarde. Ce changement du métabolisme cause un déficit rapide en énergie et conduit ultimement à des dommages irréversibles du tissu [2].

Les besoins énergétiques du cœur sont très importants dus aux systèmes cellulaires ATP-dépendants et à la contractilité du muscle cardiaque nécessaires à son bon fonctionnement. Dans les conditions physiologiques, les acides gras fournissent 60 à 70% des besoins énergétiques et le glucose en fournit environ 20%. Lors de l'ischémie, l'énergie fournie provient majoritairement de la glycolyse anaérobie qui est beaucoup moins efficace pour produire l'ATP. La glycolyse anaérobie produit 2 ATP alors que la glycolyse aérobie en produit 38 telle que décrite par les équations suivantes :



En présence d'oxygène, la phosphorylation oxydative fournit l'énergie nécessaire sous forme d'ATP. Cependant dans des conditions hypoxiques, la glycolyse prend le dessus en augmentant

la vitesse de consommation du glucose. Ce changement se produit lorsque le manque d'oxygène empêche la phosphorylation oxydative de l'ATP, augmentant la quantité d'AMP (adénosine monophosphate), ce qui active l'enzyme AMPK. Cette dernière va activer la PFK-2 (*phosphofructokinase-2*) en la phosphorylant qui par la suite fera augmenter la quantité de F2-6P (fructose -2,6-biphosphate), ce qui finalement stimulera la PFK-1 et donc la glycolyse. Cette voie est beaucoup moins efficace [5]. Cependant, ce déficit en ATP conduit à des nombreuses répercussions des systèmes cellulaires dépendant de l'énergie comme : les pompes ioniques menant à une augmentation du volume cellulaire et à un influx de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) ; l'épuisement des réserves de glycogène et une accumulation d'acide lactique abaissant ainsi le pH intracellulaire ; et une réduction de la synthèse des protéines [6]. Du point de vue fonctionnel, on remarque une perte de la contractilité des cellules et des modifications de l'électrocardiogramme qui surviennent au début de l'ischémie. Morphologiquement on observe un œdème cellulaire, un gonflement des mitochondries, une dilatation du réticulum endoplasmique et la dispersion des ribosomes [7, 8]. De plus il y a une acidification tissulaire par accumulation de produits du métabolisme cellulaire (lactates), un déséquilibre ionique entre les milieux intra- et extra-cellulaire dont une augmentation du calcium intracellulaire. Ces changements peuvent être réversibles si l'occlusion est levée rapidement. Jusqu'à environ 15 à 20 minutes d'ischémie, les dommages sont réversibles; le retour du flot sanguin permet aux cardiomyocytes de retrouver leur fonction, notamment grâce aux 35% d'ATP restant encore à ce niveau d'ischémie [3]. Si l'ischémie dépasse 30 minutes, le processus de lésion myocardique irréversible débute et on observe une destruction d'un certain nombre de cellules avec libération d'enzymes [9]. Le changement de réversible à irréversible est relié à la diminution critique de la concentration des composantes de phosphate de haute énergie ou dans le changement d'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP. La diminution de phosphate de haute énergie inhibe la pompe sodium  $\text{Na}^+$ , ce qui entraîne une surcharge de calcium [7]. Il y a quelques

théories pour expliquer le début de l'irréversibilité : la perte d'énergie, une accumulation critique de calcium cellulaire et les effets délétères de la formation des radicaux libres.

Des études ont montré qu'après 40 minutes d'ischémie chez le chien, la mort cellulaire des myocytes débute d'abord dans la région sous-endocardique. Avec la prolongation de la durée de l'ischémie, cette mort cellulaire se déplace progressivement vers la région sous-épicardique : c'est ce qu'on appelle le « wavefront phenomenon ». Ce phénomène montre qu'une vague de nécrose cellulaire progresse de la région sous-endocardique vers la région sous-épicardique, les cellules sous-endocardique étant les premières à mourir [10].

La taille des lésions produite par l'occlusion dépend de plusieurs facteurs : la durée de l'ischémie, le degré d'occlusion, la taille de la zone à risque (ZR), la température, et la présence ou l'absence d'anastomose.

En ce qui concerne la durée de l'ischémie, elle influence beaucoup la taille d'infarctus, car plus celle-ci est longue, plus les risques d'avoir des lésions irréversibles augmentent. Pour le degré d'occlusion, elle peut aller de faible à complet dépendamment de la zone occluse et de la pression exercée sur l'artère. Pour ce qui est de la taille de la zone à risque (ZR) c'est-à-dire la zone du myocarde privée de l'irrigation sanguine, plus elle est grande plus la taille de l'infarctus sera grande. Quant à la température, l'hypothermie induit une chute du métabolisme et de la dépense énergétique et aurait aussi un effet propre cardioprotecteur dans les cas d'hypothermie modérée autour de 35°C. Enfin, la présence ou non d'anastomose, c'est-à-dire les vaisseaux collatéraux qui nourrissent la région ischémique, influence la taille de l'infarctus. En effet, la présence des vaisseaux collatéraux diminue les dommages causés par l'ischémie parce que la région qui était irriguée par l'artère occluse, sera tout de suite irriguée par des vaisseaux collatéraux alimentés par une autre artère. On observe cette circulation collatérale chez les patients ayant déjà un historique de maladies cardiovasculaires [11]. Elle est aussi présente chez le chien, ce qui n'est pas le cas chez le porc, le lapin et le rat. Par ailleurs, une ischémie d'une

durée de 15 minutes provoque des lésions irréversibles chez le porc et aucune lésion chez le chien suggérant que l'espèce animale est un paramètre essentiel à considérer [12].

## **1.2 Reperfusion :**

La reperfusion est la phase durant laquelle il y a un retour du flot sanguin et la réoxygénation du tissu cardiaque dans les régions ischémiques. En clinique, l'occlusion peut être levée par l'injection d'agents thrombolytiques, par l'angioplastie percutanée ou à l'aide d'un pontage aortocoronarien [3]. En ce qui concerne les agents thrombolytiques, ils peuvent être administrés par voie veineuse périphérique ou intra-artérielle sélective. Par contre, l'utilisation de ces agents peut entraîner des hémorragies sévères et il y a un risque de récurrence. Pour ce qui est de l'angioplastie, qui consiste à insérer une sonde dans l'artère pour retirer le thrombus formé, elle prévient les hémorragies, mais il peut y avoir des dommages à l'endothélium dû au gonflement du ballon. Enfin pour ce qui a rapport au pontage, c'est une méthode qui consiste à contourner l'occlusion par l'implantation d'un vaisseau reliant l'aval et l'amont de l'occlusion. Cette technique présente moins de dommages que les deux méthodes précédentes [13]. Toutefois la restauration du débit dans l'artère par le pontage prend beaucoup plus de temps que les deux autres techniques.

Le temps entre le début de l'ischémie et l'instauration de la reperfusion est directement proportionnel à la limitation des dommages causés par l'ischémie si nous sommes dans un intervalle de 3-6 heures ou moins. Toutefois la reperfusion est associée à quelques phénomènes qui limitent son efficacité et qui participent à l'augmentation de la taille de l'infarctus. L'ensemble de ces phénomènes, que nous verrons dans les prochains paragraphes est appelé lésions de reperfusion [14].

### 1.2.1 Lésions de Reperfusion :

La reperfusion est le moyen le plus efficace pour réduire les dommages causés par l'ischémie. Par contre bien que la reperfusion soit indispensable à la survie du myocarde, celle-ci est également responsable de nombreux dommages tissulaires que l'on appelle lésions de reperfusion [14]; elle est ainsi qualifiée d'épée à double tranchant [15]. Plusieurs observations ont montré que des phénomènes présents durant la reperfusion étaient à l'origine de la mort des cardiomyocytes qui étaient encore viables auparavant. Par conséquent, les lésions de reperfusion peuvent contribuer jusqu'à 50% de la taille finale de l'infarctus du myocarde [16]. Les lésions de reperfusion ont été décrites pour la première fois par l'équipe du Dr Jennings qui avait utilisé les chiens comme modèle animal [17]. L'étude histologique réalisée sur des cœurs après une ischémie-reperfusion a montré la présence d'un œdème des cardiomyocytes associé à des contractures des myofibrilles, une perturbation des sarcolemmes et la présence de particules de phosphates et de calcium dans les mitochondries, la perte des mitochondries, une libération d'enzymes cytoplasmiques et la nécrose en bandes de contraction [17]. Les bandes de contraction se présentent en microscopie optique comme des densifications cytoplasmiques transversales s'étendant fréquemment à travers les fibres entières et localisées entre les disques intercalés [18].

Si la période d'ischémie a été de courte durée et que les lésions restent réversibles, les perturbations liées à la reperfusion sont minimales. Toutefois il est possible d'observer dans ces conditions une sidération du myocarde (*myocardial stunning*). Ce sont des perturbations mécaniques que l'on observe après la reperfusion en dépit de l'absence des lésions irréversibles et ce malgré une restauration normale du débit coronarien. De ce fait, le myocarde se rétablit quelques jours après la reperfusion et l'une des causes responsables de ce délai est le temps de récupération du taux d'ATP. En effet, l'ATP diminue pendant l'ischémie, puis ses métabolites sont aussi éliminés à travers la membrane cellulaire, par conséquent l'ATP est alors

resynthétisée par d'autres voies pendant la reperfusion, d'où le délai de récupération [19]. On assiste aussi au phénomène du « no-reflow » qui est défini par l'absence de reperfusion myocardique malgré la disparition de l'occlusion de l'artère coronaire [20]. En effet, la reperfusion accentue l'œdème tissulaire, le dysfonctionnement endothélial, l'accumulation des neutrophiles au niveau des capillaires, l'inflammation et la synthèse des radicaux libres, ce qui peut provoquer la diminution du débit sanguin dans certaines régions du myocarde [21]. Finalement, il y a les lésions létales de reperfusion qui apparaissent lors de la restauration du flux coronaire après une ischémie prolongée. Ces lésions sont responsables de la mort des cardiomyocytes durant la reperfusion, cardiomyocytes qui étaient atteints de façon réversible durant la phase ischémique [22].

#### ***1.2.1.1 L'implication de l'oxygène :***

La reperfusion réintroduit brutalement de l'oxygène en grande quantité dans une région tissulaire qui en était privée. La chaîne respiratoire mitochondriale, dont le fonctionnement est endommagé par l'ischémie, ne peut pas utiliser correctement cet excès d'oxygène et de substrats. Au lieu de synthétiser de l'ATP, la mitochondrie produit des espèces radicalaires de l'oxygène (ROS) dont l'anion superoxyde  $O_2^-$ , le radical hydroxyle  $OH^\cdot$  et le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ . La présence des électrons libres de l'anion superoxyde et du radical hydroxyle rend la molécule très instable et réactive. Aussi, il semblerait que l'expression des enzymes anti-oxydantes diminue pendant l'ischémie, et que par conséquent, ce stress oxydatif entraîne la mort des cardiomyocytes conduisant à une dysfonction cardiaque. Cet excès de ROS a des effets délétères pour le fonctionnement cellulaire. Il conduit entre autres à la peroxydation lipidique et à des lésions des membranes [23].

L'utilisation d'agents antioxydants dans le contexte d'infarctus du myocarde reperfusé n'a pas réussi à démontrer, hors de tout doute, le rôle de ces espèces radicalaires dans les lésions de reperfusion [24]. D'autres études seront nécessaires pour clarifier le rôle de ces espèces dans l'infarctus du myocarde.

#### ***1.2.1.2 L'implication du calcium :***

Lors de la reperfusion, il y a une augmentation intracellulaire brutale des ions calcium  $\text{Ca}^{2+}$  [25]. Cette augmentation est le résultat du transporteur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  qui réduit les concentrations intracellulaires des ions  $\text{H}^+$  en important les ions  $\text{Na}^+$  dans la cellule. Afin de contrebalancer l'augmentation de  $\text{Na}^+$ , l'échangeur  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$  favorise l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$ . Le calcium peut induire des lésions en provoquant la contraction soutenue des myofibrilles, ce qui fragilise le cytosquelette et peut causer la rupture de la membrane cytoplasmique [26].

#### ***1.2.1.3 L'implication du pore de transition de perméabilité mitochondrial (mPTP) :***

Le pore de transition de perméabilité mitochondrial (mPTP) joue un rôle très important dans plusieurs processus physiologiques. C'est un pore mitochondrial transitoire ayant une perméabilité très importante. Cependant, l'ouverture prolongée de ce pore entraîne une cascade d'évènements dont : un gonflement mitochondrial, un effondrement du potentiel de membrane, une libération du calcium et un découplage de la phosphorylation oxydative ce qui engendre une déplétion en ATP et la mort cellulaire [27]. Le mPTP semble être associé aux sites de contact entre la membrane interne et externe. Durant l'ischémie myocardique, le mPTP reste fermé et s'ouvre pendant les premières minutes de la reperfusion, suite à l'augmentation du flux calcique et du stress oxydatif, à la restauration du pH physiologique et à la déplétion en ATP [28]. De plus, durant les premières minutes de reperfusion, le calcium, en combinaison avec les

ROS, peut induire l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP) localisé dans la membrane interne, ce qui atténue l'efficacité de la chaîne respiratoire et induit l'affaiblissement de la membrane mitochondriale [23]. Le mPTP est un acteur critique des lésions de reperfusion et représente une cible thérapeutique importante pour optimiser la cardioprotection. La cardioprotection faisant référence à tous les mécanismes et moyens qui contribuent à la préservation du cœur en réduisant ou en prévenant les dommages dus à l'infarctus du myocarde. De plus, définir la cardioprotection comme la préservation du cœur a aussi de grandes implications théoriques, car tous mécanismes d'adaptation et de compensation qui contribuent directement ou indirectement à la préservation du myocarde sont classés comme cardioprotecteurs [29].

#### ***1.2.1.4 Apoptose:***

L'apoptose a été décrit pour la première fois par Kerr et coll. en 1972 [30]. C'est un mot grec utilisé pour décrire la chute des feuilles des arbres ou des pétales de fleurs, se référant à la morphologie particulière de la physiologie de la mort cellulaire. Le terme apoptose est souvent utilisé comme synonyme de la mort cellulaire programmée. Ce dernier étant une définition plus fonctionnelle qui implique l'activation d'un programme de mort codé dans le génome. La mort par apoptose se caractérise par le rétrécissement des cellules, la condensation nucléaire, le bourgeonnement de la membrane, la fragmentation à la membrane de corps apoptotiques et les changements de membranes qui conduisent finalement à la phagocytose des cellules affectées [31]. Les caractéristiques biochimiques associées avec l'apoptose incluent le clivage internucléosomal de l'ADN [32]; l'externalisation de la phosphatidylsérine (PS) ; et le clivage protéolytique d'un nombre de substrats intracellulaires [33]. Au niveau moléculaire, l'apoptose peut être initiée par divers signaux de stress et des perturbations métaboliques qui activeront la voie intrinsèque ou par des signaux extracellulaires (récepteur  $TNF\alpha$ , ligand Fas) qui vont plutôt

activer la voie extrinsèque de l'apoptose (voir figure 2) et déclencher la cascade des caspases à la suite de l'activation des voies intrinsèque et extrinsèque [31]. Les caspases sont un groupe de protéases à cystéine, exprimées sous forme inactive et qui, pour être activées, doivent être clivées au niveau de résidus spécifiques d'aspartate. Présentement chez l'humain 14 caspases sont répertoriées dont certaines sont dites initiatrices (caspases 2, 8, 9, 10) et d'autres effectrices (caspases 3, 6, 7) [34].

La voie intrinsèque, aussi appelée la voie régulée par BCL-2 ou mitochondriale (en référence avec le rôle joué par cette organelle), est activée par plusieurs facteurs, dont l'hypoxie, le stress oxydatif ou un manque de facteurs de croissance. La famille des protéines BCL-2 qui régule cette voie est divisée en trois classes : les protéines anti-apoptotiques dont Bcl-2 et Bcl-XL, les protéines pro-apoptotiques dont Bax et BAK, et les protéines BH-3, BIM et BID. Ces trois classes ont un domaine d'homologie (BH) qui permet de les distinguer [35]. Les protéines de la famille Bcl-2 possèdent un domaine transmembranaire qui favorise leur incorporation dans la membrane mitochondriale. Les protéines pro-apoptotiques Bax et BAK ont la capacité de former un pore intracellulaire qui peut être inhibé par les protéines anti-apoptotiques [36]. Au niveau de la mitochondrie, il peut y avoir formation du pore mPTP qui pourrait entraîner la libération du contenu mitochondrial. L'étape clé de cette voie est la libération des protéines mitochondriales dans le cytosol, due à la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe. Une des protéines cruciales pour l'activation de la voie intrinsèque est le cytochrome c. Celle-ci est normalement retrouvée dans la mitochondrie et peut être libérée lorsque la perméabilisation de la membrane mitochondriale le permet. Le cytochrome c qui se retrouve alors dans le cytoplasme peut lier la protéine adaptatrice Apaf-1 et cette liaison induit un changement conformationnel d'Apaf-1 qui lui permet de se lier au dATP et de former le complexe oligomère appelé apoptosome. L'assemblage de l'apoptosome conduit au recrutement de la caspase initiatrice, la procaspase-9 [37]. L'étape suivante est l'activation de

la caspase-9 et -3 [38]. La caspase-9, recrutée dans l'apoptosome, se dimérise et s'active à la suite d'un changement conformationnel. Elle fait partie des caspases initiatrices qui possèdent un long pro-domaine leur permettant de s'associer à leur activateur spécifique et à d'autres caspases. De plus, la caspase-9 clive les caspases effectrices 3, 6 et 7. Celles-ci dégradent les composantes cellulaires et activent d'autres caspases entraînant une dégradation complète de la cellule et la formation de corps apoptotiques [34, 39]. Outre le cytochrome c, il y a d'autres protéines mitochondriales qui sont libérées à la suite d'un stimulus dans le cytoplasme comme Smac/DIABLO, Omi/HtrA2, EndoG et AIF (Apoptosis inducing factor). Dans les conditions physiologiques, les inhibiteurs de l'apoptose (IAP), séquestrent les caspases activées pour empêcher le déclenchement de l'apoptose. Par contre, l'inhibition des caspases peut être levée lorsque Smac/DIABLO se lie aux IAP, et ce lorsque la voie intrinsèque est activée et que la perméabilité mitochondriale est suffisamment réduite pour libérer un ensemble de protéines [40]. Pour ce qui est d'EndoG et de l'AIF, ils induisent la mort cellulaire par apoptose via une autre voie indépendante de celle des caspases, et qui favorisent la fragmentation de l'ADN. Enfin Omi/HtrA2, en plus d'inhiber également les IAPs, peut les dégrader [41, 42].

La voie extrinsèque est activée par des signaux extracellulaires. Les récepteurs de la famille TNF-R (tumor necrosis factor receptor) sont des récepteurs de mort qui perçoivent les signaux pro-apoptotiques de l'espace extracellulaire vers le milieu intracellulaire. Cette famille de récepteur est composée de six membres dont TNF-R1, Fas, DR (death receptor) 3, DR4, DR5 et DR6 qui ont en commun un domaine extracellulaire riche en cystéine, requis pour la liaison du ligand et un domaine de mort intracellulaire (DD) nécessaire pour la transmission du signal apoptotique. Par ailleurs, les ligands pour ces récepteurs font partie de la famille des cytokines appelées la famille TNF composé de TNF- $\alpha$ , de la lymphotoxine (LT $\alpha$ ), du Fas-ligand (Fas-L), de l'Apo3-Ligand (Apo-3-L) et de TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing ligand). La liaison de ces ligands entraîne une trimérisation de leur récepteur membranaire, puis au

recrutement de protéines adaptatrices dont TRADD et FADD via le domaine DD des récepteurs. Celles-ci recruteront les initiateurs apoptotiques, la procaspase 8 et pro-caspase-3; le tout va former le complexe pro-apoptotique DISC (death inducing signaling complex). Par un changement de conformation, la caspase-8 sera activée, puis les caspases effectrices le seront pour conduire à l'aboutissement de l'apoptose [43]. La caspase-8 clive la protéine Bid qui était présente sous forme inactive dans le cytosol et celle-ci devient active. Après son clivage, le fragment COOH de Bid se dirige vers la mitochondrie et entraîne une libération du cytochrome c via un pore, ce qui conduit la cellule en apoptose. En plus des IAP qui inhibent les caspases, les protéines FLIP ont été montrées inhibitrices de la voie extrinsèque en liant le complexe DISC et en inhibant l'activation de la caspase-8 [44] (voir figure 1).

