

Université de Montréal

**Effets d'une diète riche en oméga-3 sur l'infarctus du myocarde chez le rat**

par

Mélanie Dubois

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

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

Mai, 2007

© Mélanie Dubois, 2007



W

H

U58

2007

v.1.27

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Effets d'une diète riche en oméga-3 sur l'infarctus du myocarde chez le rat**

présenté par :

Mélanie Dubois

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Pierre Haddad, PhD., Président-rapporteur

Guy Rousseau, PhD., Directeur de recherche

Mohamed Benderdour, PhD., Membre du jury



## RÉSUMÉ

Les maladies cardiovasculaires constituent l'une des principales causes de mortalité dans les pays occidentaux. Elles semblent cependant avoir épargné certaines populations, notamment les Inuits et les Japonnais, deux peuples friands de poissons. Depuis cette constatation, de nombreux scientifiques ont étudié le rôle cardioprotecteur des acides gras essentiels oméga-3 ( $\omega$ -3) contenus dans la chair des poissons. Dans le présent mémoire, nous avons comparé les effets de deux diètes d'acides gras polyinsaturés sur l'infarctus du myocarde chez le rat.

Des rats ont été assignés de façon aléatoire à une diète spécifique, constituées d'une ration de base enrichie en  $\omega$ -3 (huile de poisson) ou en  $\omega$ -6 (huile de Soya), durant 8 semaines puis soumis à une ischémie de 40 minutes et à une reperfusion de 72 heures.

Les résultats obtenus montrent une taille de l'infarctus du myocarde significativement plus faible chez les rats  $\omega$ -3 en comparaison avec les rats  $\omega$ -6. Ils présentent également une diminution significative de l'activité de la caspase-3, laquelle est impliquée dans l'apoptose, ainsi qu'une augmentation significative de l'activité de AKT, une protéine kinase clé dans la survie cellulaire. On note cependant aucune différence du poids corporel et de la consommation en énergie entre les deux groupes expérimentaux. Aucune différence significative n'est observée en ce qui concerne le taux d'expression de la cyclo-oxygénase de type 2 (COX-2), une enzyme impliquée dans la synthèse des eicosanoïdes, et celui de TNF- $\alpha$ , une cytokine pro-inflammatoire.

Contrairement à nos attentes, nos résultats indiquent un taux d'agrégation des plaquettes significativement plus élevé chez les rats  $\omega$ -3 que chez les rats  $\omega$ -6.

Ces résultats montrent que les  $\omega$ -3 jouent un rôle protecteur dans l'infarctus du myocarde chez le rat impliquant probablement un effet anti-apoptotique.

**Mots clés :** Acide gras essentiels, acides gras polyinsaturés, oméga-3,  $\omega$ -3, huile de poisson, maladies cardiovasculaires, infarctus du myocarde, rat, apoptose, caspase-3, AKT, eicosanoïde, COX-2, TNF- $\alpha$ , cytokine, inflammation, agrégation plaquettaire.

## ABSTRACT

Cardiovascular diseases are one of the leading causes of death in western countries. However, it seems that it does not affect certain populations such as the Inuits and the Japanese who are heavy consumers of fish. Scientists have studied the cardioprotective role of omega-3 ( $\omega$ -3) essential fatty acids found in the fish meat. In the present work, we have studied the effects of two polyunsaturated fatty acids diets on myocardial infarction in the rat.

The rats have been randomly assigned to a specific diet, made of a basic portion enriched of  $\omega$ -3 enrichment (fish oil) or  $\omega$ -6 (Soya oil), during 8 weeks. After this period, myocardial infarction was provoked by a 40 minute ischemia and a 72 hour reperfusion.

Results show a significantly smaller size of the myocardial infarction for rats fed with  $\omega$ -3 compared to those fed with  $\omega$ -6. We observed a significant decrease of the caspase-3 activity, which is involved in apoptosis, and also a significant increase in the AKT activity, a key protein kinase of cellular survival. However we did not note any difference in body weight and energy consumption between the two groups. Similar results are observed concerning the expression rate of the type 2 cyclo-oxygenase (COX-2), an enzyme implicated in the synthesis of eicosanoids, and also of TNF- $\alpha$ , a pro-inflammatory cytokine. Unexpectedly, our results indicate a significantly higher platelet aggregation rate for the  $\omega$ -3 rats than for the  $\omega$ -6 rats.

These results show that the  $\omega$ -3 play a protective role in myocardial infarction of the rat involving an anti-apoptotic effect.

**Key words :** essential fatty acids, polyunsaturated fatty acid, omega-3,  $\omega$ -3, fish oil, cardiovascular disease, myocardial infarct, rat, apoptosis, caspase-3, AKT, eicosanoids, COX-2, TNF- $\alpha$ , cytokine, inflammation, platelet aggregation.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>III</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>V</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES.....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES.....</b>	<b>XI</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>XV</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>XVIII</b>
<b>I. INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1. ÉPIDÉMIOLOGIE.....	1
2. ACIDES GRAS.....	2
2.1. Structure et nomenclature.....	2
2.2. Principales sources alimentaires des acides gras.....	3
3. ACIDE GRAS POLYINSATURÉS OMÉGA-3 ET OMÉGA-6.....	5
3.1. Acides gras essentiels.....	5
3.2. Métabolisme.....	5
3.2.1. Système élongase/désaturase.....	5
3.2.2. Biosynthèse de AA, EPA et DHA.....	6
3.2.3. Régulations enzymatiques.....	7
3.3. Sources alimentaires.....	7
4. RÔLES PHYSIOLOGIQUES MAJEURS DES AGPI.....	9
4.1. Source énergétique.....	9
4.2. Constituants des membranes cellulaires.....	10
4.3. Précurseur des eicosanoïdes.....	11

4.3.1. Généralité.....	11
4.3.2. Biosynthèse.....	11
4.3.2.1. Voie des cyclo-oxygénases.....	13
4.3.2.2. Voie des lipoxygénases.....	14
4.3.3. Modes d'action.....	15
4.3.4. Effets.....	15
4.4. Ratio oméga-3/oméga-6.....	16
5. OMÉGA-3 ET MALADIES CARDIOVASCULAIRES.....	18
5.1 Coagulation et agrégation plaquettaire.....	18
5.2. Tension artérielle.....	19
5.3. Hypertriglycéridémie.....	19
5.4. Arythmie ventriculaire.....	20
5.5. Inflammation.....	21
6. INFARCTUS DU MYOCARDE.....	22
7. ISCHÉMIE ET REPERFUSION MYOCARDIQUE.....	22
7.1. Définition.....	22
7.2. Déséquilibre entre apport et demande en oxygène.....	23
7.3. Métabolisme.....	23
7.3.1. En condition de normoxie.....	24
7.3.2. En condition d'ischémie.....	25
7.4 Conséquences.....	26
7.4.1. L'ischémie réversible.....	26
7.4.2. L'ischémie irréversible.....	27

7.5 Les facteurs déterminants.....	29
7.5.1 La durée de l'ischémie.....	29
7.5.2 La zone à risque.....	29
7.5.3 Le débit collatéral.....	30
7.6 La reperfusion myocardique.....	31
7.6.1 La reperfusion sauve le myocarde ischémique.....	31
7.6.2 Les lésions de reperfusion.....	31
7.6.2.1 Adhésion des cellules inflammatoires et des plaquettes....	32
7.6.2.2 Surcharge calcique.....	33
7.6.2.3 Production de radicaux libres.....	33
7.6.2.4 Apoptose.....	34
8. APOPTOSE.....	35
8.1 Définition.....	35
8.2 Critères morphologiques.....	36
8.3 Mécanismes moléculaires.....	36
8.4 AKT.....	39
8.5 TNF- $\alpha$ .....	40
<b>II. OBJECTIF ET HYPOTHÈSE EXPÉRIMENTALE.....</b>	<b>41</b>
1. Objectif de l'étude.....	41
2. Hypothèse expérimentale.....	41
<b>III. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....</b>	<b>42</b>
1. Groupes expérimentaux.....	42
2. Procédures chirurgicales.....	45

3. Mesure de l'agrégation plaquettaire.....	45
4. Estimation de la taille de l'infarctus.....	48
5. Activité de la caspase-3.....	46
6. Immunobuvardage de type Western.....	47
7. Statistiques.....	49
<b>IV. RÉSULTATS.....</b>	<b>50</b>
1. Poids corporel et consommation d'énergie.....	50
2. Taille de l'infarctus (I/ZR) et aire de la zone à risque (ZR/VG).....	51
3. Agrégation plaquettaire.....	53
4. Expression de COX2 et de TNF- $\alpha$ .....	54
5. Activité de la Caspase-3.....	56
6. Activité de AKT.....	58
<b>V. DISCUSSION.....</b>	<b>59</b>
1. Poids corporel et consommation d'énergie.....	59
2. Taille de l'infarctus .....	61
3. Agrégation plaquettaire.....	63
4. Expression de COX-2 et de TNF- $\alpha$ .....	64
5. Activité de la Caspase-3 et AKT.....	65
<b>VI. CONCLUSION.....</b>	<b>67</b>
<b>VII. BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>68</b>

## **LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES**

**Tableau I :** Liste des acides gras les plus communs et leur source alimentaire.

**Tableau II :** Composition en acides gras  $\omega$ -3 (EPA et DHA) de différents produits d'origine animale (Quantité en grammes pour 100 grammes) [35].

**Tableau III :** Effets des eicosanoïdes issus des familles oméga-6 et oméga-3 sur différents organes du corps humain.

**Tableau IV :** Composants de la diète riche en  $\omega$ -3.

**Tableau V :** Composants de la diète riche en  $\omega$ -6.

**Figure 1 :** Voie de biosynthèse des acides gras polyinsaturés (AGPI) des familles  $\omega$ -3 et  $\omega$ -6 à partir des acides gras essentiels et métabolisation des AGPI en eicosanoïdes (prostanoïdes, leucotriènes) [16].

**Figure 2 :** Voie d'oxydation enzymatique de l'acide arachidonique (AA) et eicosapentaénoïque (EPA) conduisant à la synthèse des prostanoïdes (voie des cyclooxygénases) et des leucotriènes (voie des lipooxygénases) [16].

**Figure 3.** Extension de lésions irréversibles au cours de l'ischémie myocardique (Wavefront phenomenon). La nécrose s'étend de la zone sous-endocardique à la zone sous-épicaudique durant une ischémie sévère [98-99].

**Figure 4 :** Composantes majeures de la cascade apoptotique. L'apoptose met en jeu deux voies majeures qui perçoivent et intègrent les signaux de survie et de mort et qui régulent le déclenchement des cascades des caspases – la voie extrinsèque, initiée par le récepteur de mort cellulaire via un stimulus extracellulaire, et la voie intrinsèque, initiée par la mitochondrie via un stimulus intracellulaire.

**Figure 5.** Poids corporel (en gramme) des animaux ayant reçu l'une ou l'autre des diètes enrichies en acides gras polyinsaturés (diète enrichie en  $\omega$ -3 versus diète enrichie en  $\omega$ -6) durant les 8 semaines qui précèdent le protocole chirurgical. On ne dénote aucune différence significative entre les deux groupes.

**Figure 6.** Consommation de nourriture sous forme d'une diète enrichie d' $\omega$ -3 ou d'une diète enrichie d' $\omega$ -6 durant les 8 semaines qui précèdent le protocole chirurgical. Aucune différence significative dans la consommation de nourriture n'est observée entre les deux groupes.

**Figure 7.** La taille de l'infarctus (I), exprimée en pourcentage de la zone à risque (ZR), est significativement réduite chez les rats nourris avec une diète riche en  $\omega$ -3 (n=11) comparativement à ceux nourris avec une diète riche en  $\omega$ -6 (n=12) après 72 heures de reperfusion (\*  $p=0,0377$ ).

**Figure 8.** L'aire de la zone à risque (ZR), exprimée en pourcentage de l'aire du ventricule gauche (VG), est semblable chez les rats nourris avec une diète riche en  $\omega$ -3 ( $55,5 \pm 2,1$  pour n=11) et ceux nourris avec une diète riche en  $\omega$ -6 ( $48,3 \pm 3,4$  pour n=12) après 72 heures de reperfusion.

**Figure 9.** Le taux d'agrégation plaquettaire (en Ohms) dans le sang des rats nourris avec une diète riche en  $\omega$ -3 (n=5) est significativement plus élevé comparé à celui des rats nourris avec une diète riche en  $\omega$ -6 (n=5) après 72 heures de reperfusion (\*  $p=0,0461$ ).

**Figure 10.** L'expression de l'enzyme cyclo-oxygénase-2 (COX-2) dans le tissu cardiaque est semblable chez les deux groupes : rats nourris avec une diète riche en  $\omega$ -3 (n=6) et ceux nourris avec une diète riche en  $\omega$ -6 (n=5). Elle est exprimée à 100% chez le groupe  $\omega$ -6.

**Figure 11.** L'expression de la cytokine TNF- $\alpha$  est semblable dans le tissu cardiaque des rats nourris avec une diète riche en  $\omega$ -3 (n=6) et ceux nourris avec une diète riche en  $\omega$ -6 (n=5). Elle est exprimée à 100% chez le groupe  $\omega$ -6.

**Figure 12.** L'activité de la Caspase-3 dans la zone normale (zone non-ischémique) du tissu cardiaque des rats nourris avec une diète riche en  $\omega$ -3 (n=6) est réduite comparativement à ceux nourris avec une diète riche en  $\omega$ -6 (n=4). Elle est exprimée à 100% chez le groupe  $\omega$ -6.

**Figure 13.** L'activité de la Caspase-3 dans la zone à risque (zone ischémique) du tissu cardiaque des rats nourris avec une diète riche en  $\omega$ -3 (n=6) est réduite comparativement à ceux nourris avec une diète riche en  $\omega$ -6 (n=4) (\*  $p=0,0051$ ). Elle est exprimée à 100% chez le groupe  $\omega$ -6.

**Figure 14.** L'activation de la protéine l'AKT présent dans le tissu cardiaque ischémique des rats nourris avec une diète riche en  $\omega$ -3 (n=5) est significativement plus élevée comparativement à ceux nourris avec une diète riche en  $\omega$ -6 (n=5) (\*  $p=0,0337$ ). Elle est exprimée à 100% chez le groupe  $\omega$ -6.

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA	Acide arachidonique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AGPI	Acide gras polyinsaturé
AIF	<i>Apoptosis Inducing Factor</i>
AKT	Protéine kinase B
ALA	Acide alpha linoléique
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
APAF	<i>Apoptotic Protease Activating Factor</i>
ATP	Adénosine triphosphate
CAM	<i>Adhesion Molecule</i>
COX	Cyclo-oxygénase
DART	<i>Diet And Reinfarction Trial</i>
DIABLO	<i>Direct IAP Binding Protein with Low pI</i>
DGLA	Dihomo-gamma-linolénique
DHA	Acide docosahexaénoïque
EPA	Acide eicosapentaénoïque
ERK	<i>Extracellular Signal-Related Kinase</i>
FADD	<i>Fas-Associated Death Domain</i>
FADH	Flavine adénine dinucléotide
FAS	<i>Apoptosis Stimulating Sragment</i>
FLAP	<i>Five-Lipoxygenase-Activating Protein</i>

GISSI	Étude de la survie après un infarctus
GSK	<i>Glycogen Synthase Kinase</i>
HETE	Acide hydroxyeicosatetraenoique
I	Infarctus
ICAM	<i>Intercellular adhesion Molecule</i>
IL	Interleukine
JNK	<i>Jun N-terminal Kinase</i>
LA	Acide linoléique
LO	Lipoxygénase
LT	Leucotriène
LXR	<i>Liver X receptor</i>
MRFIT	<i>Multiple Risk Factor Intervention Trial</i>
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
n	Nombre
n-3	Oméga-3
n-6	Oméga-6
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear Factor-Kappa B</i>
NO	Monoxyde d'azote
p38 MAPK	<i>p38 Mitogen-activated Protein Kinase</i>
PARP	<i>Peroxisome proliferator activated receptor</i>
PG	Prostaglandine
PL	Phospholipase
PKA	Protéine kinase A

PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
RXR	<i>Retinoid X Receptor</i>
SMAC	<i>Second Mitochondria-Derived Activator of Caspases</i>
SREBP	Élément de régulation des stérois
TNF- $\alpha$	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
TNF-R	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha Receptor</i>
TRADD	<i>TNF-R1 Associated Death Domain Protein</i>
TX	Thromboxane
VCAM	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>
VLDL	Lipoprotéine de très basse densité
ZR	Zone à risque

## REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à mon directeur de recherche Dr. Guy Rousseau pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Je vous remercie pour votre contact chaleureux, pour votre patience ainsi que pour la qualité de l'encadrement lors de la réalisation de ce projet de maîtrise.