L'apoptose est dépendante de l'énergie tandis que la nécrose ne nécessite pas d'énergie pour survenir; les stimuli qui induisent l'apoptose en présence d'énergie conduisent à la nécrose en absence d'énergie en raison de la faible disponibilité de l'ATP cellulaire [45]. Ainsi une période prolongée d'ischémie mène à une augmentation de la nécrose tandis que la reperfusion favorise l'apoptose [31].

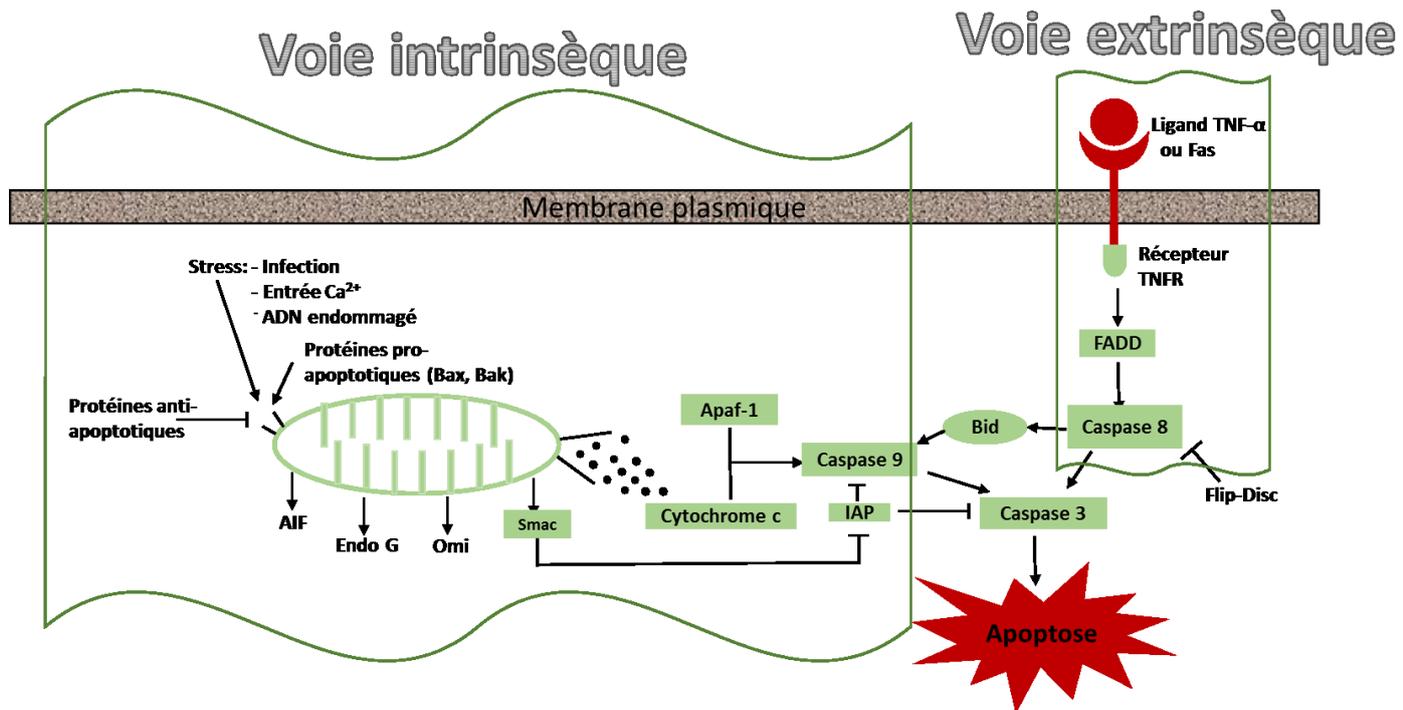


Figure 1 : Voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose. L'activation de la voie intrinsèque entraîne le relâchement du cytochrome c de la mitochondrie qui en présence de la protéine Apaf-1 active la caspase-9, initiatrice de l'apoptose, puis la caspase-3, effectrice de l'apoptose. Le tout est régulé par les protéines de la famille BCL et les facteurs AIF, l'endonucléase G, Omi et Smac, tandis qu'IAP vient inhiber l'apoptose. La voie extrinsèque s'active par la signalisation d'un récepteur de mort cellulaire lors de la liaison de son ligand, ce qui entrainera une activation de la caspase-8 via un facteur FADD, puis de la caspase-3 ou encore par Bid qui engendra l'apoptose par le sentier mitochondrial, ce qui fait que les 2 voies peuvent communiquer entre elles. La protéine Flip en se liant à Disc inhibe l'activation de la caspase-8. (Figure adaptée de FDP Virologie. 2015) [46].

### ***1.2.1.5 Inflammation :***

Une ischémie prolongée induit une réponse inflammatoire et cette inflammation est accélérée et augmentée lorsque le tissu ischémique est reperfusé. Hill et Ward [47] ont été les premiers à démontrer que les dommages ischémiques du myocarde peuvent activer la cascade du complément dans un modèle d'infarctus du myocarde chez le rat. Le système du complément a longtemps été reconnu comme un médiateur important de la défense immunitaire innée et inflammatoire. Son principal effet biologique est de fournir une défense à l'hôte contre l'infection microbienne grâce à la reconnaissance de l'agent pathogène et de l'opsonisation. De plus, le système de complément comprend trois voies : La voie classique, la voie alternative et la voie de la lectine. La protéine C réactive (CRP) semble être impliquée dans la voie classique lors de la reperfusion. Ce système du complément est principalement composé de neuf protéines (C1 à C9). Les précurseurs zymogènes des protéines circulent sous forme inactive et sont activés localement par les débris cellulaires qui lient le C1q activant le C1, C4, C2 et C3. Par la suite, les effecteurs C5 à C9 seront activés et permettront le recrutement des cellules inflammatoires plus particulièrement les neutrophiles [48]. Par ailleurs, bloquer l'activation du système du complément pendant un infarctus semble être cardioprotecteur [49]. Ce blocage peut s'effectuer par l'inhibition induite par les anticorps individuels des composantes du complément ou par l'infusion des composantes du complément modifiées tel que la forme soluble du récepteur de type 1 du complément. Il a été démontré que l'administration d'un inhibiteur de C1 diminuait la taille de l'infarctus dans plusieurs modèles expérimentaux d'occlusion coronaire et de reperfusion [50, 51]. Par exemple, l'infusion du récepteur du complément soluble humain de type 1 a significativement réduit la taille de l'infarctus chez le rat [52].

Les preuves suggèrent que les voies médiées du récepteur Toll-like (TLR), la cascade du complément et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) jouent un rôle important dans le

déclenchement de la réponse inflammatoire post-infarctus en activant le facteur nucléaire du système NF- $\kappa$ B. Les TLRs sont une famille de récepteurs qui reconnaissent des motifs moléculaires particuliers qui sont associés avec des pathogènes, et lors de la liaison de leurs ligands induisent l'activation de diverses kinases et de NF- $\kappa$ B [52]. En outre, l'activation du système de NF- $\kappa$ B joue un rôle essentiel dans l'induction des médiateurs pro-inflammatoires dans le myocarde ischémique [53]. La forme activée la plus répandue de NF- $\kappa$ B est un hétérodimère constitué des sous-unités p50 ou p52 et p65, et qui contient les domaines de transactivation nécessaire à l'induction du gène. NF- $\kappa$ B régule plusieurs gènes incluant ceux qui sont impliqués dans la réponse inflammatoire, l'adhésion cellulaire et le contrôle de la croissance. Dans les cellules au repos, le dimère NF- $\kappa$ B réside dans le cytoplasme sous forme inactive associé aux protéines de régulation appelées inhibiteurs de  $\kappa$ B (I $\kappa$ B) dont les plus importants sont I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , et I $\kappa$ B $\epsilon$ . Lors de la stimulation, I $\kappa$ B est phosphorylé, ubiquitinylé et finalement dégradé par clivage protéolytique par le système de protéasome. La libération du dimère NF- $\kappa$ B du complexe NF- $\kappa$ B-I $\kappa$ B active NF- $\kappa$ B, qui transloque dans le noyau et se lie à des promoteurs ou activateurs de régions des gènes cibles, ce qui initie la transcription [52] (figure 2). De même, l'activation de NF- $\kappa$ B a été démontrée dans plusieurs modèles d'ischémie-reperfusion myocardique. Au cours d'une expérience in vivo qui consiste à forcer NF- $\kappa$ B à se lier au facteur de transcription qui bloque l'activation du gène inflammatoire, il a été observé une diminution de l'ampleur de l'infarctus du myocarde après reperfusion suggérant un rôle crucial de NF- $\kappa$ B dans la régulation de la réponse inflammatoire post-infarctus [52]. Bien que l'activation de NF- $\kappa$ B joue un rôle préjudiciable dans le cœur infarci, d'autres chercheurs contredisent ces résultats. En effet, il a été suggéré que l'activation de NF- $\kappa$ B dans les leucocytes au cours de la phase de la résolution du processus inflammatoire se traduit par une sur-régulation des gènes anti-inflammatoires et induit l'apoptose [54]. Ainsi, l'activation de la cascade de signalisation de NF- $\kappa$ B dans un cœur infarci implique divers types de cellules et

affecte plusieurs processus parallèles avec un rôle essentiel dans les lésions cardiaques et la réparation.

De plus, l'activation du complément, les ROS et l'activation de NF- $\kappa$ B stimulent fortement la synthèse d'ARNm de cytokines, ce qui entraîne une sur-régulation des cytokines dans la zone infarctée. Parmi ces cytokines on trouve TNF- $\alpha$  et les interleukines (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8). Pour sa part, TNF- $\alpha$  présente deux facettes : il peut être soit cardioprotecteur ou néfaste. En effet, une étude a démontré que des souris knockout de TNF- $\alpha$  sont protégées de rupture d'anévrisme et de dysfonction chronique après un infarctus, et présentaient une légère inflammation [55]. D'un autre côté, l'inhibition de TNF- $\alpha$  par thérapie génique avec un récepteur TNF soluble a eu des effets délétères chez un modèle de souris avec infarctus [56]. Ces rôles contradictoires pourraient être dus à la double signalisation de cette cytokine via les récepteurs de type 1 (TNFR1) et de type 2 (TNFR2). Les résultats du chercheur Yoshiya et de son équipe [57] indiquent que l'inhibition des voies médiées par TNFR1 atténue la dysfonction ventriculaire et améliore la survie post-infarctus tandis que l'inhibition des voies médiées par TNFR2 aggrave la dysfonction ventriculaire et remodèle avec une sur-régulation de TNFR1 dans le myocarde non infarcté. Ceci dit, il est préférable d'inhiber TNFR1 entraînant des effets bénéfiques plutôt que d'inhiber TNFR2. Ces résultats soutiennent l'hypothèse que le TNF- $\alpha$  joue un rôle protecteur dans l'IM par des voies médiées par TNFR2. Par conséquent, le blocage sélectif de TNFR1 peut être une intervention thérapeutique souhaitable pour l'IM, donc la signalisation par le premier serait plutôt néfaste, tandis que le second serait protecteur [57]. Le TNF- $\alpha$ , tout comme l'IL-1, stimulent l'expression de cytokines pro-inflammatoires, des chémokines, des molécules d'adhésion et sont impliqués dans le remodelage cardiaque post-infarctus. L'IL-6 entraîne une hypertrophie cardiaque à la suite de l'IM, et l'IL-8 participe au recrutement des neutrophiles dans le myocarde ischémié et reperfusé [58].

Pendant la reperfusion, la quantité de neutrophiles augmente beaucoup plus qu'en période d'ischémie [59]. L'accumulation des neutrophiles atteint un premier pic vers la sixième heure de reperfusion et un 2<sup>e</sup> pic 24 heures plus tard. Les médiateurs pro-inflammatoires augmentent l'accumulation des neutrophiles [59]. L'infiltration des neutrophiles génère des radicaux libres et libère des enzymes qui contribuent à l'élimination des cardiomyocytes morts et leurs débris en les phagocytant. Par contre, au cours des vingt dernières années les preuves expérimentales suggèrent que les neutrophiles peuvent directement induire des dommages aux cellules du parenchyme par la libération des produits toxiques spécifiques [59]. Ils relâchent aussi le contenu de leurs granules azurophiliques qui peuvent contribuer aux lésions de reperfusion en dégradant les membranes. Ces substances sont relâchées quasi exclusivement par les neutrophiles liés aux cardiomyocytes. De plus, il a été suggéré qu'en plus du dégagement de la plaie à partir de cellules mortes et des débris, les neutrophiles peuvent jouer un rôle direct dans la cicatrisation des plaies en sécrétant des cytokines et des facteurs de croissance [52].

En dépit du fait que la réponse inflammatoire soit probablement responsable en partie des lésions de reperfusion, une phase inflammatoire est nécessaire pour le processus de guérison. Par contre, cette réponse inflammatoire doit être transitoire, rester locale et se résoudre, sinon, une activation soutenue sera à l'origine des lésions additionnelles, contribuant à une augmentation de la taille de l'infarctus.

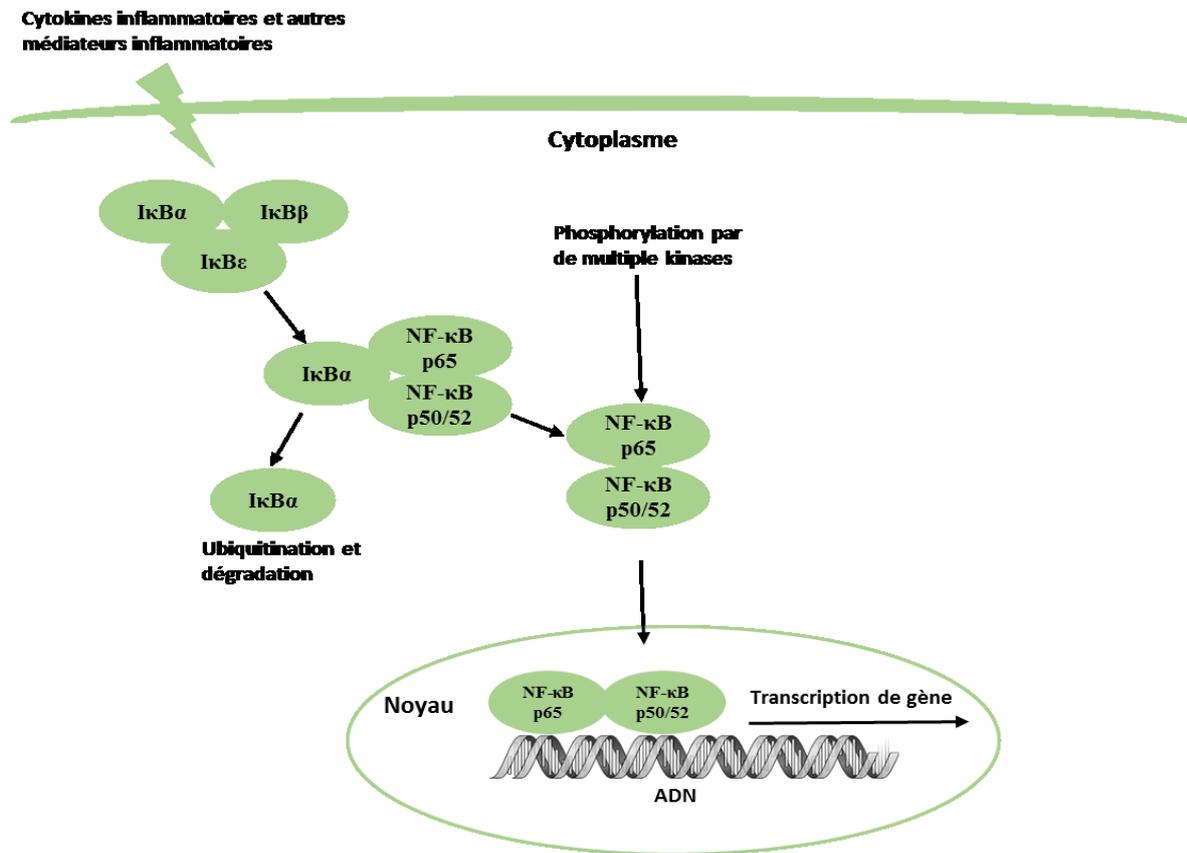


Figure 2: Activation du facteur de transcription NF-κB. NF-κB réside dans le cytoplasme sous forme inactivé. La stimulation de IκB par phosphorylation et ubiquitination favorise la libération du dimère NF-κB du complexe NF-κB–IκB, ce qui active NF-κB, puis se transloque dans le noyau et se lie à des promoteurs ou activateurs de régions des gènes cibles, ce qui initie la transcription.

### 1.3 Cardioprotection :

Le terme cardioprotection fait référence à la protection du cœur contre les effets néfastes de l'IM. La cardioprotection inclut tous les mécanismes et moyens qui contribuent à la préservation du cœur en réduisant ou même en prévenant les dommages au myocarde [29]. L'un des mécanismes les plus puissants pour protéger le myocarde avant l'occlusion d'une artère coronaire est le préconditionnement ischémique, un important phénomène de cardioprotection

qui a été décrit pour la première fois par Murry et al. en 1986 [60]. L'expérience consistait à induire des brèves occlusions coronariennes avant une occlusion prolongée et ceci réduisait de façon importante la taille de l'infarctus. En effet, le fait de rendre le myocarde brièvement ischémique induit une protection endogène qui s'exprime lors d'une ischémie prolongée consécutive. C'est ce qu'on appelle préconditionnement. En réalité c'est comme si le myocarde était averti (par une première agression) d'une agression subséquente, ce qui déclenche des mécanismes de défense qui le rendent capable de mieux tolérer une prochaine agression [60].

Expérimentalement, le préconditionnement est le phénomène connu comme étant le plus puissant pour limiter la taille de l'IM. Peu de temps après cette découverte, cette méthode présentait des limites étant donné que les patients subissant un infarctus du myocarde sont pris en charge après que l'occlusion se soit déjà installée [4]. Puisque le préconditionnement présentait quelques limites, le postconditionnement a donc été imaginé [61]. Dans un modèle d'infarctus chez le chien, la réalisation des brefs épisodes d'ischémie-reperfusion (clampage/déclampage coronaire) à la fin d'une occlusion coronaire prolongée réduit la taille de l'infarctus de manière comparable au préconditionnement; c'est ce qu'il a été appelé le postconditionnement [4]. La présence d'un pré ou postconditionnement a révélé une réduction de la taille de l'infarctus, une préservation de la fonction endothéliale vasculaire, une diminution de l'accumulation et une activation polymorphonucléaire des neutrophiles, une diminution de la surcharge calcique, un retard de la restauration du pH neutre et une réduction d'apoptose [25]. Ces effets bénéfiques semblent être dus à l'activation de voies de signalisation, qui impliquent différentes enzymes de survie et donc les principales voies ont été nommées : *Reperfusion Injury Salvage Kinase* (RISK) [62] ou *Survivor Activating Factor Enhancement* (SAFE) [63] (figure 3).

### 1.3.1 Voie “Reperfusion Injury Salvage Kinase” (RISK)

En 2002, Yellon et des co-auteurs ont introduit le concept d'une voie de signalisation de reperfusion « pro-survie » [64]. Ils ont démontré dans une étude examinant l'effet de l'urocortine que p42/44 (Erk ½), un membre des MAPK (mitogen-activated protein kinase) est important pour le mécanisme de survie contre les lésions de reperfusion. Ils ont suggéré que le cœur pouvait être protégé par une cascade d'activation d'enzymes qu'ils ont nommés la voie RISK. Les auteurs sont allés encore plus loin dans l'étude et ont démontré que l'activation pharmacologique des kinases pro-survies au début de la reperfusion réduit la taille de l'infarctus de 40-50% [65]. Cette voie implique principalement les protéines kinases Akt et Erk ½. L'activation d'Akt et d'Erk ½ serait causée par une libération de ligands endogènes suivant l'ischémie dont l'adénosine, les opioïdes, la bradykinine et par la liaison respective de ces ligands à leurs récepteurs couplés aux protéines G [66]. Par la suite, d'autres kinases ont été impliquées dans la voie RISK comme la protéine kinase C (PKC : l'isoforme PKC-ε), PKG, p70s6K (protéine ribosomale kinase S6 de 70 kDa) et le GSK-3β (glycogen synthase kinase 3) qui confèrent une cardioprotection. Par contre PKC-δ et rho-kinase inhibent la voie RISK [62].

Malgré leur postulat de départ comme médiateur de protection anti-apoptotique, des études ont révélé que l'activation pharmacologique de la voie RISK à la reperfusion protège contre la mort cellulaire par apoptose et par nécrose, comme en témoigne la réduction de la taille de l'infarctus. Akt favorise la survie cellulaire et prévient l'apoptose [67]. Plusieurs cibles en aval de Akt incluant GSK-3, Bad, caspase 9, et les facteurs de transcription comme CREB, FKHRL1 et NF-κB ont été identifiés comme des mécanismes possibles par lesquelles Akt favorise la survie cellulaire et bloque l'apoptose. À ce propos, Akt peut aussi phosphoryler la pro-caspase-9, inhibant ainsi son activité et l'apoptose. De plus, Akt agit également en inhibant le changement conformationnel de Bax et sa translocation dans les mitochondries, empêchant ainsi les

altérations au niveau de potentiel de la membrane mitochondriale, la libération du cytochrome c, l'activation de caspase et l'apoptose [67]. L'activation du récepteur A2A de l'adénosine au moment de la reperfusion contribue également à une diminution de la taille d'un infarctus via la voie PI3K (phosphoinositide 3- kinase)-Akt et de par une diminution de l'activation de la caspase 3 [68].

Comme mentionné précédemment, l'ouverture du mPTP survient pendant la reperfusion et favorise la mort cellulaire. Cependant, l'activation de la voie RISK inhibe l'ouverture de ce pore, ce qui confère une cardioprotection à la cellule. Par contre, le mécanisme par lequel la voie RISK inhibe l'ouverture du mPTP n'est pas encore bien établi, mais voici quelques hypothèses :

- ✓ L'implication directe de la GSK-3 $\beta$  dans l'inhibition de l'ouverture du mPTP
- ✓ eNOS (synthase de l'oxyde nitrique endothéliale), un effecteur de la voie RISK peut inhiber l'ouverture du mPTP via l'activation de la voie PKG/PKC $\epsilon$ /canaux K<sup>+</sup> ATP ou par la génération de l'oxyde nitrique (NO)
- ✓ l'inhibition de la translocation de Bax dans la mitochondrie ou via l'activation de l'hexokinase mitochondriale peut inhiber l'ouverture du mPTP
- ✓ l'amélioration du flux calcique au niveau du réticulum sarcoplasmique peut entraîner une inhibition de l'ouverture du mPTP [69, 70].

L'activation pharmacologique de la voie RISK pendant la reperfusion par des facteurs de croissance ou d'autres agents induit la cardioprotection par la phosphorylation des plusieurs effecteurs en aval comme p70S6k, eNOS, Bad et GSK3 $\beta$ , qui sont également impliquées dans la cardioprotection.

L'insuline-like growth factor-1 diminue la taille de l'infarctus lorsque surexprimé au moment de la reperfusion et la cardiotrophine-1 inhibe la mort par apoptose des cardiomyocytes par l'activation des MAPK [69]. PKC et Akt sont impliqués dans la cardioprotection de

l'érythropoïétine lorsque donnée au moment de la reperfusion [71]. Les voies MAPK et PI3K/Akt confèrent une cardioprotection en activant les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) par l'urocortine, l'adénosine et l'adrénomédulline.

### **1.3.2 Voie "Survivor Activating Factor Enhancement" (SAFE)**

La voie SAFE implique l'activation de STAT-3 (signal transducer and activator transcription 3) via possiblement le TNF- $\alpha$  [63]. Comme mentionné précédemment, TNF- $\alpha$  peut occasionner des lésions via l'interaction avec son récepteur TNFR1. Par contre, le 2<sup>e</sup> récepteur de TNF- $\alpha$  qui est TNFR2 favorise la cardioprotection. Des études ont montré que les souris knockout pour les deux récepteurs entraînent une augmentation de la taille de l'infarctus, ce qui démontre un certain rôle protecteur de cette cytokine [72]. Une autre étude a isolé les cœurs des souris génétiquement déficients pour le récepteur TNFR2, la cardioprotection était inhibée alors qu'elle était maintenue en cas de déficience pour le récepteur de type 1 [73]. TNF- $\alpha$  serait donc impliqué dans une voie de cardioprotection de par l'activation de la voie JAK (Janus kinase)/STAT-3 (Signal transducer and activator of transcription 3) [73]. L'activation de STAT-3 après un IM aigu a été démontrée pour la première fois en 2001, quand l'augmentation de la phosphorylation de STAT-3 a été observée jusqu'à 24 h après la ligature de l'artère coronaire gauche de rats [74]. Un fait intéressant, l'administration de l'inhibiteur de la voie de JAK / STAT-3, AG490, supprime la phosphorylation de STAT-3 et entraîne un plus grand nombre de cellules apoptotiques, ce qui suggère donc un rôle protecteur de STAT-3 dans l'ischémie [74]. Cependant, STAT-3 est activé après phosphorylation de JAK suivant la liaison d'un ligand au récepteur [75]. Ainsi, la liaison de TNF- $\alpha$  sur son récepteur TNFR-2 permet la dimérisation de STAT-3 et sa translocation au noyau. Il a été démontré que l'inhibition de la voie JAK/STAT augmente les dommages lors d'un IM [76]. Les mécanismes connus par lesquels STAT-3 favorise la cardioprotection sont l'augmentation de l'expression des protéines

anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-Xl, Mcl-1 et Fas), la diminution de l'expression des protéines pro-apoptotiques (Bax) et l'inactivation de Bad. Il faut noter que STAT-3 active ou inactive les protéines le plus souvent par phosphorylation ou déphosphorylation [73].

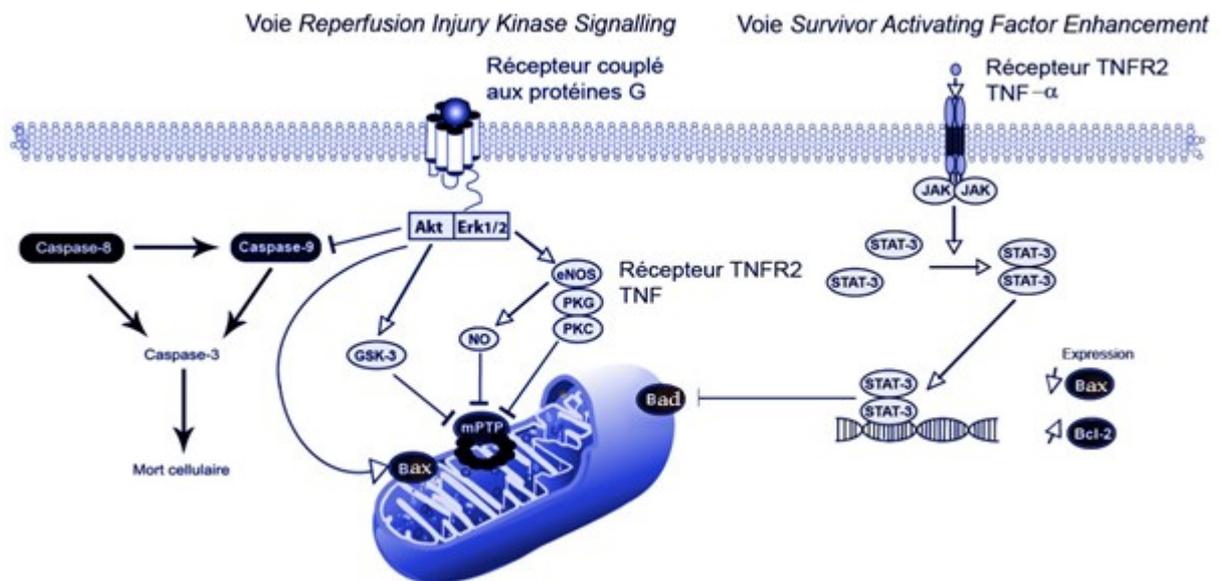


Figure 3 : Voies de cardioprotection : RISK et SAFE. L'activation des kinases Akt et Erk1/2 dans la voie RISK par des récepteurs couplés aux protéines G inhibe l'ouverture du pore mPTP. Aussi, la liaison de TNF- $\alpha$  à son récepteur TNFR-2 active la voie SAFE en modifiant l'expression des protéines apoptotiques Bad, Bax et anti-apoptotique Bcl-2 via la dimérisation de STAT-3.

En résumé, l'ischémie crée des dommages au niveau de la cellule dépendamment du temps d'occlusion de l'artère. Bien que la reperfusion soit le meilleur moyen pour pallier aux dommages de l'ischémie, cette dernière entraîne aussi certains dommages aux cellules. C'est donc par des techniques de cardioprotection que nous pouvons réduire ces dommages. Alors, dans cette étude, nous avons choisi une approche nutritionnelle : la prise des oméga-3 qui permet d'activer certaines voies de cardioprotection et ainsi de protéger le cœur.

## Chapitre 2: Acide Gras Polyinsaturé: les Oméga-3

Les acides gras (AG) sont des acides carboxyliques à chaîne aliphatique hydrophobe. Ils sont dits insaturés ou saturés en fonction de la présence ou non d'une double liaison. En présence de plusieurs doubles liaisons ils sont appelés polyinsaturés alors qu'en présence d'une seule double liaison ils sont appelés monoinsaturés. On différencie les AG par le nombre d'atomes de carbone qu'ils possèdent et également par la structure conférée par les liaisons doubles [77] comme nous le verrons un peu plus loin. On retrouve plusieurs acides gras insaturés comme les oméga-3 ( $\omega$ -3), oméga-6 ( $\omega$ -6), oméga-7 ( $\omega$ -7) et oméga-9 ( $\omega$ -9), par contre les  $\omega$ -3 et les  $\omega$ -6 sont des acides gras polyinsaturés (AGPI). Cependant, seuls les  $\omega$ -3 et  $\omega$ -6 sont dits essentiels car ils ne sont pas synthétisés par les mammifères ; ils sont donc requis dans l'alimentation [78].

Le poisson est le principal aliment dans lequel on obtient un apport considérable des  $\omega$ -3 à longue chaîne. Les  $\omega$ -3 présents dans les poissons proviennent de leur consommation de plantes marines comme les algues et le plancton qui sont capables d'allonger et de désaturer les AG formant ainsi les longues chaînes polyinsaturées. Les poissons riches en  $\omega$ -3 sont le maquereau, le saumon, le thon rouge ou blanc, le hareng, les anchois, la sardine ou la truite [79]. Les sources végétales principales d' $\omega$ -3 sont les huiles de lin et de canola, les noix de Grenoble, les graines de lin, de chia ou de chanvre ainsi que certains légumes verts. On retrouve les  $\omega$ -6 dans les œufs, les huiles végétales, de tournesol et de sésame, dans les graisses animales. Finalement les  $\omega$ -7 et  $\omega$ -9 proviennent de l'huile de palme et de l'huile d'olive respectivement. Ils ne sont toutefois pas essentiels, car ils sont synthétisés à partir d'acétylCoA, un produit émanant du métabolisme des glucides, lipides et acides aminés [80].

## 2.1 Structure et nomenclature :

Les AG sont des acides carboxyliques à chaîne aliphatique hydrophobe, saturés ou non selon qu'ils contiennent ou pas de liaisons doubles. Ils sont notés n:m, où n représente le nombre d'atomes de carbone et m le nombre de liaisons doubles. En 1968, la commission sur la nomenclature biochimique a fixé les règles sur la nomenclature des acides gras. Il s'agit de connaître en 1<sup>er</sup> le nombre d'atomes de carbone de la molécule, dont le carbone du groupement carboxyle est toujours noté 1. Cependant, en 1978 la commission sur la nomenclature biochimique a estimé qu'il serait intéressant de réaliser une numérotation de la chaîne carbonée à partir du groupement méthyle terminal, cette dernière numérotation est qualifiée de nomenclature oméga. Ainsi, le carbone du groupement méthyle terminal est noté 1 puis les autres dans l'ordre (2,3,...). Cependant, la longueur de la chaîne carbonée permet la classification des acides gras en 4 catégories : ceux contenant 2, 3 ou 4 atomes de carbones sont des acides gras volatils, 6 à 10 atomes de carbone sont des AG à chaîne courte, 12 à 14 atomes de carbones sont des AG à chaîne moyenne et ceux à 16 atomes de carbone ou plus sont des AG à chaîne longue [77].

Les  $\omega$ -3 et  $\omega$ -6 font partis des AG à chaîne longue et comprennent de 2 à 6 liaisons doubles en position cis (du même côté). Si la première liaison double se situe entre le 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> atome de carbone à compter de l'extrémité méthyle ( $\omega$  ou n), on parle d'oméga-3 ( $\omega$ -3 ou n-3) ; si elle se situe entre le 6<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> atome de carbone à compter de l'extrémité méthyle, on parle d'oméga-6 ( $\omega$ -6 ou n-6). La longueur de la chaîne est le premier chiffre après le C et le nombre de liaison double est le second. Ainsi C18 : 2  $\omega$ -6 signifie qu'il s'agit d'un acide gras de 18 atomes de carbone avec 2 liaisons doubles, la première se situant entre le 6<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> atome de carbone à compter de l'extrémité méthyle. En outre, les seuls  $\omega$ -3 et  $\omega$ -6 essentiels sont: l'acide linoléique (LA) (C18 : 2  $\omega$ -6) et l'acide linoléique (ALA) (C18 : 3  $\omega$ -3). En effet, à partir de ces précurseurs, l'organisme peut par élongations et désaturations successives

fabriquer des AG plus longs comme l'acide arachidonique (AA) (C20 : 4  $\omega$ -6), l'acide eicosapentaénoïque ou EPA (C20 : 5  $\omega$ -3) et l'acide docosahexaénoïque ou DHA (C22 : 6  $\omega$ -3) [81].

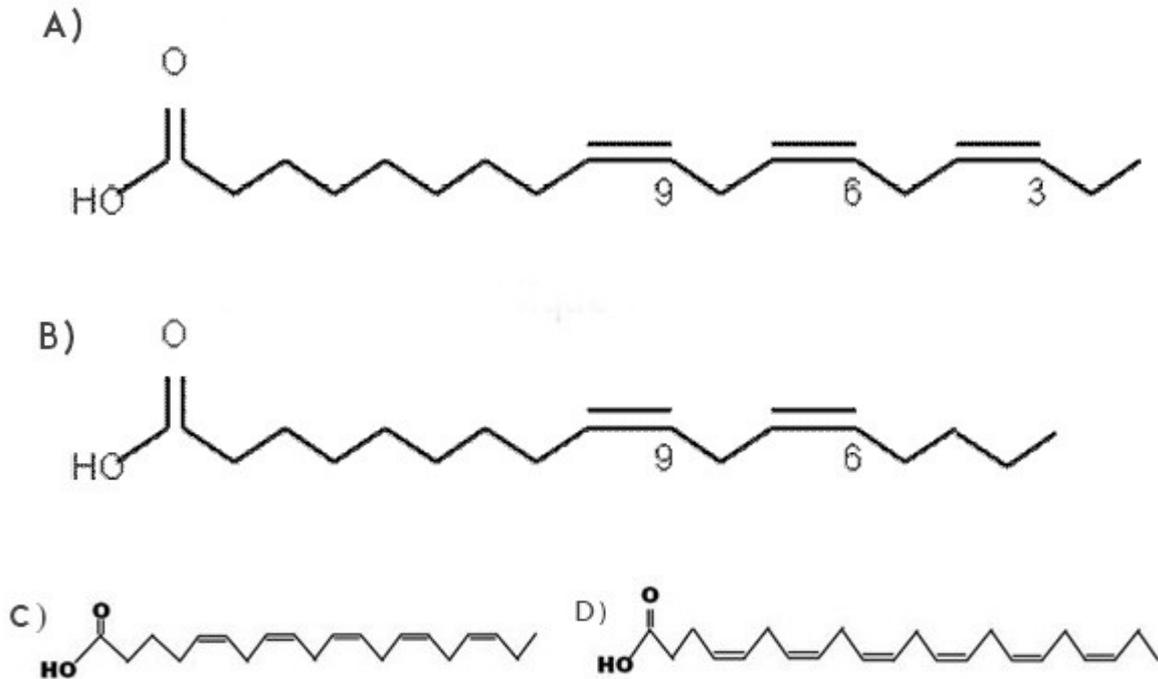


Figure 4 : Structure et nomenclature des acides gras. A) acide linoléique (LA) et B) acide linolénique (ALA). La première liaison double rencontrée à partir du carbone méthyle terminale détermine le type d'acide gras oméga. ALA contient 18 atomes de carbones et trois liaisons doubles, LA contient 18 atomes de carbones et 2 liaisons doubles. C) EPA contient 20 atomes de carbones et cinq liaisons doubles, D) DHA contient 22 atomes de carbones et six liaisons doubles.

## 2.2 Métabolisme des acides gras :

Après ingestion, les AG sont soit dégradés par  $\beta$ -oxydation pour libérer de l'énergie ou sont stockés sous forme de graisse selon les besoins énergétiques. L'oxydation des AG favorise la formation de plusieurs molécules d'ATP via la formation d'une molécule de NADH, de FADH<sub>2</sub> et d'acétyl-CoA. Le métabolisme des AG fournit deux fois plus d'énergie que le métabolisme des glucides ou des protéines à poids égal [5]. De plus, les AG font parti des composantes des membranes et sont nécessaires pour le fonctionnement de plusieurs organes, par exemple les  $\omega$ -6 sont requis pour le maintien de la perméabilité de la peau, car une déficience nutritive en cet AG entraîne des maladies de peau ou à une perte d'eau excessive par l'épiderme [82]. Une fois acquis par la diète, LA précurseur des  $\omega$ -6 et ALA des  $\omega$ -3 seront pris par la  $\Delta$ 6 désaturase qui leur ajoutera une liaison double. Cette étape permettra d'aboutir à la formation de l'acide dihomog- $\gamma$ -linoléinique (18 :3) membre des  $\omega$ -6 et à la molécule 18 :4 pour les  $\omega$ -3. Par la suite, l'élongase leur ajoute deux atomes de carbones. Une autre désaturase, la  $\Delta$ 5, vient compléter la molécule en y ajoutant une seconde liaison double afin d'obtenir pour les  $\omega$ -6 l'acide arachidonique (AA) 20 :4 et pour les  $\omega$ -3 l'acide eicosapentaénoïque 20 :5 (EPA). Pour la série d' $\omega$ -3, une étape d'élongase (24 :5), une avec la  $\Delta$ 6-désaturase (24 :6) ainsi qu'une  $\beta$ -oxydation se succèdent pour obtenir l'acide docosahexaénoïque 22 :6 (DHA) [78] (voir figure 5).

L'entrée des AG dans les voies métaboliques requiert premièrement l'hydrolyse de la liaison ester en position sn-2 des phospholipides membranaires sous l'action d'une phospholipase de type A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), ce qui libérera les AG à 20 carbones (AA et EPA), permettant leur conversion en eicosanoïdes (eicosa venant du Grec qui veut dire 20, pour dérivé d'AG à 20 carbones). Les phospholipases n'ont pas d'affinité plus grande pour l'une ou l'autre des molécules à 20 carbones. Les AG ainsi libérés peuvent emprunter deux voies métaboliques principales : la voie des cyclooxygénases générant les prostanoides (prostaglandines, prostacyclines,

thromboxanes) ou la voie de la lipoxigénase conduisant à la synthèse des acides gras hydroperoxydés et hydroxylés puis aux leucotriènes [83].

Bien que la synthèse d'ALA produise l'EPA à partir de la diète via des sources végétales, celle-ci est produite en quantité très faible chez l'humain. [79, 80]. Il est donc avantageux de consommer directement de l'EPA et du DHA produits par les phytoplanctons et acquis par l'homme dans la diète par le poisson. De plus, le corps utilise préférentiellement ces derniers [84].