Je remercie Sevan Kaloustian, Boubarcar Pasto Wann et Thierno Madjou BAH pour leur patience et les explications scientifiques.

J'adresse ma vive reconnaissance à mes parents pour leur soutien psychologique et financier tout au long de mes études.

Je désire remercier le personnel technique de l'animalerie du Centre de Biomédecine de l'Hôpital Sacré-Cœur qui m'a toujours apporté son aide lors de mes travaux de recherche.

Enfin, ma gratitude va tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce projet de recherche.

# I. INTRODUCTION

## 1. ÉPIDÉMIOLOGIE

Au Canada, les maladies cardiovasculaires constituent la première cause de décès (Institut de recherche en santé du Canada). En 1998, elles ont enlevé la vie à 79 389 personnes au pays (Agence de santé publique du Canada). L'analyse de la fréquence des maladies cardiovasculaires dans différentes régions du globe montre d'importantes variations géographiques. La très faible incidence des maladies cardiovasculaires chez certaines populations, notamment les Inuits du Groenland (10 à 30 % plus faible qu'au Danemark), a été attribuée à leur alimentation riche en huile de poissons [1-2]. Depuis, les recherches ont démontré que les acides gras de la famille des oméga-3 ( $\omega$ -3) présents dans les huiles de poisson étaient probablement responsables de ces effets bénéfiques. L'étude « Physician's Health Study » et l'étude MRFIT, deux études en prévention primaire, ont montré qu'une forte concentration d' $\omega$ -3 dans le sang ou une consommation quotidienne d' $\omega$ -3 supérieure à 0,7 g réduit le risque de mort subite et le risque coronarien [3-4]. L'étude GISSI, une étude en prévention secondaire pour la survie après un infarctus, réalisée en Italie sur plus de 11 000 sujets, a montré qu'une supplémentation en  $\omega$ -3 associée à une diète méditerranéenne, entraînait une réduction de 23% du risque de mort subite sur une période de 3,5 ans (1999-2002). L'étude GISSI confirme ainsi les résultats de l'étude DART réalisée en 1994 chez plus de 2 000 hommes et qui a montré que les gens qui consomment 300 g de poisson/semaine présentaient une diminution de 29% du risque de mortalité comparativement à ceux qui n'en consommaient pas [5-6]. L'ensemble de ces études suggère que les  $\omega$ -3 exercent à travers

leur métabolisme, une action protectrice sur certains facteurs de risque impliqués dans les maladies cardiovasculaires.

## **2. ACIDES GRAS**

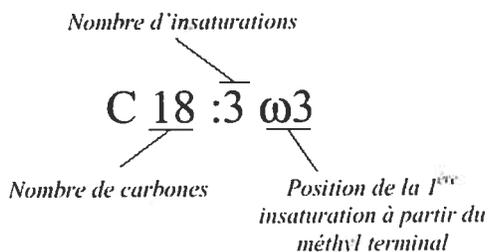
### **2.1. Structure et nomenclature**

Les acides gras sont des acides carboxyliques ( $R\text{-COOH}$ ) dont le radical  $R$  est une chaîne aliphatique de type hydrocarbure de longueur variable qui donne à la molécule son caractère hydrophobe. On les retrouve rarement à l'état libre dans la nature mais plutôt comme constituant des lipides. Ils existent essentiellement sous une forme estérifiée formant avec le cholestérol, les esters de cholestérol, et avec le glycérol, les triglycérides. Ainsi, ils neutralisent la fonction acide [7-8-9-10-11-12].

La majorité des acides gras retrouvés à l'état naturel possèdent une chaîne linéaire de 4 à 28 atomes de carbone. On parle d'acide gras à longue chaîne pour une longueur de 14 à 22 carbones et à très longue chaîne s'il y a plus de 22 carbones [7-8-9-10-11-12].

Les acides gras diffèrent par leur nombre d'atomes de carbone et par leur type de liaison entre ces atomes (liaison simple ou liaison double). Ainsi, ils sont appelés saturés lorsque toutes les liaisons sont simples et insaturés quand certaines d'entre-elles sont doubles. S'ils ne comportent qu'une seule double liaison, ils sont dits monoinsaturés, et s'ils en comportent deux ou plus, on les nomme polyinsaturés. Selon la commission de nomenclature biochimique, la position de la double liaison s'indique habituellement par la lettre "n" suivie d'un chiffre correspondant au nombre d'atomes de carbone à partir du

fragment CH<sub>3</sub> d'une extrémité de la chaîne jusqu'à la première double liaison [7-8-9-10-11-12].



Les acides gras se distinguent également par la forme géométrique de leur(s) double(s) liaison(s). Ces doubles liaisons sont généralement de conformation *cis* ce qui entraîne un pli rigide dans la chaîne aliphatique. Cette inflexion engendre davantage d'interférences stériques entre les groupes méthylènes voisins. Il en résulte alors une diminution des interactions moléculaires Van der Waals et, par conséquent, un état de grande énergie. Les liaisons *trans*, quant à elles, possèdent une forme géométrique linéaire proche de celle des acides gras saturés. Ces derniers possèdent un grand pouvoir de rotation autour des liaisons C-C successives conférant une grande flexibilité à la chaîne aliphatique, source de conformations multiples. Toutefois, la conformation la plus fréquente est celle en extension totale car elle réduit les répulsions stériques entre les groupes méthylènes voisins. [7-8-9-10-11-12].

## 2.2. Principales sources alimentaires des acides gras

Une grande partie des acides gras est apportée par l'alimentation. Cet apport est vital pour maintenir une lipidémie stable et pour obtenir les acides gras « essentiels » (voir section 2.1). [7-12-13-14-15].

Il existe deux types différents d'acide gras dans les aliments consommés, saturés et insaturés, ces derniers pouvant être de conformation *cis* ou *trans*. La plupart des graisses et des huiles comportent un mélange de ces quatre types, mais en général, un type d'acide gras y prédomine. [7-12-13-14-15].

**Tableau I** : Liste des acides gras les plus communs et leur source alimentaire [15].

<b>Nom français de l'acide gras</b>	<b>Formule</b>	<b>Source alimentaire</b>
<b>Acides gras saturés</b>		
Acide butyrique	C 4 :0	Beurre
Acide caprylique	C 8 :0	Huile de palme
Acide caprique	C 10 :0	Huile de noix de coco
Acide laurique	C 12 :0	Huile de noix de coco
Acide myristique	C 14 :0	Beurre, huile de noix de coco
Acide palmitique	C 16 :0	Toutes graisses et huiles
Acide stéarique	C 18 :0	Toutes graisses et huiles
Acide arachidique	C 20 :0	Lard, huile d'arachide
<b>Acides gras monoinsaturés</b>		
Acide palmitoléique	C 16:1 ω7	Toutes graisses et huiles
Acide oléique	C 18:1 ω9 (cis)	Toutes graisses et huiles
Acide elaidique	C 18:1 ω9 (trans)	Huiles végétales hydrogénées, beurre, graisse de bœuf
<b>Acides gras polyinsaturés</b>		
Acide linoléique	C 18 :2 ω6 (tous cis)	Toutes huiles végétales
Acide alpha-linolénique	C 18 :3 ω3 (tous cis)	Huiles de soja, colza, lin
Acide dihomogamma-linolénique	C 20 :2 ω6	Poissons gras
Acide Arachidonique	C 20 :4 ω6 (tous cis)	Graisse de porc, poulet
Acide eicosapentaénoïque	C 20 :5 ω3 (tous cis)	Poissons gras
Acide docosahexaénoïque	C 22 :6 ω3 (tous cis)	Poissons gras

### 3. ACIDE GRAS POLYINSATURÉS OMÉGA-3 ET OMÉGA-6

#### 3.1. Acides gras essentiels

Certains acides gras sont dit « essentiels » car le corps humain est incapable de les synthétiser par lui-même, ou les synthétise en quantité insuffisante. Les besoins de l'organisme doivent donc être comblés régulièrement par l'alimentation. Les acides gras polyinsaturés des séries  $\omega$ -3, dérivé de l'acide alpha linoléique (ALA, 18:3, n-3), et  $\omega$ -6, dérivé de l'acide linoléique (LA, 18:2, n-6), font partie des acides gras dits essentiels [7-12-13-14-15].

#### 3.2. Métabolisme

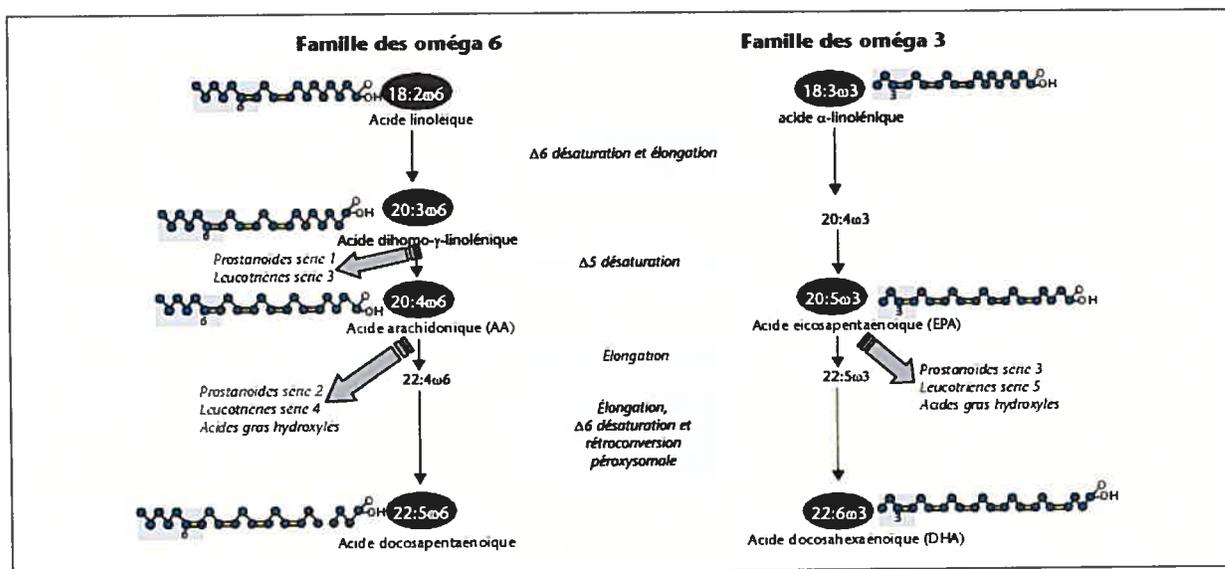
##### 3.2.1. Système élongase/désaturase

Les acides gras hautement polyinsaturés sont primordiaux pour maintenir diverses fonctions vitales [7-8]. La transformation des acides gras essentiels, que sont ALA et LA, en acides gras hautement polyinsaturés s'effectue via un système *élongase/désaturase* commun [17], lequel permet l'addition de deux unités de carbone à l'extrémité carboxyl de la chaîne ainsi que l'introduction d'une double liaison vers l'extrémité carboxyle de la chaîne par l'enlèvement de deux hydrogènes.

Le corps humain ne peut synthétiser les acides gras hautement polyinsaturés qu'à partir de ALA et LA apportés par l'alimentation puisqu'il est incapable de les synthétiser à partir de l'acétyl CoA, le substrat de départ fourni par la glycolyse ou par la dégradation d'acides gras ou d'acides aminés [18]. Cela s'explique par l'absence, chez les mammifères, des enzymes  $\omega$ 3- et  $\Delta$ 12-désaturase qui introduisent une double liaison

respectivement, au niveau des carbones numéro 3 et numéro 6 [18]. Ainsi, la synthèse des acides gras hautement polyinsaturés à partir de ALA et LA requièrent deux désaturases liées à la membrane du réticulum endoplasmique, soit les  $\Delta 6$ - et  $\Delta 5$ -désaturases [19]. Celles-ci sont largement exprimées dans les tissus humains, principalement dans le foie [20-21].

### 3.2.2. Biosynthèse de AA, EPA et DHA



**Figure 1** : Voie de biosynthèse des acides gras polyinsaturés (AGPI) des familles  $\omega$ -3 et  $\omega$ -6 à partir des acides gras essentiels et métabolisation des AGPI en eicosanoïdes (prostanoides, leucotriènes) [16].

Le métabolisme des familles  $\omega$ -3 et  $\omega$ -6 suit deux voies parallèles. Au cours de ces voies métaboliques, au moins trois enzymes sont impliquées : la  $\Delta 6$ -désaturase, l'élongase et la  $\Delta 5$  désaturase [16-18-22]. Au cours du métabolisme des acides gras hautement polyinsaturés, des composés comme la dihomog- $\gamma$ -linolénique (DGLA, 20 :3, n-6), l'acide arachidonique (AA, 20 :4, n-6), ou dans l'autre famille, l'acide eicosapentaénoïque (EPA, 20 :5, n-3) et l'acide docosahexaénoïque (DHA, 22 :6, n-3)

sont synthétisés [16-18-22]. Ils serviront, entre autres choses, de précurseurs pour la synthèse des eicosanoïdes dont les rôles physiologiques sont considérables [16].

### **3.2.3. Régulations enzymatiques**

Les enzymes métaboliques impliquées dans la synthèse des acides gras hautement polyinsaturés sont soumises à des régulations. La régulation principale s'opère au niveau de la  $\Delta 6$ -désaturase qui représente l'enzyme limitante de ces voies métaboliques [23]. Cette enzyme utilise comme co-facteur le zinc et le magnésium, qui sont nécessaires à son bon fonctionnement [24]. Son activité est également modulée par des facteurs nutritionnels et hormonaux [25-26]. Ainsi, son activité augmente lors d'un régime enrichi en protéines ou en acides aminés, carencé en acides gras essentiels ou lors d'hypoinsulinémie. L'activité de l'enzyme diminue lors du jeûne, dans les régimes riches en glucides, avec l'âge et en présence de glucagon, d'adrénaline, de cortisol et de thyroxine [27-28-29-30-31].

### **3.3. Sources alimentaires**

Chaque année, les  $\omega$ -3 et leurs propriétés font l'objet de nombreuses recherches. Des recommandations ont été émis au sujet de l'apport en  $\omega$ -3, qui se résume à environ un ou deux grammes par jour [32].

Les  $\omega$ -3 se retrouvent sous différentes formes en fonction de leur origine animale (EPA ou DHA) ou végétale (ALA) [35-36-37-38]. Ils n'ont pas les mêmes propriétés ni les mêmes biodisponibilités. Théoriquement, ALA devrait être suffisant à l'organisme puisqu'elle est censée se convertir en EPA et DHA. Hélas, dans la pratique, cette

transformation n'a pas toujours lieu [35]. Plusieurs études indiquent que la conversion de ALA chez l'humain est très variable et implique plusieurs facteurs [39-44]. Emken *et al* révèlent qu'une diète riche en DHA inhibe la conversion de ALA en acides gras à longue chaîne par une rétroaction [40]. De plus, une consommation excessive de ALA inhibe la conversion en raison de l'augmentation de la concentration de DHA plasmatique et cellulaire [41]. D'autres facteurs ont un rôle important dans la conversion de ALA dont le genre (la conversion apparaît plus élevée chez les femmes probablement en raison du taux d'œstrogène) [42-44], l'âge, la génétique et les caractéristiques physiologiques [56]. Le stress et la grossesse peuvent aussi augmenter la conversion de ALA [43-44-56].

Il semble que les effets bénéfiques des  $\omega$ -3 sur la santé soit généralement associés aux acides gras polyinsaturés à 20 et 22 atomes de carbones plutôt que les précurseurs à 18 atomes de carbones comme ALA. Il vaut donc mieux apporter au corps les trois types d' $\omega$ -3: ALA, EPA et DHA [35]. Les poissons gras en constituent les meilleures sources mais certaines plantes en contiennent également des quantités intéressantes.

**Tableau II :** Composition en acides gras  $\omega$ -3 (EPA et DHA) de différents produits d'origine animale (Quantité en grammes pour 100 grammes) [35].

Source	(EPA + DHA) g/100 g
Hareng	3
Maquereau	2,5
Truite de mer	1,6
Saumon atlantique	1,2
Thon, truite arc-en-ciel, huître, moules	0,5
Crabe, crevettes	0,4
Morue atlantique	0,3
Espadon, homard	0,2

## 4. RÔLES PHYSIOLOGIQUES MAJEURS DES AGPI

### 4.1. Source énergétique

Les acides gras polyinsaturés dont AA, EPA et DHA constituent une importante source d'énergie métabolique pour l'organisme. Étant des lipides, ils libèrent deux fois plus d'énergie que les glucides et les protéines. Les acides gras sont essentiellement stockés dans le cytoplasme des adipocytes. L'ensemble des adipocytes forme le tissu adipeux, lequel est abondamment présent dans la couche sous-cutanée et dans la cavité abdominale. Cette réserve lipidique permet de survivre sans manger pendant deux ou trois mois contrairement à la réserve en glycogène, qui ne peut pourvoir aux besoins énergétiques que pour une période inférieure à un jour. En plus d'emmagasiner de l'énergie, le tissu adipeux sous-cutané sert d'amortisseur pour protéger les organes vitaux et procure une isolation thermique [7-8].