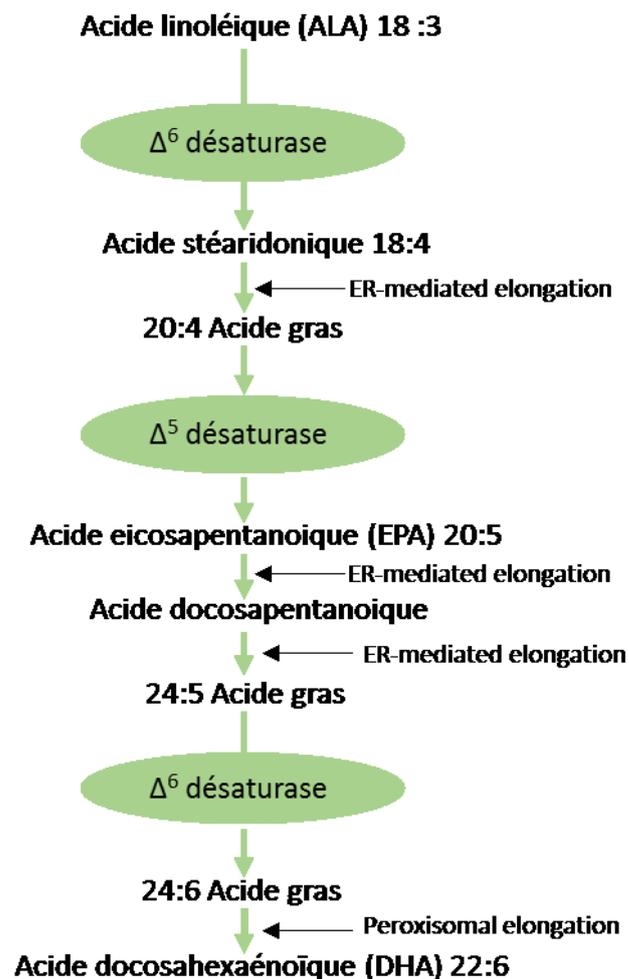


Figure 5: Structure et synthèse d'EPA et DHA à partir de ALA. La première liaison double à partir de l'extrémité méthyle (oméga : $\omega$ ) est situé sur le troisième atome de carbone ( $\omega$ -3). ALA

sous l'effet de la désaturase et de l'élongase produit l'EPA. EPA à son tour produit le DHA sous l'effet des mêmes enzymes.

### **2.2.1 Voie des prostaglandines :**

Les prostaglandines sont formées par la plupart des cellules du corps humain et agissent comme des médiateurs lipidiques autocrine et paracrine (c'est-à-dire que le signal est immédiatement ou adjacent au site de synthèse). Elles ne sont pas stockées mais sont synthétisées de nouveau par la membrane qui libère l'acide arachidonique lorsque les cellules sont activées par un traumatisme mécanique ou par une cytokine spécifique, facteur de croissance ou autres stimuli [85].

Les effets pharmacologiques des prostaglandines sont plus nombreux et diversifiés que d'autres produits du métabolisme de l'AA. Ils jouent des rôles importants dans pratiquement tous les principaux systèmes du corps [86]. En raison de leur nature évanescence du thromboxane et de prostacycline (c'est à dire qui ont des demi-vies de quelques secondes à quelques minutes), ces composés doivent agir près de leur site de synthèse [85].

Il existe une multitude de substances qui inhibent la voie de cyclooxygénase et elles sont utilisées pour traiter l'inflammation, la fièvre et la douleur. Ces composés agissent via l'inhibition de l'enzyme cyclooxygénase (COX) qui catalyse la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandine et en thromboxane. Il existe deux isoformes de la COX : une isoforme dite "constitutive" la COX-1 et une isoforme dite "inductible" la COX-2. Les deux cyclooxygénases catalysent deux réactions : la première catalyse l'addition de molécules d'oxygène à l'AA ou l'EPA, la convertissant en intermédiaire endoperoxyde PGG (activité cyclooxygénase). La seconde réalise la conversion de PGG en PGH (activité peroxydase) [80, 86]. Par ailleurs, les 2 COX sont codées par différents gènes localisés sur différents

chromosomes soit le chromosome 9 pour la COX-1 et le chromosome 1 pour la COX-2. La COX-1 est constitutivement exprimée sous les conditions basales et est responsable de la production d'eicosanoïdes tandis que les niveaux de COX-2 sont très faibles et presque indétectables dans les conditions normales, elle est donc exprimée en présence d'inflammation. Ainsi l'induction inflammatoire favorise la synthèse de prostaglandines délétères au site de l'inflammation. Cette distinction entre les effets constitutifs ou de protection de COX-1 et les effets inductifs ou inflammatoires de la COX-2 conduisent à l'hypothèse initiale selon laquelle COX-1 est toujours 'bon' et COX-2 est 'mauvais' [86].

De façon générale, l'hydroperoxyde est nécessaire pour activer les cyclooxygénases. Ces enzymes sont insérées dans les membranes du réticulum endoplasmique et nucléaire, la poche liant le substrat est orientée de façon à prendre l'AA ou l'EPA. Bien qu'elles soient codées par des gènes différents, la structure des 2 isoformes est similaire. Par contre, la séquence d'acide aminé diffère au niveau de la poche d'interaction, ce qui fait que la COX-2 a une ouverture plus grande pour le substrat, donc plus accommodant et flexible. Le substrat préférentiel des deux cyclooxygénases est l'AA, toutefois il faut presque 10 fois plus d'hydroxyperoxyde pour activer la COX-1 que la COX-2. En effet, la COX-2 peut oxygéner l'EPA sans source importante d'hydroxyperoxyde, ce qui n'est pas le cas pour la COX-1 [87].

Les prostaglandines de série 2 collectivement appelées prostanoïdes sont formées lorsque l'AA est libéré de la membrane plasmique. Il s'agit de : la thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), la prostacycline (PGI<sub>2</sub>), la prostaglandine D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>), la prostaglandine F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) et la prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). A l'opposé les prostaglandines de la série 3 sont obtenues à partir de l'EPA : thromboxane A<sub>3</sub> (TXA<sub>3</sub>), prostaglandine I<sub>3</sub> (PGI<sub>3</sub>), prostaglandine D<sub>3</sub> (PGD<sub>3</sub>), prostaglandine F<sub>3α</sub> (PGF<sub>3α</sub>) et la prostaglandine E<sub>3</sub> (PGE<sub>3</sub>) [86].

Les thromboxanes A sont produits majoritairement par les plaquettes. La TXA<sub>2</sub> stimule l'agrégation plaquettaire ainsi que la constriction des muscles lisses tandis que la TXA<sub>3</sub> semble

moins puissante que la TXA<sub>2</sub> à activer les plaquettes. Les PGI<sub>2</sub> et PGI<sub>3</sub> inhibent de façon importante l'agrégation plaquettaire et causent une vasodilatation. En ce qui concerne la PGD<sub>2</sub>, son action est davantage pro-inflammatoire et stimule la production de cytokines et contribue aussi à la migration des neutrophiles à travers les cellules endothéliales. À l'opposé, la PGD<sub>3</sub> inhibe le contrôle de la migration des leucocytes inflammatoires effectué par la PGD<sub>2</sub> de par une compétition pour les mêmes récepteurs DP1 et DP2 [88]. Pour la PGF<sub>2α</sub>, elle produit une bronchoconstriction ainsi qu'une constriction des muscles lisses. Elle cause des contractions utérines à la parturition et entraîne la régression du corpus luteum. Finalement, les prostaglandines E entraînent une multitude d'effets en interagissant avec des récepteurs distincts. La PGE<sub>2</sub> est davantage mitogénique et pro-inflammatoire que la PGE<sub>3</sub> [85, 86].

### **2.2.2 Voie des leucotriènes :**

Tout comme les cyclooxygénases, les leucotriènes sont des enzymes qui catalysent l'insertion stéréospécifique de l'oxygène moléculaire à différents niveaux de l'acide arachidonique. Les leucotriènes sont des métabolites issus des lipoxygénases 5, 12 ou 15 et le plus souvent générés par les cellules inflammatoires. L'activation de phospholipases causés par certains stimuli active par la même occasion la 5-LOX, ce qui cause sa translocation aux membranes alors qu'elle se situe normalement dans le cytosol ou dans le noyau dépendamment du type cellulaire. La 5-LOX catalyse dans un premier temps l'oxygénation de l'AA en acide 5-HPETE puis dans un deuxième temps la déshydratation de 5-HPETE en leucotriène A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>). Les leucotriènes de la série 4 sont obtenues à partir de l'AA dont les leucotriène B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>), D<sub>4</sub> (LTD<sub>4</sub>) et E<sub>4</sub> (LTE<sub>4</sub>). Par contre les leucotriènes de la série 5 sont obtenues à partir de l'EPA il s'agit de : la leucotriène B<sub>5</sub> (LTB<sub>5</sub>), C<sub>5</sub> (LTC<sub>5</sub>) et E<sub>5</sub> (LTCE<sub>5</sub>) [79, 80, 85].

La LTB<sub>4</sub> est formée à partir de la LTA<sub>4</sub> hydrolase par addition d'une molécule d'eau, alors que la LTC<sub>4</sub> est obtenu par ajout d'une molécule de glutathion. De plus, le clivage de ce glutathion

conduit à la formation du LTD<sub>4</sub>, qui sous l'action d'une enzyme donnera le métabolite final LTE<sub>4</sub> [89]. Les leucotriènes de la série 4 obtenues à partir de l'AA ont pour rôle d'augmenter la perméabilité des capillaires et via des propriétés chimiotactiques, d'attirer les neutrophiles [85]. Les lipoxines formées à partir des lipoxygénases 12 ou 15 (12-LOX et 15-LOX) et de l'AA conduisent à des métabolites anti-inflammatoires. Ils participent aussi à la résolution de l'inflammation en régulant l'infiltration leucocytaire, en diminuant la production de cytokines pro-inflammatoires et en encourageant la phagocytose. La série-5 de leucotriènes est obtenue à partir des  $\omega$ -3 (EPA) [90]. Bien qu'ils utilisent le même transporteur (diminution de l'exportation et activité), les LTC<sub>5</sub> et C<sub>4</sub> ont une puissance comparable. Par contre la LTB<sub>5</sub> est beaucoup moins puissante que la LTB<sub>4</sub> [91]. Une étude a montré que des suppléments d'huile de poisson pouvaient réduire la production des cytokines inflammatoires provenant de la série 4 des leucotriènes [92].

### **2.3 EPA et DHA**

EPA et DHA sont des acides gras  $\omega$ -3 connus respectivement sous les noms acides eicosapentaénoïque et docosahexaénoïque. L'EPA possède 20 atomes de carbone tandis que DHA en possède 22. Les acides gras libres ont été identifiés comme des ligands endogènes pour le récepteur couplé à la protéine G, GPR120 [93]. Des études récentes ont montré que de longues et courtes isoformes de GPR120 sont sensibles aux AGPI. Néanmoins, il a été émis l'hypothèse que la longueur et le degré de saturation des acides gras peuvent affecter l'efficacité, ce qui soulève la possibilité que les différences d'efficacité puissent également être observées pour l'EPA (20 atomes de carbone, 5 doubles liaisons) et le DHA (22 atomes de carbone, 6 doubles liaisons) [94]. Il est aussi possible que les interactions entre l'EPA et le DHA avec le GPR120 peut en partie expliquer la grande efficacité de DHA comparé à EPA en ce qui

concerne l'inhibition de la libération des cytokines pro-inflammatoires des macrophages humains [95].

Les glycérophospholipides (ou phospholipides) sont le composant principal de la membrane cellulaire, et comprennent des structures telles que la phosphatidylcholine et la phosphatidylsérine. L'apport alimentaire d'EPA et de DHA augmente la teneur en AGPI  $\omega$ -3 avec une réduction connexe des niveaux de l'AA. La source d' $\omega$ -3 peut affecter la mesure dans laquelle l'EPA et le DHA sont incorporés dans les phospholipides [96]. Afin de déterminer l'incorporation d'EPA et de DHA dans les membranes de phospholipides, le chercheur Judé et son équipe ont nourri les chiens avec une diète contenant une quantité plus élevée de DHA que d'EPA pendant 8 semaines [97]. Comme attendu, la concentration plasmatique de DHA était plus élevée que celle d'EPA. Cependant, malgré la diète riche en DHA, l'EPA était préférentiellement incorporé dans les phospholipides des érythrocytes et des membranes cardiaques [97]. D'autres études ont investigué l'incorporation d'EPA et de DHA dans les phospholipides chez l'homme avec une diète riche en AGPI. Ces études montrent que l'EPA est également incorporé de manière plus efficace en esters cholesteryl que le DHA, et ceci est dû à une plus grande efficacité de la lécithine-cholestérol acyltransférase (LCAT) de transférer EPA du phosphatidylcholine en ester cholesteryl [96]. Par contre le DHA a été préférentiellement incorporé dans les triglycérides servant de substrat pour le diacylglycérol acyltransférase [98, 99]. Par ailleurs, ce ne sont pas toutes les études qui obtiennent ces mêmes résultats sur le métabolisme des acides gras. En effet, la supplémentation des cochons avec de l'huile de poisson riche en EPA a mené à une incorporation préférentielle du DHA dans les phospholipides de muscle cardiaque [100].

À propos des mécanismes anti-inflammatoires que possèdent les  $\omega$ -3, l'EPA agit comme un inhibiteur compétitif pour l'acide arachidonique sur la COX, qui elle produit des eicosanoïdes pro-inflammatoires. Lorsqu'EPA est soumis à l'oxygénation par la COX il y a une faible

production de prostaglandine inflammatoire  $E_3$  ( $PGE_3$ ) tandis que l'AA entraîne une production élevée de prostaglandine pro-inflammatoire  $E_2$  ( $PGE_2$ ). Ainsi donc, comme EPA est structurellement similaire à l'AA, EPA peut faire compétition avec l'AA pour s'incorporer dans les phospholipides membranaires et devenir le substrat préférentiel pour l'activité de la COX. De ce fait, l'oxygénation de l'AA par COX est inhibée par les  $\omega$ -3 et  $PGE_3$  est généré à la place de  $PGE_2$ . Par conséquent, les AGPI agissent comme un produit anti-inflammatoire non stéroïdien qui diminue l'activité de la COX et subséquemment diminue l'inflammation [101-103].

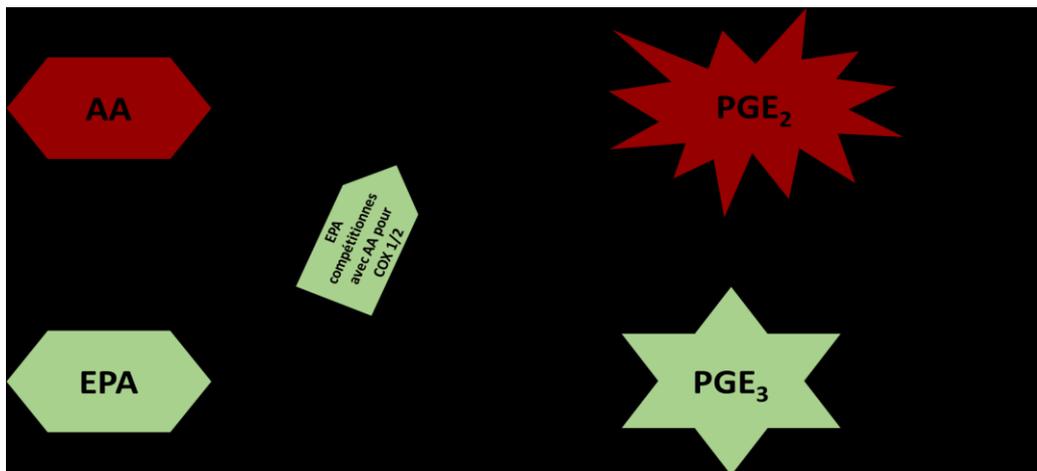


Figure 6: EPA inhibe de manière compétitive la formation de  $PGE_2$  par la COX-1 et COX-2. La liaison d'EPA avec la COX-1 et la COX-2 produit moins d'inflammation  $PGE_3$  tandis que celle de l'AA produit beaucoup d'inflammation  $PGE_2$ .

Il a été montré que l'huile de poisson peut non seulement supprimer les médiateurs pro-inflammatoires, mais peut également augmenter celles anti-inflammatoires tels que l'adiponectine [104, 105]. Les niveaux d'adiponectine accrus peuvent réduire l'inflammation et améliorer les activités métaboliques d'EPA et de DHA. L'EPA et DHA agissent par différents mécanismes dont par l'inhibition compétitive de la formation  $PGE_2$  provenant de l'AA, la

suppression de l'activation de NF- $\kappa$ B, la génération ou la sécrétion des médiateurs anti-inflammatoires (adiponectine, la résolution, et protectine), et des activités anti-inflammatoires médié par GRP120. En outre, l'EPA et le DHA sont connus pour modifier avantageusement les processus métaboliques en réduisant l'adiposité et l'augmentation de l'oxydation des lipides, contribuant ainsi les effets anti-obésité en général [106].

## **2.4 Maladies Cardiovasculaires**

C'est en observant le mode de vie et les habitudes alimentaires des Eskimos du Groënland que les chercheurs danois ont avancé l'hypothèse que les AG  $\omega$ -3 auraient des effets protecteurs pour le cœur. En effet, les Eskimos, les Islandais et les Japonais ont en commun outre une faible mortalité cardiovasculaire, des concentrations très élevées d'AG  $\omega$ -3 dans leurs membranes cellulaires parce qu'ils consomment beaucoup de poissons gras [107]. Les poissons des mers froides ont besoin de beaucoup d'EPA et de DHA dans leurs membranes pour survivre aux eaux très froides et pauvres en oxygène. Ces AGPI proviennent de phytoplanctons que les poissons consomment. L'EPA et le DHA sont rapidement intégrés aux phospholipides des membranes cellulaires et jouent un rôle important dans la fluidité membranaire, dans la synthèse des récepteurs et des transporteurs transmembranaires [81].

Contrairement à la diète des Eskimos, la diète Nord-Américaine est pauvre en  $\omega$ -3 et riche en  $\omega$ -6 avec un ratio de 1  $\omega$ -3 pour 15 à 20  $\omega$ -6, ce qui augmente les risques de maladies cardiovasculaires [108].

Plusieurs études démontrent que la consommation élevée de poisson ou d'huile de poissons diminue le risque d'être atteint de maladies cardiovasculaires. Ces effets bénéfiques des  $\omega$ -3 proviennent du fait qu'ils confèrent des actions anti-inflammatoire, hypotriglycéridémique, hypotensive, anti-athérosclérotique et anti-arythmique. Premièrement, l'action anti-inflammatoire provient du fait que les AG peuvent stabiliser les plaques athéromateuses,

l'inflammation étant un processus contribuant à l'athérosclérose [72]. De plus, les  $\omega$ -3 s'incorporent aux plaques athéromateuses lorsque consommés, ce qui les stabilise, empêchant ainsi la rupture de plaque et d'événements coronaires ultérieurs [109]. Deuxièmement, les AG diminuent les concentrations de triglycérides, car des concentrations élevées sanguines de triglycérides sont liées à un risque accru de maladies cardiovasculaires. Ils diminuent tout d'abord la synthèse de particules very low density lipoprotein (VLDL) qui transportent les triglycérides vers le foie, puis les AG et eicosanoïdes des  $\omega$ -3 étant des ligands de récepteurs PPAR (peroxisome proliferator-activated receptors) augmentent la  $\beta$ -oxydation des AG et diminuent la lipogenèse hépatique. Finalement le sterol-regulatory-element-binding-proteins (SREBP), régulé de façon négative par les  $\omega$ -3, diminue l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des AG [110]. Donc, via ces actions, les  $\omega$ -3 collaborent à la diminution des triglycérides sanguins, et ils s'avèrent efficace chez des patients hypertriglycéridémiques [111]. Troisièmement, l'hypertension artérielle entraîne un risque élevé des maladies cardiovasculaires. Les  $\omega$ -3 peuvent moduler la pression artérielle en inhibant l'enzyme de conversion de l'angiotensine, en augmentant la biodisponibilité du NO, en diminuant la production de vasoconstricteurs et l'action de prostanoïdes vasoactives. De plus, les  $\omega$ -3 activent le système nerveux parasympathique, produisant une vasodilatation [112]. Finalement l'effet anti-arythmique des  $\omega$ -3 provient du fait qu'ils inhibent les canaux ioniques, principalement les canaux sodiques dépendants du voltage, les canaux calciques de type L et les canaux potassiques sortants, favorisant une action anti-arythmique [113]. Par conséquent, les  $\omega$ -3 sont efficaces pour la santé cardiovasculaire.

#### **2.4.1 Infarctus du myocarde et oméga 3**

Compte tenu des observations des habitudes alimentaires des Eskimos du Groëland, une équipe de chercheurs réalise une étude en 1989 appelée l'étude DART (Diet Reinfarction Trial) [114].

Dans cette étude, 2033 hommes de moins de 70 ans, survivants d'un infarctus ont été suivis pendant 2 ans. Ils ont été repartis en différents groupes, certains ne recevaient pas de conseils diététiques, d'autres en recevaient un ou plusieurs: régime pauvre en graisses avec augmentation du rapport graisses insaturées/saturées; régime riche en poisson gras ; régime enrichi en fibres. Après 2 ans, le groupe de patients ayant reçu le conseil de manger plus de poissons gras a présenté une diminution significative de la mortalité globale de 29 % par rapport à ceux qui n'ont pas reçu ce conseil mais sans modification du risque d'infarctus non mortel et des autres manifestations cardiovasculaires [114].

Une autre étude «GISSI-Prevenzione» [115, 116] réalisée par un groupe italien a aussi randomisé les patients ayant subi un infarctus du myocarde en différents groupes: supplément de 1 g d'  $\omega$ -3 (huiles de poissons : mélange 2/1 EPA/DHA) ; supplément de vitamine E 300 mg ; combinaison d'  $\omega$ -3 et vitamine E ; aucun supplément. La durée de l'étude a été de 42 mois. En fin d'étude il y a une diminution de 20 % de la mortalité totale, de 30 % de la mortalité cardiovasculaire et de 45 % des morts subites [81].

À la différence de ces études qui démontrent les effets bénéfiques des  $\omega$ -3 sur les résultats cardiovasculaires, plusieurs autres études randomisées contrôlées ont échoué de montrer les effets bénéfiques des acides gras  $\omega$ -3. En effet, l'étude Opéra qui comprenait 1516 patients subissant une chirurgie cardiaque, consommant 840 mg d'  $\omega$ -3 par jour n'avait pas réduit le risque de fibrillation auriculaire post-opératoire comparé au placebo [117]. L'essai d'origine comportant 12536 patients avec/ou à haut risque pour le diabète, a montré que lors d'un suivi médian de 6,2 ans avec 900 mg d'  $\omega$ -3 n'a pas réduit le taux d'évènement cardiovasculaires [118]. Une autre étude de 12513 patients avec de multiples facteurs de risque cardio-vasculaire ou la maladie vasculaire athérosclérotique mais pas l'IM, les  $\omega$ -3 la mortalité cardiovasculaire et la morbidité [119].

Outre les études effectuées chez des humains, plusieurs études ont aussi été effectuées sur

différents modèles animaux démontrant que les  $\omega$ -3 pouvaient réduire la taille de l'infarctus. On peut citer Sabrina Zeghichi-hamri *et coll* qui conclut que les  $\omega$ -3 provenant d'une source végétale et animale s'accumulent dans le plasma, les membranes et dans les mitochondries cardiaques, puis cette augmentation favorise une diminution de la taille de l'infarctus chez le rat [120].

De plus, Oskarsson *et coll.* en utilisant un modèle *in vivo* de chien, démontre que les  $\omega$ -3 (source marine) réduisent la taille de l'infarctus après une ischémie-reperfusion [121]. On constate aussi qu'une infusion péricardique de DHA montre une diminution de la taille de l'infarctus du myocarde ainsi que d'arythmie ventriculaire responsable de nombreuses mortalités chez des patients à la suite d'un IM [122]. Une étude réalisée dans notre laboratoire, utilisant un modèle murin, a démontré qu'en présence d'une diète riche en oméga-3, il y avait une diminution de l'IM et une activation de la voie Akt, ce qui nous emmène à suggérer que la voie RISK serait impliquée dans la cardioprotection que procure les AG après un IM [123].

En somme, bien que plusieurs études démontrent que les  $\omega$ -3 sont bénéfiques pour une prévention primaire en diminuant la taille de l'infarctus et pour une prévention secondaire en diminuant le risque de récurrence et de mortalité [124], il reste encore plusieurs interrogations à savoir si par exemple l'EPA et le DHA ont le même potentiel pour réduire la taille de l'infarctus.

## Chapitre 3 : Hypothèse et objectifs

Au cours des dernières pages, nous avons décrit que l'ischémie myocardique prolongée induisait la mort cellulaire et que le moyen le plus efficace pour limiter les lésions était de reperfuser ces régions. Toutefois l'efficacité de la reperfusion est atténuée par des phénomènes qui surviennent durant cette phase. Pour obtenir le plein potentiel protecteur de la reperfusion, nous pouvons activer différentes voies de signalisation au moment de la reperfusion qui protègent le myocarde. Cette protection peut être engendrée par différents moyens dont par la présence d'acides gras oméga-3.

Parmi les acides gras oméga 3 reconnus pour leur activité protectrice, nous avons l'EPA et le DHA. Toutefois nous ignorons si ces deux acides gras oméga-3 possèdent une activité protectrice similaire. Selon les données recueillies dans la littérature, nous avons émis l'hypothèse que les deux acides gras oméga-3 auraient des effets protecteurs passant par des voies similaires et divergentes.

L'objectif de ce projet est de déterminer dans le même modèle, l'effet d'une diète enrichie d'EPA, de DHA ou des deux acides gras oméga-3 sur la taille de l'infarctus du myocarde et sur certains mécanismes impliqués dans la cardioprotection.

## **Chapitre 4 : Article**

### **Comparison of the effects of two omega-3 polyunsaturated fatty acids alone or in combination on myocardial infarct size**

Ness Madingou<sup>1,2</sup>, Kim Gilbert<sup>1,2</sup>, Leandro Tomaro<sup>1</sup>, Charles Prud'homme Touchette<sup>1</sup>, François Trudeau<sup>1</sup>, Samuel Fortin<sup>3</sup>, Guy Rousseau<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centre de biomédecine, Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, 5400 boul. Gouin Ouest, Montréal, Québec, Canada H4J 1C5

<sup>2</sup>Département de pharmacologie, Université de Montréal, C.P. 6128 Succursale Centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

<sup>3</sup>SCF Pharma, 235 Route du Fleuve Ouest, Ste-Luce, Québec, Canada G0K 1P0

#### **Address for correspondence and reprints:**

Guy Rousseau, Ph.D.

Centre de biomédecine

Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal

5400 boul. Gouin Ouest

Montréal (Québec) Canada H4J 1C5

This work was supported by a grant from *Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie (RGPIN/250234-2012)*.

## **Abstract**

The aim of this project was to investigate the impact of two dietary omega-3 PUFAs, eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), alone or in combination, on infarct size.

Adult, male Sprague-Dawley rats were fed for 14 days with different omega-3 diets. The animals were subjected to ischemia for 40 min followed by reperfusion. Infarct size, Akt (protein kinase B) activation level, caspase-3 activity and mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening were measured.

The results indicate that EPA or DHA alone significantly reduced infarct size compared to the other diets. Akt activity was increased in the group fed EPA or DHA alone, whereas no significant activation was observed in the other groups compared to no omega-3 PUFA. DHA alone reduced caspase-3 activity and conferred resistance to mPTP opening.

In conclusion, our results demonstrate that EPA and DHA are individually effective in diminishing infarct size while their combination is not.

**Key Words:** Omega-3; eicosapentaenoic acid; docosahexaenoic acid; Myocardial infarction; cardioprotection

## **1. Introduction**

Nutrition is nowadays one of the main targets for the prevention of many disorders, such as cardiovascular and metabolic diseases. For instance, by observing the lifestyle and eating habits of Greenland Eskimos, researchers have hypothesized that omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are advantageous for cardiac health [1, 2]. Many experiments have confirmed that dietary omega-3 PUFAs are beneficial for the myocardium [3-5]. However, although some clinical investigations revealed a valuable effect of omega-3 PUFAs [6-8], others determined that they had no significant influence on heart health [9-11]. These discrepancies clearly show that our understanding of omega-3 PUFAs in cardiac health is incomplete.

Cardiovascular diseases are major causes of mortality in industrialized countries [12]. Since many years, numerous approaches have been taken to curb the damage induced by ischemia. Experimentally, it has been noted that the activation of different signalling pathways, at the onset of reperfusion, is protective of the myocardium and results in smaller infarct size [13]. The reperfusion injury salvage kinase (RISK) pathway has been identified as one of them [13]. This pathway involves a series of protein kinases, such as Akt (protein kinase B), which converge on mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening [14]. In previous work, we saw that Akt is activated by omega-3 PUFAs and one of their metabolites, Resolvin D1 (RvD1), indicating linkage between the RISK pathway and the cardio-protection offered by them [5, 15].

Two of the well-known omega-3 PUFAs are eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA). Both are usually present in our diet or in supplements. However, the individual effects of both are hypothetical since few side-by-side studies have been performed to compare them in the same model. The present study was designed to determine if dietary DHA, EPA or both could influence infarct size evoked by coronary artery occlusion.

## **2. Methods**

A total of 115 male 3-month-old Sprague-Dawley rats, weighing 300-350 g at the beginning of the experiments, were purchased from Charles River Canada (St-Constant, QC, Canada). They were handled in compliance with regulations of the local Animal Care Committee and the *Guidelines of the Canadian Council on Animal Care*. The animals were housed individually under constant conditions (21-22°C temperature and 40-50% humidity), including a 12-h dark-light cycle beginning at 8 AM. Chow pellets and tap water were available *ad libitum* throughout the study. The rats were randomly assigned to 1 of 5 groups: no-omega-3 PUFA, EPA 5 g/kg, DHA 5 g/kg, EPA+DHA 2.5 g/kg of each and EPA+DHA 5 g/kg of each. After 14 days on these diets, all groups underwent 40 min of left anterior descending coronary artery occlusion. Some animals were sacrificed after 24 h of reperfusion (n=8-9/group) to measure infarct size while others were euthanized 30 min after the onset of reperfusion (n=9/group) for biochemical analysis (caspase-3 and Akt activities) or at 15 min after the onset of reperfusion to measure mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening.

### **2.1 Diets**

The diets were custom prepared in SCF Pharma's laboratory. They were prepared by thoroughly mixing 1,400 g of powdered rat feed (LabDiet, Certified Rodent Diet 5002) with emulsion of appropriate weight of specific monoglyceride-omega-3 PUFA in 750 mL of water. The resulting wet diet was rolled and cut into pieces of approximately 1 cm<sup>3</sup>. The cut pieces were dehydrated in a convection oven (350°F, 25 min) to yield 1,500 g of final diet.

### **2.2 *In vivo* surgical procedure**

Anesthesia was induced by intraperitoneal ketamine/xylazine injection (60 and 10 mg/kg, respectively). The rats were subsequently intubated, and anesthesia was maintained under

isoflurane (1-2%) ventilation. Electrocardiograms and heart rate (HR) were monitored throughout the procedure. Left thoracotomy at the 5<sup>th</sup> intercostal space allowed left anterior descending coronary artery occlusion with 4-0 silk suture (Syneture; Covidien, Mansfield, MA, USA) and plastic snare. Ischemia was confirmed by ST segment alterations, and the presence of ventricular sub-epicardial cyanosis. The suture was removed after 40 min of ischemia, permitting myocardial tissue reperfusion. The rats were sacrificed after 15 min, 30 min or 24 h of reperfusion. In animals submitted to 24-h reperfusion, the thorax was closed with 2-0, 3-0 and 4-0 silk sutures (Syneture; Covidien), and 15,000 IU penicillin G (Duplocillin LA, Intervet Canada Ltd., Whitby, ON, Canada) was injected subcutaneously for antibiotic prophylaxis with 2 mg/kg buprenorphine for analgesia, before being returned to their respective cages.

### **2.3 Hemodynamics data**

HR was measured at different points during the experiment. Mean arterial pressure (MAP) was quantified by the tail cuff technique (Kent Scientific Corporation, Torrington, CT, USA) before occlusion, at 20 min of ischemia, at the onset of reperfusion and at 10 min of reperfusion. Pressure rate product (PRP) was calculated by the multiplication of HR and MAP/100.

### **2.4 Measurement of infarct size and tissue dissection**

At the end of the reperfusion period, the rats were restrained in a cone bag and rapidly decapitated. The hearts of animals with 24-h reperfusion were removed immediately, placed in a dish kept on crushed ice and washed with saline by retrograde perfusion into the aorta. The left anterior descending coronary artery was occluded at the same site as for myocardial infarct (MI) induction (see above) to delimit the area at risk (AR) by Evans blue infusion (0.5%). The hearts were frozen (-80°C for 5 min), sliced into 4 transverse 2-mm sections and placed in 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride solution (1%, pH 7.4) at 37°C for 10 min to better distinguish necrosis from the AR. The different regions were carefully drawn on a glass plate, photocopied

and cut. Thereafter, the complete infarct region, AR and left ventricle (LV) were weighed separately to express MI as percentage of infarction of the AR  $((I/AR) \times 100)$ , and AR as percentage of the LV area  $((AR/LV) \times 100)$ . In animals with 30-min reperfusion, the inner part of the ischemic region was kept at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  until needed for biochemical analysis.

## **2.5 Biochemical analysis**

### **2.5.1 Caspase-3**

Caspase-3 activity was measured according to a previously-described protocol [16]. Tissues were homogenized by sonication in lysis buffer and incubated for 30 min on ice. Thereafter, they were subjected to 3 frost-defrost cycles and the tissue homogenates were then centrifuged at  $4^{\circ}\text{C}$  for 10 min at 3000g. Enzymatic reactions were undertaken in reaction buffer with 25 mg of protein (40  $\mu\text{M}$ ) (attested by the Bradford method) and fluorescent substrate (Ac-DEVD-AMC for caspase-3). They were studied after incubation in the dark for 3 h at  $37^{\circ}\text{C}$  and stopped with the addition of 0.4 M NaOH and 0.4 M glycine buffer. Fluorescence was quantified by spectrofluorometry (Photon Technology International, Lawrenceville, NJ, USA) at 365 nm for excitation and 465 nm for emission.

### **2.5.2 Western blotting of Akt**

Tissues were homogenized by sonication in lysis buffer (1% Triton X-100, 0.32 mol/L sucrose, 10 mmol/L Tris (pH 8.0), 5 mmol/L EDTA, 2 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF, 10 mg/mL leupeptin, 10 mg/mL Pepstatin A and 10 mg/mL aprotinin). The tissue homogenates were incubated for 30 min at  $4^{\circ}\text{C}$  and centrifuged at 10,000g for 15 min. Protein concentrations in the supernatant were quantified by the Lowry method. Aliquots of 100  $\mu\text{g}$  protein were loaded in polyacrylamide gels (10-15%) and migrated at 150 V for 75 min in a mini-gel apparatus (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). After that, the proteins were transferred to nitrocellulose membranes with Trans-Blot semi-dry transfer cell (BioRad Laboratories). The

membranes were incubated in a SNAP i.d. 2.0 system (Millipore, Etobicoke, ON, Canada). Nonspecific sites were blocked for 20-min incubation in Odyssey blocking buffer (Li-CoR, Lincoln, NB, USA) (diluted 1:1 with phosphate-buffered saline (PBS)). After PBS washing, the membranes were incubated for 10 min with primary antibody 1:1,000 phospho-Akt (S473) (Rabbit Ab Cell Signaling, Whitby, ON, Canada), and total Akt (Rabbit Ab Cell Signaling). After washing, they were incubated for 10 min with secondary antibody 1:15,000 (anti-rabbit IRDye 800CW, Li-CoR). After washing, they were oven-dried for 5 min and then scanned with Odyssey Li-CoR Clx. Band intensities were analyzed by Image Studio (Li-CoR, Version 3.1). The same membranes were placed in stripping buffer (0.1 mol/L glycine and 1% SDS, pH 2.0, for 1 h at room temperature), then re-used with the same technique as for phosphor-Akt/total Akt ratio determination.

### **2.5.3 Measurement of mPTP opening**

Rats were sacrificed after ischemia and 15 min of reperfusion. Ischemic tissues were removed from the heart and put immediately in buffer A (Tris 50 mM, EGTA 10 mM, sucrose 70 mM, mannitol 210 mM, pH 7.4) and placed on ice. Heart tissue was weighed, minced with a blade and gently homogenized with a potter containing buffer A (100 mg tissue/1 mL of cold solution). After centrifugation (Sorvall RC 5C Plus centrifuge) at 1,200g for 3 min, the supernatant was transferred to another tube. After a second centrifugation (8,000g for 10 min), the pellet was gently re-suspended in buffer B (Tris 50 mM, sucrose 70 mM, mannitol 210 mM, pH 7.4). After the last centrifugation (6,000g for 10 min), mitochondria-containing pellets were re-suspended in 300 µl of buffer B. Protein concentrations were evaluated by Bradford's technique according to the manufacturer's (BioRad) specifications. In a cuvette, 2 mL of buffer C (Tris 20 mM, KCl 50 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, sodium succinate 5 mM, sucrose 150 mM, pH 7.4) were added to the mitochondrial preparation along with 10 µl of calcium green hexapotassium cell impermeant (ThermoFisher scientific, Burlington Ontario Canada). The

mix was placed in a fluorescence spectrophotometer and maintained under constant agitation. Readings were taken on a Cary Eclipse (Agilent, Santa Clara, CA, USA) at 500 nm of excitation and 530 nm of emission. After 5 min of stabilization, 10  $\mu$ l of CaCl<sub>2</sub> (1  $\mu$ M; 1 pulse) was added each minute until mPTP opening.

## **2.6 Statistical analysis**

The data are reported as means ( $\pm$  standard error of the means). Statistical analyses were performed with SPSS 21 (IBM Corp, Armonk, NY, USA). Groups were compared by analysis of variance, followed by Dunnett's *post hoc* test for multiple comparisons. If variances were heterogeneous, Brown-Forsythe correction was followed by Dunnett T3 comparisons when applicable.  $p < 0.05$  values were considered to be significant.

### **3. Results**

#### **3.1 Hemodynamics data**

HR was similar between groups ( $F(2.53, 111.46) = 1.91; p > 0.05$ ). However, MAP ( $F(1.937, 83.306) = 19.076; p < 0.05$ ) and PRP ( $F(2.31, 99.27) = 7.05; p < 0.05$ ) differed significantly during the experiment. *Post-hoc* analysis indicated that MAP and PRP were significantly different during the experiment compared to baseline ( $p < 0.05$ ; Table 1).

#### **3.2 Food intake and body weight**

No significant differences were seen between groups in terms of food intake, which was around 30 g per day. In contrast, body weight was significantly different between groups ( $F(4, 93) = 12.98; p < 0.05$ ). The EPA, DHA, EPA+DHA 2.5 g/kg and EPA+DHA 5 g/kg groups gained less weight than the vehicle controls (Figure 1).

#### **3.3 Infarct size**

Infarct size, expressed as percentage of the AR, was different between groups ( $F(4, 35) = 11.14; p < 0.05$ ). *Post hoc* analysis disclosed that infarct size was smaller with EPA and DHA compared to vehicle ( $p < 0.05$ ), meaning that it was significantly diminished when the rats were fed EPA or DHA diets. On the other hand, infarct size was not significantly different with EPA+DHA 2.5 g/kg and EPA+DHA 5 g/kg compared to the vehicle controls ( $p > 0.05$ ). The AR, expressed as percentage of the LV, was similar among groups ( $F(4, 35) = 0.66; p > 0.05$ ) (Figure 2).

#### **3.4 Caspase-3**

Caspase-3 activity in ischemic regions indicated significant differences ( $F(4, 30) = 6.69; p < 0.05$ ) between groups in the endocardial region. *Post hoc* analysis showed significantly decreased caspase-3 activity in the DHA ( $p < 0.05$ ) compared to the vehicle group. No significant difference was observed between the other groups compared to the controls (Figure 3).