Les graisses et les huiles que l'on retrouve dans notre alimentation sont principalement des triglycérides (environ 90%). Les triglycérides sont digérés dans le système sanguin par la lipoprotéine-lipase, excrétée par les cellules adipocytes, en glycérol et en acides gras. Ces derniers sont alors dégradés en corps cétoniques par  $\beta$ -oxydation afin de produire de l'énergie métabolique sous forme d'ATP. L'oxydation des acides gras se réalise aussi bien dans les peroxysomes que dans les mitochondries. À chaque tour de  $\beta$ -oxydation, l'acide gras perd deux carbones, sous la forme d'une molécule d'acétyl-CoA. Cette molécule d'acétyl-CoA entre alors dans le cycle de Krebs, d'où une production d'énergie. L'oxydation complète d'un acide gras est un processus fortement exergonique qui assure la formation de nombreuses molécules d'ATP [7-8].

#### 4.2. Constituants des membranes cellulaires

Les acides gras polyinsaturés dont AA, EPA et DHA sont les constituants directs des lipides membranaires, ils sont incorporés en position 2 dans les phospholipides membranaires. La composition en acides gras polyinsaturés de ces phospholipides donne aux membranes des propriétés physiques particulières, telles que l'élasticité et la viscosité. En effet, la membrane résiste mieux à la solidification si elle comporte des phospholipides portant des queues hydrocarbonées insaturées. L'encombrement stérique engendré par les inflexions des insaturations génèrent un certain désordre dans la structure de la membrane responsable de la fluidité des membranes [7-8]. Un changement dans la composition des acides gras polyinsaturés des membranes cellulaires peuvent influencer la fluidité de celle-ci, et occasionner des altérations nuisent à l'activité des récepteurs antigéniques, à la façon des molécules de se lier aux enzymes, à la perméabilité aux ions (particulièrement  $Ca^{++}$ ) [45] ou à l'expression des gènes [46].

Comme l'existence des cellules est conditionnée par la qualité de la fluidité de leur membrane afin de réaliser des fonctions de barrière et d'échange, la structure des acides gras polyinsaturés en fonction de la température peut alors avoir des conséquences vitales pour les organismes vivants. Afin de maintenir la fluidité membranaire en fonction de conditions changeantes, l'organisme peut modifier la composition en acides gras polyinsaturés de leurs lipides membranaires par l'intermédiaire de la biosynthèse et de la dégradation des lipides [7-8]. Par exemple, ces acides gras permettent au poisson de nager dans les mers froides. C'est pour cette raison que le taux en oméga-3 varie considérablement selon la provenance des poissons. Les poissons pêchés dans les mers

chaudes, comme le thon Albacore, renferment beaucoup moins d'oméga-3 comparé à ceux des mers froides [35].

### **4.3. Précurseur des eicosanoïdes**

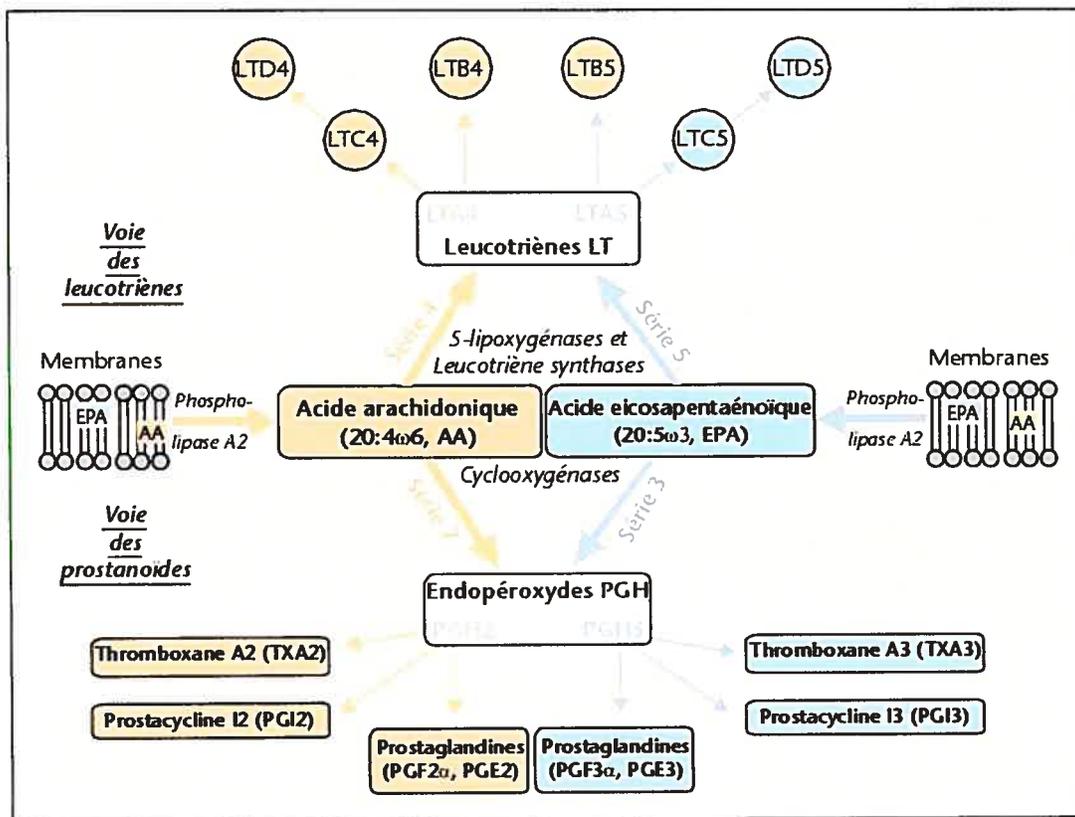
#### **4.3.1. Généralité**

Les eicosanoïdes constituent un grand groupe de médiateurs locaux (autocrines et/ou paracrines) aux fonctions très diverses. Ils sont formés à partir d'un acide gras polyinsaturé à 20 atomes de carbone (eicosa=20, en grec), principalement l'AA (20 :4), un composant majeur de la membrane plasmique. Ils sont inactivés très rapidement (quelques secondes ou quelques minutes) et agissent donc essentiellement dans un rayon d'action limité. Sont classés sous le terme 'eicosanoïde, les prostaglandines (PG), les thromboxanes (TX) et les leucotriènes (LT) [7-47].

#### **4.3.2. Biosynthèse**

Presque toutes les cellules de l'organisme peuvent synthétiser des eicosanoïdes. Leur synthèse débute dans la membrane plasmique par la libération d'AA (ou EPA) à partir des phospholipides auxquels il se trouve estérifié en position 2-acyl. Cette réaction est catalysée essentiellement par la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), qui hydrolyse les groupes acyls en C<sub>2</sub> des glycérophospholipides, et dont l'activité est étroitement contrôlée [7-16-47]. Cette enzyme cytosolique est activée suite à un gonflement cellulaire (stimulus mécanique) [47] ou une augmentation intracellulaire de Ca<sup>2+</sup> (stimulus chimique) [48]. Son activité est stimulée par une série de médiateurs, comme l'histamine, la bradykinine et la sérotonine, et inhibée par les glucocorticoïdes (via la lipocortine) et l'adrénaline (via

les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques) [47]. Une fois libéré, l'AA (ou EPA) est utilisé par plusieurs voies métaboliques dont celles menant à la formation des eicosanoïdes. L'AA (ou EPA) est particulièrement oxydé par l'un des deux types de métallo-enzymes à fer lié à la membrane du côté intracellulaire, soit les cyclo-oxygénases et les lipoxygénases [7-16-47].



**Figure 2 :** Voie d'oxydation enzymatique de l'acide arachidonique (AA) et eicosapentaénoïque (EPA) conduisant à la synthèse des prostanoides (voie des cyclooxygénases) et des leucotriènes (voie des lipoxygénases) [16].