### **3.5 Akt activity**

Akt activity, assessed by Western blotting in ischemic regions, presented significant differences ( $F(4, 36) = 8.25; p < 0.05$ ) between groups in the endocardial area. *Post hoc* analysis ascertained significantly elevated Akt activity with the EPA and DHA diets in comparison to the vehicle group ( $p < 0.05$ ). No significant difference was observed between the EPA+DHA 2.5 g/kg and EPA+DHA 5 g/kg groups compared to the vehicle controls ( $p > 0.05$ ) (Figure 4).

### **3.6 Number of pulses for mPTP opening**

These results showed significant differences ( $F(4, 17) = 6.72; p < 0.05$ ) between groups in the number of pulses (10  $\mu$ M) needed for mPTP opening. *Post hoc* analysis indicated significant elevation in the number of pulses with the DHA diet compared to the vehicle controls ( $p < 0.05$ ) (Figure 5).

#### 4. Discussion

The present study establishes that EPA and DHA, taken separately, are more effective than their combination to reduce infarct size. These results suggest that lower concentrations of individual omega-3 PUFAs are efficient in protecting the heart via a mechanism that could involve the survival kinase Akt pathway. Caspase-3 activity is attenuated and a significantly higher number of pulses is necessary for mPTP opening with the DHA diet, indicating that DHA protects mitochondrial integrity. These beneficial effects are absent with the other diets.

Although food intake was similar for all groups, weight gain was significantly higher in the vehicle group than in the other experimental groups. We hypothesize that the lower weight gain during the experiment in the omega-3 PUFA groups could be related to increased adiponectin [16], a hormone that regulates glucose and fatty acid oxidation [17]. It has been shown that the presence of omega-3 has a positive impact on adiponectin level as well as on corresponding receptors, R1 and R2 [18]. Elevated adiponectin level is associated with modest weight gain, suggesting linkage between omega-3 PUFAs and adiponectin in our model. Further experiments are needed to confirm this hypothesis.

In a previous investigation [5], we observed smaller infarct size in rats fed an omega-3 PUFA-enriched diet. This appears to contradict the present study, but we hypothesize that the level of combined omega-3 PUFA preparation needs to be higher for cardio-protection. The total omega-3 PUFA level was 18 g/kg in our previous work [5], about twice the dosage given in the present study (10 g/kg). As for tumor necrosis factor-alpha, it is possible that, depending on concentrations in the environment, different signalling pathways could be activated [19], and higher concentrations could be needed for cardio-protection. However, we can rule out that the presence of dietary DPA and linolenic acid of the first study [5], which are absent in the current work, could also influence its beneficial action.

The fact that we achieved cardio-protection with DHA or EPA 5 g/kg alone but not in combination suggests that both omega-3 PUFAs in preparations could induce competition for the same receptor at low doses. For instance, we observe that in presence of 5 g/kg EPA, the number of pulse to open mPTP or the activation of caspase-3 are similar to vehicle in spite of the presence of DHA 5 mg/kg. Another possibility is that EPA and DHA induce biased signalling, as seen with G-protein-coupled receptors (GPCR)[20]. For instance, it has been reported that AT<sub>1</sub>R activation by a modified peptide does not induce heterotrimeric G protein stimulation but serves as a link for beta-arrestin to activate the mitogen-activated protein kinase pathway [21]. With the identification of GPCR interacting with these omega-3 fatty acids, it would now be possible to perform such analysis.

One potential explanation of infarct size reduction with DHA and EPA diets is the Akt increase observed in these groups. It is well-known that Akt activation during the first minutes of reperfusion could result in infarct size decline. Akt, a member of the cardio-protective RISK pathway, is associated with the recruitment of anti-apoptotic signalling systems, such as phosphorylation, and inhibition of the pro-apoptotic proteins Bax and Bad [5]. We have previously stated that RvD1, a metabolite of DHA, given in the same experimental model, results in significant infarct size reduction compared to the vehicle group [15]. This protection is abrogated when the PI3K/Akt pathway is inhibited by LY-294002. These findings are similar to those obtained with CGS21680, an agonist of A<sub>2A</sub> adenosine receptors [22], indicating the importance of this pathway in cardio-protection.

We have noted that larger numbers of pulses are needed for mPTP opening in the presence of the DHA diet compared to the others. This is also consistent with other studies demonstrating that DHA could inhibit mPTP opening [23, 24], whereas the effect of EPA on mPTP opening is partial [24]. mPTP opening has been described as an important mediator of cell death in ischemic-reperfused hearts [25]. Indeed, it has been shown that different treatments could

inhibit mPTP opening, resulting in infarct size reduction [26, 27]. Although not universally accepted, this pore could be involved in the release of mitochondrial content in the cytoplasm with activation of the intrinsic apoptosis pathway [28, 29]. It is very interesting since we witnessed decreased caspase-3 activation in that group suggesting that DHA may have a protective effect on mitochondrial integrity.

## **5. Conclusion**

In conclusion, our results show that EPA and DHA 5 g/kg are individually effective in reducing infarct size while their combination, both at 5 g/kg, is not. They suggest that an omega-3 PUFA in that context could be given at a lower concentration to protect the ischemic heart.

## **6. Acknowledgments**

Kim Gilbert holds a studentship from *Fonds de recherche du Québec-Santé (FRQS)*.

## **7. Author contributions**

NM contributed to experiments, data analysis and writing

KG, LT, CPT, and FT contributed to the experiments, data analysis and revised the manuscript.

SF and GR contributed to conception of the experiments, data analysis and writing.

All authors have approved the final version of the article.

## **8. Conflicts of Interests**

The authors declare no conflict of interest.

## 9. References

- [1] H.O. Bang, J. Dyerberg, N. Hjoorne, The composition of food consumed by Greenland Eskimos, *Acta medica Scandinavica*, 200 (1976) 69-73.
- [2] A. Leaf, Historical overview of n-3 fatty acids and coronary heart disease, *The American journal of clinical nutrition*, 87 (2008) 1978S-1980S.
- [3] B.Q. Zhu, R.E. Sievers, Y.P. Sun, N. Morse-Fisher, W.W. Parmley, C.L. Wolfe, Is the reduction of myocardial infarct size by dietary fish oil the result of altered platelet function?, *Am Heart J*, 127 (1994) 744-755.
- [4] B.C. Yang, T.G. Saldeen, J.L. Bryant, W.W. Nichols, J.L. Mehta, Long-term dietary fish oil supplementation protects against ischemia-reperfusion-induced myocardial dysfunction in isolated rat hearts, *Am Heart J*, 126 (1993) 1287-1292.
- [5] I. Rondeau, S. Picard, T.M. Bah, L. Roy, R. Godbout, G. Rousseau, Effects of different dietary omega-6/3 polyunsaturated fatty acids ratios on infarct size and the limbic system after myocardial infarction, *Can J Physiol Pharmacol*, 89 (2011) 169-176.
- [6] M. Yokoyama, H. Origasa, M. Matsuzaki, Y. Matsuzawa, Y. Saito, Y. Ishikawa, S. Oikawa, J. Sasaki, H. Hishida, H. Itakura, T. Kita, A. Kitabatake, N. Nakaya, T. Sakata, K. Shimada, K. Shirato, Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS): a randomised open-label, blinded endpoint analysis, *Lancet*, 369 (2007) 1090-1098.
- [7] J. de Goede, J.M. Geleijnse, J.M. Boer, D. Kromhout, W.M. Verschuren, Marine (n-3) fatty acids, fish consumption, and the 10-year risk of fatal and nonfatal coronary heart disease in a large population of Dutch adults with low fish intake, *J Nutr*, 140 (2010) 1023-1028.
- [8] M.L. Burr, A.M. Fehily, J.F. Gilbert, S. Rogers, R.M. Holliday, P.M. Sweetnam, P.C. Elwood, N.M. Deadman, Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART), *Lancet*, 2 (1989) 757-761.
- [9] O.T. Investigators, J. Bosch, H.C. Gerstein, G.R. Dagenais, R. Diaz, L. Dyal, H. Jung, A.P. Maggiono, J. Probstfield, A. Ramachandran, M.C. Riddle, L.E. Ryden, S. Yusuf, n-3 fatty acids and cardiovascular outcomes in patients with dysglycemia, *The New England journal of medicine*, 367 (2012) 309-318.
- [10] B. Rauch, R. Schiele, S. Schneider, F. Diller, N. Victor, H. Gohlke, M. Gottwik, G. Steinbeck, U. Del Castillo, R. Sack, H. Worth, H. Katus, W. Spitzer, G. Sabin, J. Senges, OMEGA, a randomized, placebo-controlled trial to test the effect of highly purified omega-3 fatty acids on top of modern guideline-adjusted therapy after myocardial infarction, *Circulation*, 122 (2010) 2152-2159.
- [11] E.C. Rizos, E.E. Ntzani, E. Bika, M.S. Kostapanos, M.S. Elisaf, Association between omega-3 fatty acid supplementation and risk of major cardiovascular disease events: a systematic review and meta-analysis, *JAMA*, 308 (2012) 1024-1033.
- [12] T.A. Gaziano, Cardiovascular disease in the developing world and its cost-effective management, *Circulation*, 112 (2005) 3547-3553.
- [13] M. Ovize, G.F. Baxter, F. Di Lisa, P. Ferdinandy, D. Garcia-Dorado, D.J. Hausenloy, G. Heusch, J. Vinten-Johansen, D.M. Yellon, R. Schulz, C. Working Group of Cellular Biology of Heart of European Society of, Postconditioning and protection from reperfusion injury: where do we stand? Position paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology, *Cardiovasc Res*, 87 (2010) 406-423.
- [14] S.M. Davidson, D. Hausenloy, M.R. Duchon, D.M. Yellon, Signalling via the reperfusion injury signalling kinase (RISK) pathway links closure of the mitochondrial permeability transition pore to cardioprotection, *Int J Biochem Cell Biol*, 38 (2006) 414-419.

- [15] K. Gilbert, J. Bernier, V. Bourque-Riel, M. Malick, G. Rousseau, Resolvin D1 reduces infarct size through a phosphoinositide 3-kinase /protein kinase B mechanism, *J. Cardiovasc. Pharmacol*, 66 (2015) 72-79.
- [16] M. Mostowik, G. Gajos, J. Zalewski, J. Nessler, A. Undas, Omega-3 polyunsaturated fatty acids increase plasma adiponectin to leptin ratio in stable coronary artery disease, *Cardiovasc Drugs Ther*, 27 (2013) 289-295.
- [17] J.J. Diez, P. Iglesias, The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease, *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, 148 (2003) 293-300.
- [18] S.M. Younan, L.A. Rashed, O.M. Abd El Aziz, Cardioprotective modulation of cardiac adiponectin and adiponectin receptors by omega-3 in the high-fat fed rats, *The Chinese journal of physiology*, 56 (2013) 65-76.
- [19] J.M. van den Berg, S. Weyer, J.J. Weening, D. Roos, T.W. Kuijpers, Divergent effects of tumor necrosis factor alpha on apoptosis of human neutrophils, *J Leukoc Biol*, 69 (2001) 467-473.
- [20] B. Sivertsen, N. Holliday, A.N. Madsen, B. Holst, Functionally biased signalling properties of 7TM receptors - opportunities for drug development for the ghrelin receptor, *Br J Pharmacol*, 170 (2013) 1349-1362.
- [21] A.C. Holloway, H. Qian, L. Pipolo, J. Ziogas, S. Miura, S. Karnik, B.R. Southwell, M.J. Lew, W.G. Thomas, Side-chain substitutions within angiotensin II reveal different requirements for signaling, internalization, and phosphorylation of type 1A angiotensin receptors, *Mol Pharmacol*, 61 (2002) 768-777.
- [22] M. Boucher, S. Pesant, S. Falcao, C. de Montigny, E. Schampaert, R. Cardinal, G. Rousseau, Post-ischemic cardioprotection by A2A adenosine receptors: dependent of phosphatidylinositol 3-kinase pathway, *J Cardiovasc Pharmacol*, 43 (2004) 416-422.
- [23] R.J. Khairallah, J. Kim, K.M. O'Shea, K.A. O'Connell, B.H. Brown, T. Galvao, C. Daneault, C. Des Rosiers, B.M. Polster, C.L. Hoppel, W.C. Stanley, Improved mitochondrial function with diet-induced increase in either docosahexaenoic acid or arachidonic acid in membrane phospholipids, *PLoS One*, 7 (2012) e34402.
- [24] T.F. Galvao, R.J. Khairallah, E.R. Dabkowski, B.H. Brown, P.A. Hecker, K.A. O'Connell, K.M. O'Shea, H.N. Sabbah, S. Rastogi, C. Daneault, C. Des Rosiers, W.C. Stanley, Marine n3 polyunsaturated fatty acids enhance resistance to mitochondrial permeability transition in heart failure but do not improve survival, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 304 (2013) H12-21.
- [25] R. Wong, C. Steenbergen, E. Murphy, Mitochondrial permeability transition pore and calcium handling, *Methods Molecular Biology*, 810 (2012) 235-242.
- [26] G. Petrosillo, G. Colantuono, N. Moro, F.M. Ruggiero, E. Tiravanti, N. Di Venosa, T. Fiore, G. Paradies, Melatonin protects against heart ischemia-reperfusion injury by inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 297 (2009) H1487-1493.
- [27] F.N. Obame, C. Plin-Mercier, R. Assaly, R. Zini, J.L. Dubois-Rande, A. Berdeaux, D. Morin, Cardioprotective effect of morphine and a blocker of glycogen synthase kinase 3 beta, SB216763 [3-(2,4-dichlorophenyl)-4(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione], via inhibition of the mitochondrial permeability transition pore, *J Pharmacol Exp Ther*, 326 (2008) 252-258.
- [28] C.P. Baines, The mitochondrial permeability transition pore and ischemia-reperfusion injury, *Basic Res Cardiol*, 104 (2009) 181-188.
- [29] G. Kroemer, L. Galluzzi, C. Brenner, Mitochondrial membrane permeabilization in cell death, *Physiol Rev*, 87 (2007) 99-163.

### Figure legends

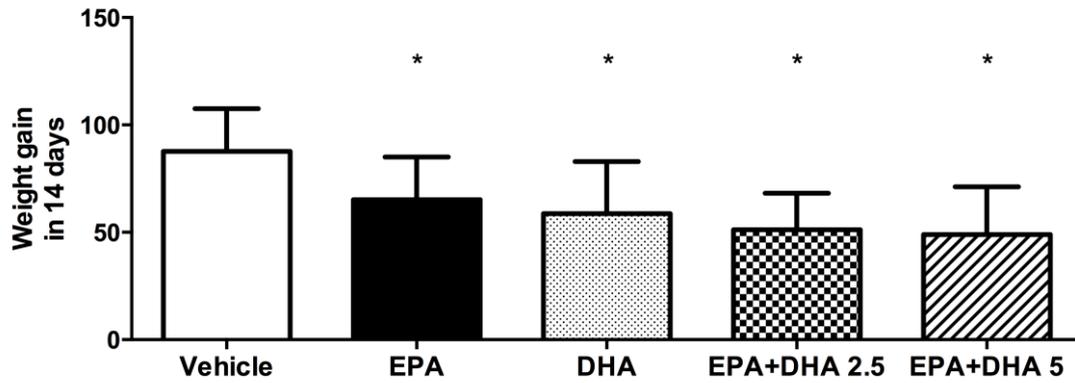


Figure 1. Weight gain in 14 days (in g). EPA: eicosapentaenoic acid, DHA: docosahexaenoic acid. \*indicates significant difference between the identified and vehicle groups:  $p < 0.05$ .

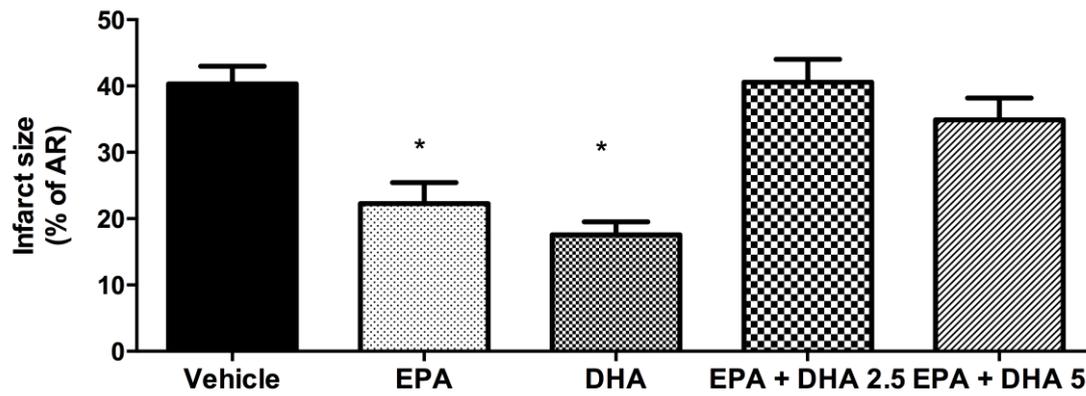


Figure 2. Infarct size (I) expressed as percentage of the area at risk (AR), and AR as percentage of the left ventricle (LV) after 24-h reperfusion. Values are means $\pm$ SEM (8-9 rats per group). EPA: eicosapentaenoic acid, DHA: docosahexaenoic acid. \*indicates significant difference between EPA or DHA versus the vehicle group:  $p < 0.05$ .

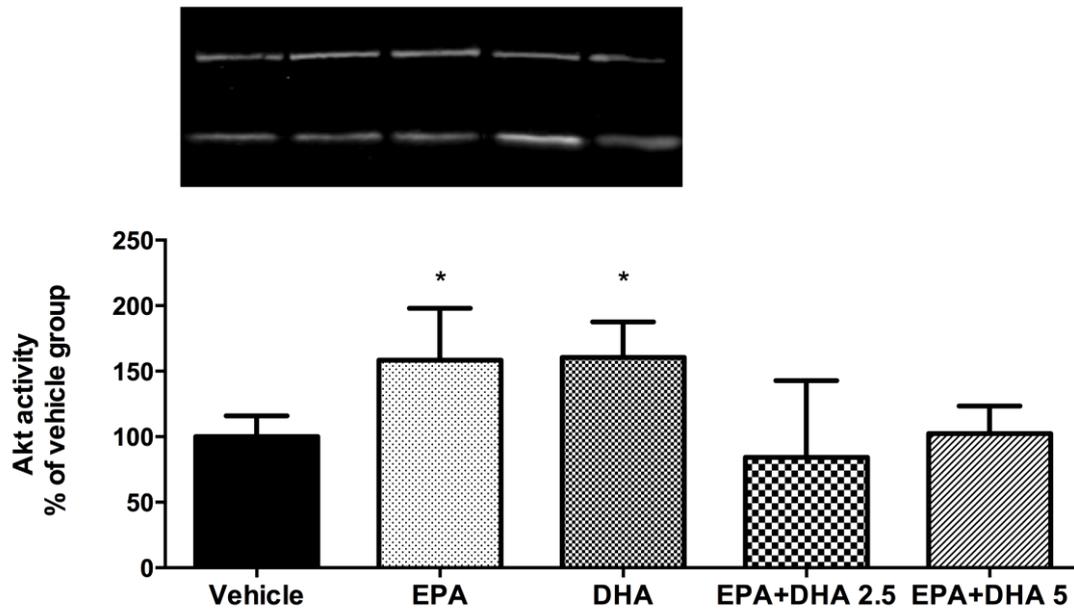


Figure 3. Akt activity at 30 min of reperfusion assessed by the ratio of phospho-Akt on total Akt evaluated by Western blotting (n=8-9/ group). Upper panels are representative Western blots. EPA: eicosapentaenoic acid, DHA: docosahexaenoic acid. \*indicates significant difference between the EPA and DHA versus the vehicle group:  $p < 0.05$ .

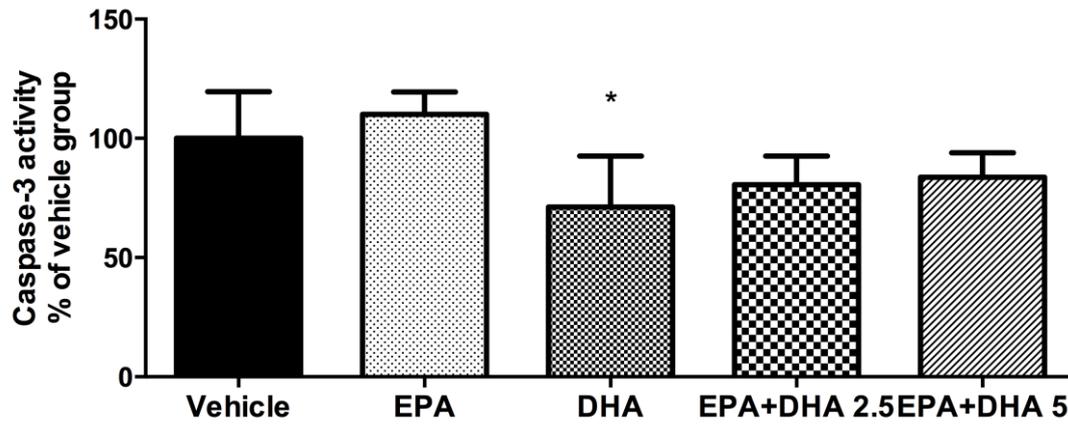


Figure 4. Caspase-3 activity expressed in endocardial areas as percent of the vehicle group and assessed by *in vitro* spectrofluorescence after 30 min of reperfusion (8-9/group). EPA: eicosapentaenoic acid, DHA: docosahexaenoic acid. \*indicates significant difference between DHA versus the vehicle group:  $p < 0.05$ .

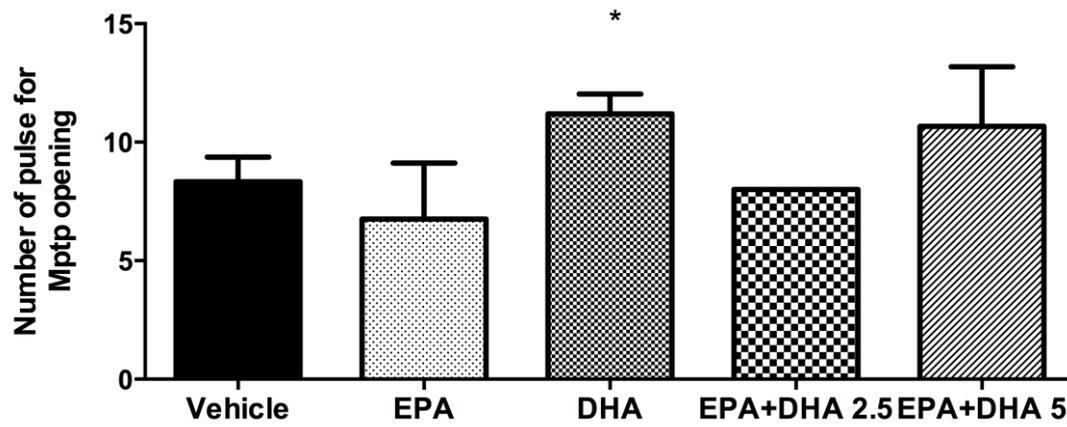


Figure 5. Number of pulses for mPTP opening assessed by Varian fluorescence spectrophotometer after 15 min of reperfusion (n=3-6). EPA: eicosapentaenoic acid, DHA: docosahexaenoic acid. \*indicates significant difference between the EPA versus the vehicle group:  $p < 0.05$ .

Table 1: Hemodynamic data

	Vehicle	EPA	DHA	EPA+DHA 2.5	EPA+DHA 5
<b>Baseline</b>					
HR	247.2 ± 25.9	243.9 ± 20.7	225.3 ± 30.9	237.2 ± 42.0	238.8 ± 35.5
MAP	93.5 ± 17.8	93.1 ± 12.8	78.8 ± 30.1	82.4 ± 23.2	83.8 ± 17.7
PRP	231.4 ± 60.1	228.2 ± 42.4	170.6 ± 64.5	190.2 ± 69.6	199.5 ± 40.7
<b>20 min Ischemia</b>					
HR	243.2 ± 46.5	260.7 ± 30.6	211.2 ± 61.8	213.6 ± 51.4	238.3 ± 36.2
MAP	68.2 ± 13.1*	80.3 ± 14.4*	66.6 ± 19.1*	71.8 ± 16.4*	76.5 ± 13.0*
PRP	169.0 ± 46.2*	208.2 ± 36.6*	142.4 ± 56.3*	162.2 ± 61.1*	190.3 ± 47.3*
<b>0 min Reperfusion</b>					
HR	262.3 ± 31.8	266.4 ± 34.3	218.8 ± 29.3	234.7 ± 30.9	251.2 ± 31.2
MAP	67.7 ± 10.5*	77.5 ± 14.8*	62.1 ± 21.0*	69.9 ± 12.2*	75.4 ± 15.7*
PRP	179.0 ± 31.1*	204.3 ± 38.8*	140.2 ± 50.0*	162.1 ± 36.1*	200.3 ± 61.5*
<b>10 min Reperfusion</b>					
HR	265.6 ± 28.5	224.3 ± 44.2	245.3 ± 20.7	227.1 ± 46.1	259.7 ± 25.6
MAP	68.3 ± 12.2*	72.6 ± 15.5*	64.0 ± 16.7*	69.2 ± 7.9*	71.2 ± 12.9*
PRP	183.7 ± 35.1*	164.4 ± 51.9*	162.1 ± 40.0*	156.1 ± 35.2*	196.5 ± 46.6*

HR: heart rate (beats/min); MAP: mean arterial pressure (mmHg); PRP (pressure rate product):

HR\*MAP/100. \*indicates p<0.05 compared to baseline. EPA: eicosapentaenoic acid, DHA:

docosahexaenoic acid.

## Chapitre 5 : Discussion

Cette étude nous montre que la prise des oméga-3 individuels semble être plus efficace pour réduire la taille de l'infarctus plutôt que la combinaison des deux AG à des concentrations similaires. Ce résultat est quand même surprenant étant donné qu'on s'attendrait à avoir un effet supérieur en combinant les 2 AG EPA et DHA.

Dans la plupart des poissons, on retrouve les 2 AG, mais à des concentrations différentes comme pour le saumon atlantique où la concentration de DHA est de 1093 mg/ 75g d'aliment cuit tandis que celle d'EPA est de 518 mg/75g d'aliment cuit. Par contre dans le flétan de Groenland, il y a 378 mg et 506 mg/ 75g d'aliment cuit de DHA et EPA respectivement [125]. Dans cette étude nous avons utilisé des concentrations égales de DHA et EPA dont 5 g/kg ou 2.5 g/kg de nourriture pour la combinaison afin de comparer les effets de chacun à concentrations équivalentes. Les quantités données représentent 150 mg d'oméga-3/ jour, ce qui équivaut à 300 mg/kg d'oméga-3 pour un rat de 500 g. D'après le tableau de conversion des doses HED (Human equivalent dose) de la FDA (Food and Drug administration) [126], la valeur équivalente chez un homme qui pèse 60 kg est de 4.8 g d'oméga-3/ jour. Cette quantité est élevée par rapport à celle qui est recommandée dans la littérature soit 250-500 mg d'oméga-3/ jour [127], correspondant à 2-3 portions de poisson par semaine. Il est aussi important de noter que la quantité donnée dans cette étude est seulement pour une période de 14 jours tandis que celle recommandée par la littérature est pour une période à long terme. Il s'est avéré que la quantité de nourriture mangée est la même pour tous les groupes, mais pas la prise de poids. En effet la prise de poids de la diète véhicule (sans AG) est plus élevée que celle des groupes contenant les acides gras oméga-3. D'ailleurs des études montrent que l'EPA et le DHA sont connus pour altérer le processus métabolique en réduisant l'adiposité et en augmentant l'oxydation des lipides, contribuant ainsi aux effets anti-obésité en général [106]. Par conséquent, l'EPA et le DHA peuvent aussi être utilisés dans les interventions diététiques pour

surmonter l'obésité, l'inflammation, et beaucoup d'autres états pathologiques [106]. Aussi, l'augmentation de l'adiponectine (une hormone qui régule l'oxydation des acides gras) [128] entraîne une diminution de la prise de poids en présence des AGPI [129]. Tout ceci expliquerait pourquoi nous avons une faible prise de poids en présence des AGPI.

La taille de l'infarctus donne une idée des dommages dus à l'IM. Comme mentionné précédemment, la durée de l'ischémie, le degré d'occlusion et la taille de la zone à risque influencent la taille de l'infarctus [12]. Dans notre modèle, la durée de l'ischémie était de 40 minutes, une durée qui est nettement au-dessus des 20 minutes d'ischémie minimales avant de voir apparaître les dommages irréversibles. D'ailleurs on remarque que tous les groupes ont présenté des dommages irréversibles. Le degré d'occlusion et la taille de la zone à risque sont identiques entre les groupes tels qu'observés par une zone à risque ZR/VG (Zone à risque par rapport au ventricule gauche) similaire. Ceci montre que les résultats de la taille de l'infarctus ne sont pas influencés par ces facteurs, car l'occlusion a été faite au même endroit. À ce propos, les résultats obtenus dans cette étude montrent que la taille de l'infarctus est réduite dans les groupes EPA et DHA seuls contrairement à la combinaison de diète EPA+DHA. En ce qui concerne la combinaison des deux AG, McNamara montre qu'il doit y avoir un ratio entre l'EPA et le DHA pour observer une diminution de la taille de l'infarctus [130]. La valeur du ratio qui diminue les symptômes de dépression chez l'enfant est de 2 EPA pour 1 DHA (2 :1 EPA : DHA) [130]. Si l'on retient cette hypothèse, la combinaison des 2 diètes devrait être prise dans un ratio donné pour obtenir les effets bénéfiques pour le myocarde. Aussi, Harris et Von Schacky [131] ont introduit le concept d'index oméga-3 qui est basé sur la mesure de la teneur en acides gras totaux des globules rouges du sang. Il représente le taux combiné d'EPA et de DHA et il est exprimé en pourcentage. L'index oméga-3 idéal qui est associé aux bénéfices cardiovasculaires est  $\geq 8\%$  alors qu'un index  $\leq 4\%$  donne moins de cardioprotection. En effet, cette mesure serait le marqueur idéal du risque de maladie coronarienne et pour la santé

cardiovasculaire [132]. Par conséquent, on comprend qu'il faudrait une investigation plus approfondie afin d'expliquer pourquoi la combinaison des 2 diètes ne diminue pas la taille de l'infarctus. Il serait envisageable de mesurer l'index et de connaître le ratio idéal entre EPA et DHA. Ajoutons aussi qu'il pourrait avoir un effet de compétition pour le même récepteur en l'occurrence GPR120 à faible dose entre les 2 AG. Il se pourrait que le concept de signalisation biaisée explique aussi ce résultat. En effet, le concept de sélectivité fonctionnelle aussi appelé agonisme biaisé découle du modèle multi-états. Il propose que chaque ligand d'un RCPG se lie avec une forte affinité pour une conformation particulière du récepteur et déplace l'équilibre vers cet état, ceci permettant d'activer sélectivement un signal spécifique d'activation de ce RCPG [133]. Par exemple, le carvedilol ( $\beta$ -bloquant) a été démontré comme ayant une activité agoniste inverse sur la voie dépendant de la protéine Gs, mais stimulant de la voie MAPKinase dépendante de la  $\beta$ -arrestine 2 [134]. Alors l'interaction des oméga-3 avec les récepteurs GPCR permettrait dans les analyses futures de pouvoir approfondir cette hypothèse. Nos études précédentes montrant une diminution de la taille de l'infarctus avec la combinaison d'EPA et de DHA, contenaient des concentrations des 2 AG largement plus élevées que celles utilisées dans la présente étude. Par ailleurs, notre étude nous montre qu'il serait préférable de produire des suppléments individuels d'AG à faible dose pour avoir les effets recherchés versus la combinaison des 2 à des doses très élevées. Évidemment il serait plus économique d'avoir un effet bénéfique à faible dose d'EPA ou de DHA consommé plutôt que d'en dépenser une grande quantité d'EPA+DHA combiné pour avoir le même effet.

Pour ce qui est de l'EPA, la taille de l'infarctus est significativement réduite par rapport au groupe véhicule et cela concorde avec nos attentes. En effet Ogita et coll. ont aussi montré que l'EPA diminue la taille de l'infarctus via principalement l'ouverture du canal de potassium activé par le calcium (KCa) [135]. L'un des mécanismes par lesquels l'EPA diminue la taille de l'infarctus est l'augmentation de la protéine kinase Akt. L'activation d'Akt est causée par la

libération de ligands endogènes suivant l'ischémie [66]. Il a aussi été prouvé qu'Akt favorise la survie cellulaire et prévient l'apoptose [67]. Ainsi, tout comme ce qui a été obtenu dans notre laboratoire [123], l'EPA confère sa cardioprotection via entre autres l'augmentation de la kinase de survie Akt donc active la voie RISK.

À propos du DHA, on constate que la diminution de la taille de l'infarctus est due à la diminution de la caspase-3, à la résistance de l'ouverture du pore mPTP et à l'augmentation de la protéine Akt. Ces trois voies convergent ensemble d'une manière ou d'une autre. Premièrement l'équipe du chercheur Erinne R. Dabkowski de l'université de Maryland est la première équipe à démontrer directement que la supplémentation en DHA + EPA empêche l'apoptose et fait allusion à l'implication mitochondriale comme un mécanisme pour les effets bénéfiques des  $\omega$ -3 [136]. Les mitochondries déterminent la survie des cellules à travers l'ouverture du pore mPTP, qui se produit dans des conditions de stress de la cellule, ce qui provoque une dépolarisation mitochondriale et le déclenchement de la mort cellulaire. La perte de la production d'ATP et la libération du cytochrome C peut entraîner la mort cellulaire via soit l'apoptose ou la nécrose, donc l'ouverture du mPTP est généralement considérée comme un événement catastrophique. Par la suite ils ont obtenu que seule la consommation de DHA retarde l'ouverture du pore mPTP induit par  $Ca^{2+}$ , ce qui n'a pas été le cas pour EPA [136]. Dans notre étude, on constate aussi que le nombre de pulses pour ouvrir le pore mPTP en présence de DHA est plus élevé comparé au groupe véhicule, ce qui coïncide bien avec les résultats de l'équipe du docteur Erinne. Il est désormais clair qu'inhiber l'ouverture du mPTP vient à inhiber la libération du cytochrome c (voie intrinsèque de l'apoptose), donc inhibition de l'activation de la caspase-3 et par conséquent de l'apoptose : il s'agit de la 1ere connexion des voies par lesquelles DHA confère la cardioprotection. Il est aussi établi que l'activation de la voie RISK inhibe l'ouverture de ce pore, ce qui confère une cardioprotection à la cellule [69, 70].

De manière générale, EPA et DHA sont efficaces pour réduire la taille de l'infarctus. Néanmoins, il a été émis l'hypothèse que la longueur et le degré de saturation des acides gras peuvent affecter l'efficacité [94], ce qui soulève la possibilité que les différences d'efficacité puissent également être observées pour l'EPA (20 atomes de carbone, 5 doubles liaisons) et le DHA (22 atomes de carbone, 6 doubles liaisons) [96], car les molécules de différentes longueurs produisent très souvent des réponses biochimiques et physiologiques qui sont qualitativement et quantitativement différentes les uns des autres. En fin de compte, plusieurs facteurs qui contribuent aux effets différentiels d'EPA et de DHA, y compris les différences dans l'activation directe et indirecte des facteurs de transcription, l'impact de la longueur, le degré de saturation et la stabilité de l'acide gras sur l'efficacité et l'efficacité différentielle pour l'incorporation des acides gras dans les phospholipides. En outre, l'activité des métabolites de l'EPA et du DHA est souvent très différente de la molécule mère AGPI n-3, et la divergence dans l'efficacité des enzymes de métaboliser l'EPA et le DHA peuvent contribuer à observer la diversité dans la réponse cellulaire. Il est donc recommandé d'avoir une meilleure compréhension des similitudes et des différences d'EPA et de DHA afin de donner des recommandations personnalisées selon l'état du patient à savoir lequel des 2 AGPI serait meilleur pour ce dernier [96].

Toutefois, les études qui n'obtiennent pas les résultats des effets bénéfiques des AG pourraient être dues à plusieurs facteurs, dont le ratio  $\omega$ -3/  $\omega$ -6 qui est important à considérer [123], l'incapacité de détecter des décès dus aux problèmes cardiaques, les doses utilisées qui sont inférieures pour avoir un effet bénéfique, au concept d'index oméga-3 et bien d'autres raisons qui ne sont pas encore connues.

En dépit de cela, il est désormais évident que les  $\omega$ -3 sont différents, mais importants pour la santé cardiovasculaire. Par conséquent, ces résultats ouvrent des portes afin d'élaborer des études qui permettraient de mieux cibler l'effet individuel des oméga-3.

## **Conclusion :**

Bien qu'ils peuvent utiliser des mécanismes distincts pour réduire la taille de l'infarctus, l'EPA et le DHA protègent le cœur, lorsque consommé avant un infarctus du myocarde. En effet, ils activent des mécanismes de protection, ce qui prépare le cœur à une résistance accrue à contrer les effets néfastes d'une ischémie temporaire.

## **Perspectives futures :**

Dans le but de mieux comprendre les mécanismes qui régissent la combinaison de la diète EPA et DHA, il serait intéressant de doser leur incorporation dans les membranes des phospholipides et des érythrocytes et d'établir un index d'oméga-3. De plus, il serait recommandé de connaître le ratio EPA : DHA dans lequel on obtient le meilleur effet cardioprotecteur.

# Bibliographie

1. *Fondation des maladies du coeur*. 2011; Available from: <http://www.fmcoeur.com/site/c.ntJXJ8MMlqE/b.3562179/k.9FCD/Statistiques.htm>.
2. Piper, H.M., ed. *Pathophysiology of severe ischemic myocardial injury*. Vol. 104. 1990, Kluwer Academic Publishers.
3. Thygesen, K., et al., *Universal definition of myocardial infarction*. Eur Heart J, 2007. **28**(20): p. 2525-38.
4. M.Cours, L.A., *Ischémie-Reperfusion et protection cellulaire*. Réanimation, 2010. **19**: p. 185-190.
5. Donald Voet, J.G.V., ed. *Biochemistry*. 4th edition ed. 2011: United States.
6. Vinay Kumar , A.K.A., Nelson Fausto , Richard Mitchell, ed. *Robbins Basic Pathology*. 8e ed. 2007. 946.
7. Carmeliet, E., *Myocardial ischemia: reversible and irreversible changes*. Circulation, 1984. **70**(1): p. 149-51.
8. Thygesen, K., et al., *Third universal definition of myocardial infarction*. Eur Heart J, 2012. **33**(20): p. 2551-67.
9. Katy Perlemuter, G.M. and J.P. Bassand. *Infarctus du myocarde*. Available from: [http://www.med.univ-montp1.fr/enseignement/cycle\\_2/MIA/ECN/Cardio/132b\\_infarctus\\_CECMV.pdf](http://www.med.univ-montp1.fr/enseignement/cycle_2/MIA/ECN/Cardio/132b_infarctus_CECMV.pdf).
10. Reimer, K.A., et al., *The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs*. Circulation, 1977. **56**(5): p. 786-94.
11. Seiler, C., *The human coronary collateral circulation*. Heart, 2003. **89**(11): p. 1352-7.
12. Benhabbouche, S., et al., *[The basis of ischemia-reperfusion and myocardial protection]*. Ann Fr Anesth Reanim, 2011. **30 Suppl 1**: p. S2-16.
13. BRAUNWALD, E.K., R. A, *Myocardial reperfusion: a double-edged sword?* J Clin Invest, 1985. **76**(5): p. 1713-9.
14. Buja, L.M., *Myocardial ischemia and reperfusion injury*. Cardiovasc Pathol, 2005. **14**(4): p. 170-5.
15. Jennings, R.B. and K.A. Reimer, *Factors involved in salvaging ischemic myocardium: effect of reperfusion of arterial blood*. Circulation, 1983. **68**(2 Pt 2): p. 125-36.
16. Terada, L.S., et al., *Existence and participation of xanthine oxidase in reperfusion injury of ischemic rabbit myocardium*. Am J Physiol, 1991. **260**(3 Pt 2): p. H805-10.
17. Jennings, R.B., et al., *Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog*. Arch Pathol, 1960. **70**: p. 68-78.
18. Takatsu A, K.M., Ishiyama I., *The significance of contraction bands in cardiac trauma*. Jpn J Legal Med 1981. **35**: p. 180-190.
19. Braunwald, E. and R.A. Kloner, *The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction*. Circulation, 1982. **66**(6): p. 1146-9.
20. Krug, A., R. Du Mesnil de, and G. Korb, *Blood supply of the myocardium after temporary coronary occlusion*. Circ Res, 1966. **19**(1): p. 57-62.
21. Manciet, L.H., et al., *Microvascular compression during myocardial ischemia: mechanistic basis for no-reflow phenomenon*. Am J Physiol, 1994. **266**(4 Pt 2): p. H1541-50.
22. Piper HM, G.-D.D., Ovize M., *A fresh look at reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 1998. **38**(2): p. 291-300.
23. Monassier, J.P., *Reperfusion injury in acute myocardial infarction. From bench to cath lab. Part I: Basic considerations*. Arch Cardiovasc Dis, 2008. **101**(7-8): p. 491-500.
24. Chen, J.K. and S.E. Chow, *Antioxidants and myocardial ischemia: reperfusion injuries*. Chang Gung Med J, 2005. **28**(6): p. 369-77.