#### 4.3.2.1. Voie des cyclo-oxygénases

La cyclo-oxygénase (COX) existe sous trois isoformes : COX-1, COX-2 et COX-3, cette dernière étant une variante de COX-1 [49-50-51]. Les isoformes COX-1 et COX-3 sont constitutives et ont un rôle cytoprotecteur en maintenant l'homéostasie au niveau de différents organes comme l'estomac ou les reins alors que l'isoforme COX-2, est inductible et présente principalement dans les foyers inflammatoires (COX-2 est exprimée constitutivement dans certaines régions du cerveau) [53].

COX possède deux fonctions enzymatiques : une fonction dite cyclo-oxygénase, responsable de la cyclisation et de l'oxydation de l'AA en PGG<sub>2</sub> suite à l'insertion de deux molécules d'oxygène, et une fonction peroxydase qui réduit les PGG<sub>2</sub> en PGH<sub>2</sub>. La PGH<sub>2</sub> est hautement instable et son isomérisation ou réduction permet la production de divers métabolites. En effet, la PGH<sub>2</sub> est le précurseur immédiat de toutes les prostaglandines de la série 2 (PG<sub>2</sub>), des prostacyclines (PGI) et des thromboxanes (TX). Ces différents métabolites finaux auront un rôle à jouer dans diverses fonctions de l'organisme. Le devenir de PGH<sub>2</sub> dépend alors du tissu impliqué et des activités relatives des enzymes catalysant les interconversions spécifiques [7-16-54-55]. Ainsi, les plaquettes, qui contiennent la *thromboxane synthase*, assure la formation de thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), un vasoconstricteur et un stimulateur de l'agrégation plaquettaire. Quant aux cellules endothéliales vasculaires, elles produisent la prostacycline I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) qui est un vasodilatateur et un inhibiteur de l'agrégation plaquettaire [57-58]. Ces deux substances ont des effets antagonistes assurant ainsi l'équilibre dans le système cardiovasculaire.

EPA sert aussi de substrats à la COX. Il mène à la formation des prostanoïdes de la série 3 dont le PGE<sub>3</sub> et PGI<sub>3</sub>, lequel possède des propriétés anti-agrégant, anti-inflammatoire et anti-mitogène [59], et le TXA<sub>3</sub>, qui est faiblement pro-agrégant [60]. Selon Fisher, la formation du TXA<sub>3</sub> inactif serait la réduction du thromboxane A<sub>2</sub> et pourrait contribuer à réduire l'activité des plaquettes après consommation de EPA [60]. Il existe donc 3 familles de prostanoïdes : ceux des séries 1 et 2 proviennent des acides gras de la famille  $\omega$ -6 alors que ceux de la troisième série, des acides gras de la famille des  $\omega$ -3 [16].

#### 4.3.2.2. Voie des lipoxygénases

La 5-lipoxygénase (5-LO), nommée ainsi en fonction de l'atome de carbone sur lequel se fixe l'oxygène (peroxyde), est présente dans le cytoplasme des cellules inflammatoires (leucocytes, mastocytes, macrophages). Son activité nécessite la présence d'une protéine membranaire appelée FLAP (Five-Lipoxygenase-Activating Protein) qui, suite à un stimulus inflammatoire, fixe l'AA et le met à la disposition de l'enzyme. La première réaction dans la transformation de l'AA en leucotriènes est son oxydation par la 5-LO pour donner du 5-HPETE, une substance n'ayant aucune propriété physiologique propre et qui est transformée en un époxyde instable, la leucotriène A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>). Le devenir de l'époxyde dépend des activités des enzymes catalysant les interconversions spécifiques. Ainsi, grâce à une *hydrolase*, la LTA<sub>4</sub> peut aussi être convertie en LTB<sub>4</sub>, un agent chimiotactique puissant impliqué dans les processus inflammatoires [7-16-61-62].

Tout comme AA, EPA sert de substrat à la 5-LO. Il mène à la formation des leucotriènes de la série 5 (LT<sub>5</sub>) lesquelles sont de faibles inducteurs de l'inflammation et

de faibles agents chimiotactiques. Il existe plusieurs familles de leucotriènes dont les  $LT_4$ , issues des acides gras de la famille  $\omega$ -6, et les  $LT_5$  qui sont issues de la famille des  $\omega$ -3 [16-63-64-65].

#### **4.3.3. Modes d'action**

Les eicosanoïdes agissent sur des récepteurs membranaires à proximité immédiate de leur site de formation. Ils peuvent agir aussi bien de façon autocrine (sur la cellule sécrétrice) que de façon paracrine (sur des cellules voisines) [47]. Ces hormones liposolubles se fixent à des récepteurs transmembranaires à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G siégeant à la surface de la cellule ce qui stimulent (e.g.  $G_s$ ) ou inhibent (e.g.  $G_i$ ) la protéine effectrice [8-16-58]. Il s'ensuit alors une chaîne réactionnelle où interviennent plusieurs messagers seconds : l'AMPc, qui active la protéine kinase A (PKA); la phospholipase  $A_2$ , qui catalyse la libération de l'AA menant à la synthèse des eicosanoïdes; la phospholipase C (PLC), qui induit une vasoconstriction et la contraction des muscles lisse via un accroissement du taux cytosolique de  $Ca^{2+}$  [66]. En plus des récepteurs membranaires, les eicosanoïdes mettent aussi en œuvre l'activation de facteurs nucléaires de transcription tels que les récepteurs activables par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR) et la protéine de liaison à l'élément de régulation des stérols (SREBP-1c) [16-69].

#### **4.3.4. Effets**

Les effets des eicosanoïdes sont très complexes, chaque molécule possède ses particularités et il est difficile de dresser un tableau exhaustif de leur rôle respectif. Toutefois, un résumé non exhaustif de ces actions se retrouve dans le tableau III.

**Tableau III :** Effets des eicosanoïdes issus des familles oméga-6 et oméga-3 sur différents organes du corps humain [67].

Organes	Effets	Eicosanoïdes
Vaisseaux	Vasoconstriction (hypertension)	PGF <sub>2</sub> , TXA <sub>2</sub> , LTC <sub>4</sub> , LTD <sub>4</sub>
	Vasodilatation (Hypotension)	PGI <sub>2</sub> (le plus actif), PGE <sub>2</sub> , PGD <sub>4</sub>
Plaquettes	Anti-agrégant	PGE, PGI <sub>2</sub>
	Pro-agrégant	TXA <sub>2</sub>
Bronches	Bronchoconstriction	PGF <sub>2</sub> , TXA <sub>2</sub> , LTC <sub>4</sub> , LTD <sub>4</sub>
	Bronchodilatation	PGE, PGI <sub>2</sub>
Intestin	Nausées, diarrhées	PGE, PGF
	Motilité	PGE <sub>2</sub> , PGF <sub>2</sub>
Estomac	Inhibition de la sécrétion gastrique	PGE, PGI <sub>2</sub>
	Motilité	PGE <sub>2</sub> , PGF <sub>2</sub>
Utérus	Contraction	PGE <sub>2</sub> , PGF <sub>2</sub> , TXA <sub>2</sub>
Rein	Augmentation de la filtration rénale par augmentation du débit sanguin.	PGH <sub>2</sub> , PGE <sub>1</sub> , PGI <sub>2</sub>
Hypothalamus et Hypophyse	Augmentation hypothalamique et hypophysaire (ACTH, GHRH)	PGE <sub>1</sub> , PGE <sub>2</sub>

#### 4.4. Rapport oméga-3/oméga-6

Bien que les réactions de désaturation ou d'élongation au sein des familles  $\omega$ -3 et  $\omega$ -6 soient réalisées par les mêmes enzymes et cofacteurs (vitamines B<sub>3</sub>, B<sub>6</sub>, C et E et minéraux Mg et Zn) [24], il n'existe pas de passage possible entre les deux voies métaboliques, autrement dit un  $\omega$ -3 ne peut être converti en  $\omega$ -6 et inversement [22-68].