25. Yellon, D.M. and D.J. Hausenloy, *Myocardial reperfusion injury*. N Engl J Med, 2007. **357**(11): p. 1121-35.
26. Piper, H.M., K. Meuter, and C. Schafer, *Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury*. Ann Thorac Surg, 2003. **75**(2): p. S644-8.
27. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion*. J Mol Cell Cardiol, 2003. **35**(4): p. 339-41.
28. Griffiths EJ, H.A., *Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion*. Biochem J, 1995. **1;307**: p. ( Pt 1):93-8.
29. Kubler, W. and M. Haass, *Cardioprotection: definition, classification, and fundamental principles*. Heart, 1996. **75**(4): p. 330-3.
30. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. **26**(4): p. 239-57.
31. Saikumar, P., et al., *Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease*. Am J Med, 1999. **107**(5): p. 489-506.
32. Zimmermann, K.C., C. Bonzon, and D.R. Green, *The machinery of programmed cell death*. Pharmacol Ther, 2001. **92**(1): p. 57-70.
33. Martin, S.J. and D.R. Green, *Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts?* Cell, 1995. **82**(3): p. 349-52.
34. Chowdhury, I., B. Tharakan, and G.K. Bhat, *Caspases - an update*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2008. **151**(1): p. 10-27.
35. Youle, R.J. and A. Strasser, *The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(1): p. 47-59.
36. al., B.A.e., *Inhibition of Bax Channel-Forming Activity by Bcl-2*. 1997. **277**.
37. Georg Häcker , A.W., *BH3-only proteins trigger cytochrome c release, but how?* Elsevier, 2007. **462** p. 150–155.
38. Wang, X., *The expanding role of mitochondria in apoptosis*. Genes & Dev. , 2001. **15**: p. 2922-2933.
39. Fan, T.J., et al., *Caspase family proteases and apoptosis*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2005. **37**(11): p. 719-27.
40. Shiozaki, E.N. and Y. Shi, *Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology*. Trends Biochem Sci, 2004. **29**(9): p. 486-94.
41. Broker, L.E., F.A. Krzyt, and G. Giaccone, *Cell death independent of caspases: a review*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(9): p. 3155-62.
42. Wang, C. and R.J. Youle, *The role of mitochondria in apoptosis\**. Annu Rev Genet, 2009. **43**: p. 95-118.
43. Rossi, D. and G. Gaidano, *Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease*. Haematologica, 2003. **88**(2): p. 212-8.
44. Schmitz, I., S. Kirchhoff, and P.H. Krammer, *Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways*. Int J Biochem Cell Biol, 2000. **32**(11-12): p. 1123-36.
45. Saikumar, P., et al., *Mechanisms of cell death in hypoxia/reoxygenation injury*. Oncogene, 1998. **17**(25): p. 3341-9.
46. *FDP Virologie*. 2015 03 Avril 2015; Available from: [http://www.afd-ld.org/~fdp\\_viro/content.php?page=interaction](http://www.afd-ld.org/~fdp_viro/content.php?page=interaction).
47. Hill, J.H. and P.A. Ward, *The phlogistic role of C3 leukotactic fragments in myocardial infarcts of rats*. J Exp Med, 1971. **133**(4): p. 885-900.
48. Diepenhorst, G.M., T.M. van Gulik, and C.E. Hack, *Complement-mediated ischemia-reperfusion injury: lessons learned from animal and clinical studies*. Ann Surg, 2009. **249**(6): p. 889-99.
49. Lucchesi, B.R. and K.S. Kilgore, *Complement inhibitors in myocardial ischemia/reperfusion injury*. Immunopharmacology, 1997. **38**(1-2): p. 27-42.

50. Buerke, M., T. Murohara, and A.M. Lefer, *Cardioprotective effects of a C1 esterase inhibitor in myocardial ischemia and reperfusion*. *Circulation*, 1995. **91**(2): p. 393-402.
51. Buerke, M., et al., *Blocking of classical complement pathway inhibits endothelial adhesion molecule expression and preserves ischemic myocardium from reperfusion injury*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1998. **286**(1): p. 429-38.
52. Frangogiannis, N.G., *The immune system and cardiac repair*. *Pharmacol Res*, 2008. **58**(2): p. 88-111.
53. Lenardo, M.J. and D. Baltimore, *NF-kappa B: a pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control*. *Cell*, 1989. **58**(2): p. 227-9.
54. Lawrence, T., et al., *Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation*. *Nat Med*, 2001. **7**(12): p. 1291-7.
55. Sun, M., et al., *Excessive tumor necrosis factor activation after infarction contributes to susceptibility of myocardial rupture and left ventricular dysfunction*. *Circulation*, 2004. **110**(20): p. 3221-8.
56. Monden, Y., et al., *Soluble TNF receptors prevent apoptosis in infiltrating cells and promote ventricular rupture and remodeling after myocardial infarction*. *Cardiovasc Res*, 2007. **73**(4): p. 794-805.
57. Monden Y, K.T., Inoue T, Tsutsumi T, Kawano S, Ide T, Tsutsui H, Sunagawa K., *Tumor necrosis factor-alpha is toxic via receptor 1 and protective via receptor 2 in a murine model of myocardial infarction*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 2007. **293**(1): p. H743-53.
58. Frangogiannis, N.G., C.W. Smith, and M.L. Entman, *The inflammatory response in myocardial infarction*. *Cardiovasc Res*, 2002. **53**(1): p. 31-47.
59. Vinten-Johansen, J., *Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury*. *Cardiovasc Res*, 2004. **61**(3): p. 481-97.
60. Murry, C.E., R.B. Jennings, and K.A. Reimer, *Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium*. *Circulation*, 1986. **74**(5): p. 1124-36.
61. Zhao, Z.Q., et al., *Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. **285**(2): p. H579-88.
62. Hausenloy, D.J., A. Tsang, and D.M. Yellon, *The reperfusion injury salvage kinase pathway: a common target for both ischemic preconditioning and postconditioning*. *Trends Cardiovasc Med*, 2005. **15**(2): p. 69-75.
63. Lecour, S., *Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: Does it go beyond the RISK pathway?* *J Mol Cell Cardiol*, 2009. **47**(1): p. 32-40.
64. Schulman, D., D.S. Latchman, and D.M. Yellon, *Urocortin protects the heart from reperfusion injury via upregulation of p42/p44 MAPK signaling pathway*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002. **283**(4): p. H1481-8.
65. Ovize, M., et al., *Postconditioning and protection from reperfusion injury: where do we stand? Position paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology*. *Cardiovasc Res*, 2010. **87**(3): p. 406-23.
66. Rozengurt, E., *Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors*. *J Cell Physiol*, 2007. **213**(3): p. 589-602.
67. Yamaguchi, H. and H.G. Wang, *The protein kinase PKB/Akt regulates cell survival and apoptosis by inhibiting Bax conformational change*. *Oncogene*, 2001. **20**(53): p. 7779-86.
68. Boucher, M., et al., *Post-ischemic cardioprotection by A2A adenosine receptors: dependent of phosphatidylinositol 3-kinase pathway*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2004. **43**(3): p. 416-22.
69. Abdallah, Y., et al., *Insulin protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture by a survival pathway targeting SR Ca<sup>2+</sup> storage*. *Cardiovasc Res*, 2006. **70**(2): p. 346-53.

70. Halestrap, A.P., S.J. Clarke, and S.A. Javadov, *Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection*. Cardiovasc Res, 2004. **61**(3): p. 372-85.
71. Andreadou, I., et al., *Pharmacological pre- and post- conditioning agents: reperfusion-injury of the heart revisited*. Mini Rev Med Chem, 2008. **8**(9): p. 952-9.
72. Adkins, Y. and D.S. Kelley, *Mechanisms underlying the cardioprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids*. J Nutr Biochem, 2010. **21**(9): p. 781-92.
73. Lacerda, L., et al., *Ischaemic postconditioning protects against reperfusion injury via the SAFE pathway*. Cardiovasc Res, 2009. **84**(2): p. 201-8.
74. Negoro, S., et al., *Activation of signal transducer and activator of transcription 3 protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress through the upregulation of manganese superoxide dismutase*. Circulation, 2001. **104**(9): p. 979-81.
75. Imada, K. and W.J. Leonard, *The Jak-STAT pathway*. Mol Immunol, 2000. **37**(1-2): p. 1-11.
76. Negoro, S., et al., *Activation of JAK/STAT pathway transduces cytoprotective signal in rat acute myocardial infarction*. Cardiovasc Res, 2000. **47**(4): p. 797-805.
77. Culiver, C., *Acides gras : nomenclature et sources alimentaires*. Ann Med Vet, 2004. **148**: p. 133-140.
78. Das, U.N., *Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology*. Biotechnol J, 2006. **1**(4): p. 420-39.
79. Heller, A.R., Stehr S.N, Koch T, ed, *Omega-3 Fatty Acids in Clinical nutrition*. Vol. 108. 2005.
80. Lands, W.E., ed., *Fish, omega-3 and human health*. Vol. 220. 2005.
81. Herbaut, C., *Omég-3 et santé*. Rev Med Brux, 2006. **27**: p. 355-60.
82. Ziboh, V.A., et al., *Biological significance of essential fatty acids/prostanoids/lipoxygenase-derived monohydroxy fatty acids in the skin*. Arch Pharm Res, 2002. **25**(6): p. 747-58.
83. Guesnet P, A.J., Astorg P, Pifferi F, Laviolle M, *Les rôles physiologiques majeurs exercés par les acides gras polyinsaturés (AGPI)*. OCL, 2005. **12**: p. 333-343.
84. Nakamura, M.T. and T.Y. Nara, *Essential fatty acid synthesis and its regulation in mammals*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2003. **68**(2): p. 145-50.
85. Funk, C.D., *Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology*. Science, 2001. **294**(5548): p. 1871-5.
86. Miller, S.B., *Prostaglandins in health and disease: an overview*. Semin Arthritis Rheum, 2006. **36**(1): p. 37-49.
87. Smith, W.L., *Cyclooxygenases, peroxide tone and the allure of fish oil*. Curr Opin Cell Biol, 2005. **17**(2): p. 174-82.
88. Tull, S.P., et al., *Omega-3 Fatty acids and inflammation: novel interactions reveal a new step in neutrophil recruitment*. PLoS Biol, 2009. **7**(8): p. e1000177.
89. Dixon, R.A., et al., *Cloning of the cDNA for human 5-lipoxygenase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(2): p. 416-20.
90. McMahon, B. and C. Godson, *Lipoxins: endogenous regulators of inflammation*. Am J Physiol Renal Physiol, 2004. **286**(2): p. F189-201.
91. Denzlinger, C., *Biology and pathophysiology of leukotrienes*. Crit Rev Oncol Hematol, 1996. **23**(3): p. 167-223.
92. Fetterman, J.W., Jr. and M.M. Zdanowicz, *Therapeutic potential of n-3 polyunsaturated fatty acids in disease*. Am J Health Syst Pharm, 2009. **66**(13): p. 1169-79.
93. Hirasawa, A., et al., *Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120*. Nat Med, 2005. **11**(1): p. 90-4.
94. Burns, R.N. and N.H. Moniri, *Agonism with the omega-3 fatty acids alpha-linolenic acid and docosahexaenoic acid mediates phosphorylation of both the short and long isoforms of the human GPR120 receptor*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **396**(4): p. 1030-5.
95. Weldon, S.M., et al., *Docosahexaenoic acid induces an anti-inflammatory profile in lipopolysaccharide-stimulated human THP-1 macrophages more effectively than eicosapentaenoic acid*. J Nutr Biochem, 2007. **18**(4): p. 250-8.

96. Russell, F.D. and C.S. Burgin-Maunders, *Distinguishing health benefits of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids*. Mar Drugs, 2012. **10**(11): p. 2535-59.
97. Jude, S., et al., *Dietary long-chain n-3 fatty acids modify blood and cardiac phospholipids and reduce protein kinase-C-delta and protein kinase-C-epsilon translocation*. Br J Nutr, 2007. **98**(6): p. 1143-51.
98. Madsen, L., et al., *Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid affect mitochondrial and peroxisomal fatty acid oxidation in relation to substrate preference*. Lipids, 1999. **34**(9): p. 951-63.
99. Singer, P., et al., *Slow desaturation and elongation of linoleic and alpha-linolenic acids as a rationale of eicosapentaenoic acid-rich diet to lower blood pressure and serum lipids in normal, hypertensive and hyperlipemic subjects*. Prostaglandins Leukot Med, 1986. **24**(2-3): p. 173-93.
100. Murphy, M.G., et al., *Diets enriched in menhaden fish oil, seal oil, or shark liver oil have distinct effects on the lipid and fatty-acid composition of guinea pig heart*. Mol Cell Biochem, 1997. **177**(1-2): p. 257-69.
101. Ferrucci, L., et al., *Relationship of plasma polyunsaturated fatty acids to circulating inflammatory markers*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(2): p. 439-46.
102. Kalupahana, N.S., Claycombe, K., Fletcher, S., Wortman, P., and Moustaid-Moussa, N., *Eicosapentaenoic acid improves adipose tissue inflammation in part via downregulation of adipose angiotensinogen secretion*. Obesity, 2010a. **18**: p. S71-S.
103. Wortman, P., et al., *n3 and n6 polyunsaturated fatty acids differentially modulate prostaglandin E secretion but not markers of lipogenesis in adipocytes*. Nutr Metab (Lond), 2009. **6**: p. 5.
104. Duda, M.K., et al., *Fish oil, but not flaxseed oil, decreases inflammation and prevents pressure overload-induced cardiac dysfunction*. Cardiovasc Res, 2009. **81**(2): p. 319-27.
105. Kalupahana, N.S., et al., *Eicosapentaenoic acid prevents and reverses insulin resistance in high-fat diet-induced obese mice via modulation of adipose tissue inflammation*. J Nutr, 2010. **140**(11): p. 1915-22.
106. Siriwardhana, N., N.S. Kalupahana, and N. Moustaid-Moussa, *Health benefits of n-3 polyunsaturated fatty acids: eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid*. Adv Food Nutr Res, 2012. **65**: p. 211-22.
107. Salen, M.d.L.e.P., *Le pouvoir des oméga-3*
108. Bjerregaard, P., G. Mulvad, and H.S. Pedersen, *Cardiovascular risk factors in Inuit of Greenland*. Int J Epidemiol, 1997. **26**(6): p. 1182-90.
109. Thies, F., et al., *Association of n-3 polyunsaturated fatty acids with stability of atherosclerotic plaques: a randomised controlled trial*. Lancet, 2003. **361**(9356): p. 477-85.
110. Bays, H.E., et al., *Prescription omega-3 fatty acids and their lipid effects: physiologic mechanisms of action and clinical implications*. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2008. **6**(3): p. 391-409.
111. Lavie, C.J., et al., *Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases*. J Am Coll Cardiol, 2009. **54**(7): p. 585-94.
112. Das, U.N., *Long-chain polyunsaturated fatty acids interact with nitric oxide, superoxide anion, and transforming growth factor-beta to prevent human essential hypertension*. Eur J Clin Nutr, 2004. **58**(2): p. 195-203.
113. Anand, R.G., et al., *The role of fish oil in arrhythmia prevention*. J Cardiopulm Rehabil Prev, 2008. **28**(2): p. 92-8.
114. Burr, M.L., et al., *Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART)*. Lancet, 1989. **2**(8666): p. 757-61.
115. *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*. Lancet, 1999. **354**(9177): p. 447-55.

116. Marchioli, R., et al., *Early protection against sudden death by n-3 polyunsaturated fatty acids after myocardial infarction: time-course analysis of the results of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI)-Prevenzione*. *Circulation*, 2002. **105**(16): p. 1897-903.
117. Mozaffarian, D., et al., *Fish oil and postoperative atrial fibrillation: the Omega-3 Fatty Acids for Prevention of Post-operative Atrial Fibrillation (OPERA) randomized trial*. *JAMA*, 2012. **308**(19): p. 2001-11.
118. Investigators, O.T., et al., *n-3 fatty acids and cardiovascular outcomes in patients with dysglycemia*. *N Engl J Med*, 2012. **367**(4): p. 309-18.
119. Risk, et al., *n-3 fatty acids in patients with multiple cardiovascular risk factors*. *N Engl J Med*, 2013. **368**(19): p. 1800-8.
120. Zeghichi-Hamri, S., et al., *Protective effect of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on myocardial resistance to ischemia-reperfusion injury in rats*. *Nutr Res*, 2010. **30**(12): p. 849-57.
121. Oskarsson, H.J., et al., *Dietary fish oil supplementation reduces myocardial infarct size in a canine model of ischemia and reperfusion*. *J Am Coll Cardiol*, 1993. **21**(5): p. 1280-5.
122. McGuinness, J., et al., *Myocardial protection using an omega-3 fatty acid infusion: quantification and mechanism of action*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2006. **132**(1): p. 72-9.
123. Rondeau, I., et al., *Effects of different dietary omega-6/3 polyunsaturated fatty acids ratios on infarct size and the limbic system after myocardial infarction*. *Can J Physiol Pharmacol*, 2011. **89**(3): p. 169-76.
124. Patel, J.V., et al., *Omega-3 polyunsaturated fatty acids: a necessity for a comprehensive secondary prevention strategy*. *Vasc Health Risk Manag*, 2009. **5**: p. 801-10.
125. Canada, S. *Lignes directrices sur la nutrition pendant la grossesse à l'intention des professionnels de la santé - Le poisson et les acides gras oméga-3*. 2009; Available from: <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/pubs/nutrition/omega3-fra.php>.
126. *Guidance for Industry Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers*, D.o.H.a.H. Services, Editor. 2005.
127. Harris, W.S., et al., *Towards establishing dietary reference intakes for eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids*. *J Nutr*, 2009. **139**(4): p. 804S-19S.
128. Mostowik, M., et al., *Omega-3 polyunsaturated fatty acids increase plasma adiponectin to leptin ratio in stable coronary artery disease*. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2013. **27**(4): p. 289-95.
129. Singh, P., et al., *Differential effects of leptin on adiponectin expression with weight gain versus obesity*. *Int J Obes (Lond)*, 2015.
130. McNamara, R.K., *Evaluation of docosahexaenoic acid deficiency as a preventable risk factor for recurrent affective disorders: Current status, future directions, and dietary recommendations*. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 2009. **81**: p. 223–231.
131. Harris, W.S. and C. Von Schacky, *The Omega-3 Index: a new risk factor for death from coronary heart disease?* *Prev Med*, 2004. **39**(1): p. 212-20.
132. Mori, T.A., *Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: epidemiology and effects on cardiometabolic risk factors*. *Food Funct.*, 2014. **5**: p. 2004–2019.
133. Rajagopal, S., K. Rajagopal, and R.J. Lefkowitz, *Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors*. *Nat Rev Drug Discov*, 2010. **9**(5): p. 373-86.
134. Rajagopal, S., et al., *Beta-arrestin- but not G protein-mediated signaling by the "decoy" receptor CXCR7*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(2): p. 628-32.
135. Ogita, H., et al., *Eicosapentaenoic acid reduces myocardial injury induced by ischemia and reperfusion in rabbit hearts*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2003. **41**(6): p. 964-9.

136. Stanley, W.C., R.J. Khairallah, and E.R. Dabkowski, *Update on lipids and mitochondrial function: impact of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids*. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2012. **15**(2): p. 122-6.