En revanche, des études *in vitro* et *in vivo* montrent que des phénomènes de compétition se produisent entre les deux séries [16-24]. Les deux séries possèdent des propriétés et des activités différentes sur de nombreuses cibles dans des pathologies majeures telles que les maladies cardiovasculaires, cancéreuses et inflammatoires. L'excès d'apport de l'un des précurseurs peut compromettre la production des acides gras dérivés de l'autre. L'alimentation doit donc apporter à l'organisme chacune de ces deux familles puisque aucune transformation métabolique ou substitution fonctionnelle n'est possible entre ALA et LA. Il apparaît que, sous conditions normales, les enzymes en question ont une préférence envers les acides gras de la série  $\omega$ -3 plutôt que la série  $\omega$ -6 [70]. Mais le régime alimentaire occidental, riche en acides gras  $\omega$ -6, vient déséquilibrer le rapport avec les  $\omega$ -3 allant de 10 :1, 25.1 à 40 :1 [70]. Ces rapports élevés sont causés par le développement industriel des huiles végétales modernes qui a dramatiquement augmenté la consommation d'acides gras  $\omega$ -6 sous la forme d'acide linoléique [37]. De plus, l'introduction de la technique d'hydrogénation dans le conditionnement des huiles végétales, a considérablement fait diminuer le taux d'acide alpha linoléique dans celles-ci. Il est primordial que les déséquilibres en acides gras essentiels soient corrigés par une consommation de quantités d'acides gras appropriés. De plus, les effets opposés des familles d'acides gras  $\omega$ -6 et  $\omega$ -3 doivent être pris en compte dans l'atteinte d'un équilibre optimal pour assurer à la fois l'homéostasie et le développement normal de l'organisme. Un ratio de 5 pour 1 en acides gras  $\omega$ -6 et  $\omega$ -3 est considéré comme un rapport fonctionnel optimum [32]. Certains auteurs recommandent même un rapport  $\sim$  1 pour 1 [33].

## 5. OMÉGA-3 ET MALADIES CARDIOVASCULAIRES

### 5.1 Coagulation et agrégation plaquettaire

Les  $\omega$ -3 (EPA, DHA) diminuent l'agrégation plaquettaire responsable de la formation de caillots et favorisent la dilatation des vaisseaux sanguins [34-72]. Ils ont une action anti-hémostatique et anti-thrombotique [71-72]. L'action des  $\omega$ -3 est le résultat d'une compétition avec les  $\omega$ -6. Une diète riche en  $\omega$ -3 réduit la disponibilité de l'AA à l'intérieur de la membrane des phospholipides et, par conséquent, diminue la production des eicosanoïdes dérivés de l'AA [72]. Elle peut aussi réduire l'expression ou l'activité des enzymes impliquées dans la synthèse des eicosanoïdes. L'action des  $\omega$ -3 s'explique généralement par l'inhibition des prostanoïdes des séries 1 et 2. Ces séries contiennent les vasodilatateurs  $PGE_{1,2}$  et  $PGI_2$  mais aussi le  $TXA_2$ , un puissant vasoconstricteur qui stimule l'agrégation des plaquettes. À l'inverse,  $TXA_3$  issu de la famille des  $\omega$ -3 est faiblement pro-agrégant [34]. Ainsi, les prostanoïdes de la série 3 ( $PGE_3$ ,  $PGI_3$ , et  $TXA_3$ ) favorise la vasodilatation et fluidifie le sang. Par contre, une forte consommation d'  $\omega$ -3 peut entraîner un allongement du temps de saignement [73-74] comparable à l'aspirine. L'équilibre cardiovasculaire dépend donc de l'action simultanée et antagoniste des prostanoïdes issus des acides gras  $\omega$ -6 et  $\omega$ -3. Toute substance modulant la fonction plaquettaire a une influence importante sur la possibilité de subir un infarctus du myocarde.

## 5.2. Tension artérielle

Les  $\omega$ -3 peuvent abaisser la tension artérielle en intervenant sur plusieurs processus, dont la vasodilatation, la vasoconstriction [75] et l'agrégation plaquettaire du sang. Ils agiraient aussi sur des facteurs impliqués dans la rigidité et la relaxation des artères [34]. En effet, les  $\omega$ -3 modifient la fonction vasculaire en augmentant la libération de l'oxyde nitrique (NO), un vasodilatateur, et celle des prostanoïdes vasoactives [76]. Pour certains auteurs, ils amplifient l'effet des médicaments hypotenseurs comme le propranolol, un antagoniste du récepteur  $\beta$ -adrénergique [34-76].

## 5.3. Hypertriglycémie

Les acides gras hautement insaturés contrôlent le métabolisme des acides gras en activant la voie catabolique ( $\beta$ -oxydation) et en réprimant la voie anabolique (synthèse des acides gras, des triglycérides, des VLDL). Plusieurs études montrent que les  $\omega$ -3 inhibent plus fortement la synthèse des triglycérides et des VLDL que les  $\omega$ -6 réduisant ainsi ces lipoprotéines dans le sang, et par conséquent, diminuant le risque d'hypertriglycémie [78-79]. Une baisse notable de la triglycémie s'observe en particulier chez les sujets hypertriglycémiques [80]. Les mécanismes mis en jeu ne sont pas entièrement connus mais semblent impliquer une diminution de SREBP-1c, un facteur de transcription stimulant la synthèse des enzymes impliquées dans la lipogénèse [81]. En effet, l'EPA et le DHA agissent sur certains facteurs de transcription [81-82-83]. Ils agissent en se liant sur les récepteurs nucléaires (PPAR, RXR, LXR) ou en inhibant la transcription du récepteur lui-même (SREBP-1c). Le PPAR apparaît impliqué dans la

dégradation des lipides [84] et SREBP dans l'inhibition de la synthèse des triglycérides [85].

#### 5.4. Arythmie ventriculaire

Les arythmies ventriculaires sont causées par une activité électrique irrégulière du tissu cardiaque [34]. Leaf *et al* ont montré que la présence d'acide gras  $\omega$ -3 dans les membranes des cardiomyocytes réduit l'incidence des arythmies ventriculaires via l'altération de leurs fonctions électrophysiologiques [86]. En effet, l'effet anti-arythmique des  $\omega$ -3 est lié à la diminution de l'excitabilité électrique des cellules et à la modulation de l'activité des canaux ioniques (sodium, calcium et potassium)[87-88]. Les  $\omega$ -3 agissent en inhibant le courant sodique, lequel initie les potentiels d'action, et le courant calcique de type L, lequel initie la libération de calcium de la réserve calcique du réticulum sarcoplasmique vers le cytosol des cardiomyocytes. L'augmentation de la concentration de calcium dans le cytosol initie la contraction et la fréquence de battement des cellules cardiaques [86]. De plus, les  $\omega$ -3 influencent la variabilité de la fréquence cardiaque. La variabilité cardiaque est la propension du cœur à varier de fréquence en fonction des événements (ex : effort, émotion). Plus la variabilité instantanée du rythme cardiaque est élevée, plus le risque de fibrillation ventriculaire diminue. Les  $\omega$ -3 peuvent ainsi avoir un effet anti-arythmique par l'intermédiaire du système nerveux autonome qui contrôle l'activité électrique du cœur et en particulier la variabilité du rythme cardiaque [22]. Des recherches montrent que la variabilité du rythme cardiaque est fortement dépendante de la concentration en  $\omega$ -3 du cœur et du sang. Christensen *et al* révèlent qu'une supplémentation de 5,2 grammes de EPA et DHA par jour pour une période de 12

semaines augmente la variabilité cardiaque des personnes ayant survécues un infarctus du myocarde, donc une diminution du risque d'arythmie ventriculaire [89].

### 5.5. Inflammation

Les effets anti-inflammatoires des  $\omega$ -3 peuvent s'effectuer par la modulation de la production des eicosanoïdes dérivés des  $\omega$ -6. Les  $\omega$ -3 opposent leurs métabolites à ceux des  $\omega$ -6 en produisant largement de la  $PGE_3$  et des  $LTB_5$  lesquelles inhibent, par compétition enzymatique, la synthèse des médiateurs pro-inflammatoires que sont la  $PGE_2$  et le  $LTB_4$  [90]. Les propriétés bénéfiques des  $\omega$ -3 au niveau inflammatoire impliquent également l'inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires par les monocytes/macrophages dont les interleukines 1- $\beta$ (IL1- $\beta$ ) et 6 (IL-6) et le *Tumor Necrosis Factor alpha* (TNF- $\alpha$ ) [94]. Les  $\omega$ -3 affectent aussi l'expression des molécules d'adhésion (sélectines, intégrines, CAM) impliquées dans l'interaction des leucocytes avec les cellules endothéliales menant à l'infiltration des leucocytes au site inflammatoire [71-91-92]. En plus de leur action sur les cytokines pro-inflammatoires et les molécules d'adhésion, EPA et DHA peuvent supprimer la signalisation de NF- $\kappa$ B, lequel active les molécules d'adhésion [93]. Sachant que l'inflammation joue un rôle dans la progression de l'athérosclérose, les  $\omega$ -3 peuvent ainsi stabiliser les plaques d'athéroscléroses par leur action anti-inflammatoire.

## **6. INFARCTUS DU MYOCARDE**

L'infarctus du myocarde est la conséquence immédiate d'une obstruction complète et brutale d'une artère coronaire ou de l'une de ses ramifications [95]. Le cœur est un organe à risque d'infarctus car ses différents territoires sont nourris par une seule artère dont la vascularisation se fait sans anastomoses (« pont » reliant les artères entre elles afin d'assurer une perfusion sanguine même lorsqu'une artère se bouche) [96]. Dans plus de 90% des cas, l'infarctus a lieu suite à une thrombose coronaire occlusive provoquée par une fissuration ou une rupture d'une plaque d'athérome coronaire. Privées subitement d'oxygène, les cellules cardiaques du territoire irrigué normalement par l'artère en question subissent des lésions irréversibles. Les cellules, ne parvenant plus à se contracter, meurent en quelques heures. Un tissu fibreux non contractile se substitue alors aux cellules cardiaques mortes, affaiblissant l'action de pompage du cœur [95-97]. La gravité de l'infarctus dépend de son étendue : plus l'artère obstruée irrigue une région importante, plus l'étendue de la lésion est importante.

## **7. ISCHÉMIE ET REPERFUSION MYOCARDIQUE**

### **7.1. Définition**

Une ischémie myocardique est un déficit de perfusion sanguine dans un territoire limité du myocarde (muscle cardiaque). Ce déficit entraîne essentiellement une baisse de l'oxygénation du muscle cardiaque en deçà de ses besoins (hypoxie), voire même une suppression de l'apport en oxygène au tissu (anoxie), altérant ainsi sa fonction. La cause la plus fréquente de l'ischémie myocardique est l'obstruction d'une artère coronaire par

une plaque d'athérome ou un thrombus coronaire, mais des spasmes irréguliers des vaisseaux coronaires sont aussi à craindre [98-99].

## **7.2. Déséquilibre entre apport et demande en oxygène**

D'un point de vue dynamique, l'ischémie myocardique est le résultat d'un déséquilibre entre la demande en oxygène du myocarde et les apports assurés par la circulation coronaire. L'équilibre entre l'apport et le besoin doit être régulé instantanément car le myocarde ne dispose d'aucune réserve énergétique (pas de glycogène) contrairement au muscle squelettique. Une augmentation de la demande en oxygène du myocarde, comme au cours d'une tachycardie, peut être la source d'un déséquilibre. Mais, le plus souvent, on observe soit la combinaison d'une augmentation de la demande et d'une réduction des apports en oxygène du myocarde (ex.: angine d'effort), soit une réduction des apports dans une zone limitée du cœur (ex.: infarctus du myocarde) [98-99].

## **7.3. Métabolisme**

Le myocarde est un grand consommateur d'énergie. Cette énergie lui permet d'assurer sa fonction contractile et de subvenir aux besoins de ses systèmes cellulaires énergie-dépendant. Son apport énergétique est assuré par la synthèse de molécules d'ATP via l'oxydation de substrats apportés au myocarde par les artères coronaires. Les acides gras, le glucose et le lactate sont les principaux substrats oxydés par le tissu cardiaque [100]. Le métabolisme oxydatif est entretenu par le cycle de l'acide citrique qui fournit des équivalents réducteurs (NADH et FADH<sub>2</sub>) à partir de l'acétyl CoA provenant des

substrats métaboliques. Les équivalents réducteurs obtenus vont alimenter la phosphorylation oxydative aboutissant à la formation de molécules d'ATP formées à partir de l'ADP et de l'acide phosphorique [98-99-101]. Ces réactions chimiques ont lieu dans les mitochondries. Les mitochondries occupent près de 25% du volume des cellules musculaires cardiaques, contre seulement 2% dans le muscle squelettique. Leur abondance démontre donc le besoin d'un apport élevé et continu d'oxygène dans le muscle cardiaque pour son métabolisme énergétique. Possédant une respiration essentiellement aérobie (plus de 90%), le muscle cardiaque ne peut donc pas fonctionner adéquatement lors d'une lourde dette en oxygène, contrairement aux muscles squelettiques [100].

### **7.3.1. En condition de normoxie**

En présence d'oxygène, l'énergie principale du muscle cardiaque provient de la dégradation des acides gras exogènes ou libérés des triglycérides endogènes par  $\beta$ -oxydation en groupements acétyls liés au coenzyme A. L'oxydation de ces acides gras libres fournit de 60 à 70% des besoins énergétiques du myocarde [102-103], contre 16 à 20 % pour le glucose et le lactate et environ 3% pour les corps cétoniques [98-99].

En termes de production énergétique, les acides gras produisent 129 ATP par molécule de palmitate contre 36 ATP par molécule de glucose. Cependant, l'oxydation complète d'une molécule d'acide gras nécessite une plus grande consommation d'oxygène [7-99].

L'essentiel de l'énergie consommée par le cœur est lié à son activité contractile. Environ le 2/3 de l'ATP hydrolysé par les cellules cardiaques est utilisé pour la contraction, alors

que le dernier tiers sert à maintenir la balance ionique essentiellement par l'intermédiaire des pompes  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase du réticulum sarcoplasmique et  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase [101] de la membrane plasmique.

### **7.3.2. En condition d'ischémie**

Un déficit d'apport en oxygène entraîne un dysfonctionnement mitochondrial. Il en résulte une baisse importante des possibilités de synthétiser l'ATP indispensable au maintien des fonctions cellulaires. La cellule devient alors complètement dépendante de la formation d'ATP via la dégradation du glucose par la glycolyse entraînant l'épuisement des réserves en glycogène [98-99-101].

Le bilan énergétique de la glycolyse en condition anaérobie est une production de 2 ATP par molécule de glucose, ce qui est nettement insuffisant pour assurer la fonction cardiaque. Cet ATP permet toutefois la survie des cellules cardiaques en attendant la reperfusion. L'ATP obtenu alimente prioritairement les pompes membranaires qui entretiennent les gradients de sodium, potassium et calcium à travers la membrane cellulaire [98-99-101].

Une conséquence d'une stimulation importante de la glycolyse anaérobie est une acidification intracellulaire générée par une production excessive de protons. Ces protons, issus de l'hydrolyse de l'ATP, ne sont pas réutilisés pour resynthétiser de l'ATP, comme c'est le cas en mode aérobie, et se retrouvent alors en excès. La régulation du pH intracellulaire est assurée essentiellement par des mécanismes membranaires pour la sortie d'ions des  $\text{H}^+$  à l'extérieur de la cellule, tels que l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Cet

échangeur est stimulé particulièrement lors de la reperfusion qui suit l'ischémie, mais peut aussi être actif durant l'ischémie. Son activation est associée à un flux entrant d'ions  $\text{Na}^+$  créant ainsi un déséquilibre osmotique en l'absence d'un fonctionnement efficace de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Il en résulte une accumulation intracellulaire de  $\text{Na}^+$  qui a pour conséquence d'inverser le fonctionnement de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  [98-99-101]. Il en découle alors une entrée massive du calcium à l'intérieur de la cellule pouvant entraîner des effets délétères tels que des altérations de la fonction contractile, du cytosquelette et de la composition des phospholipides membranaires via l'activation de nombreuses enzymes [104]. Un tel dysfonctionnement peut aboutir à la mort cellulaire par apoptose ou par nécrose. L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire programmée qui, suite à l'activation d'une cascade de gènes, permet l'autodestruction d'une cellule en présence d'ATP. L'apoptose s'oppose à la nécrose qui, elle, n'est pas programmée et ne nécessite pas d'ATP. Lors de la nécrose, il y a lyse des membranes cytoplasmiques avec relargage dans le milieu extra-cellulaire du contenu de la cellule, en particulier des enzymes ; elle s'accompagne d'une réaction inflammatoire en réponse à cette destruction.

## **7.4. Conséquences**

### **7.4.1. L'ischémie réversible**

Lorsque la durée de l'ischémie est inférieure à 20 minutes chez l'homme ou dans certains modèles expérimentaux comme le chien ou le chat, la lésion créée par l'ischémie est réversible. Les cellules endommagées au cours de l'ischémie retrouveront peu à peu leurs fonctions normales dans les heures ou les jours qui suivent la reperfusion. Les principales modifications ultrastructurales du myocarde caractérisant l'ischémie

réversible sont l'œdème cellulaire et mitochondrial et la diminution des particules de glycogène [99].

#### **7.4.2. L'ischémie irréversible**

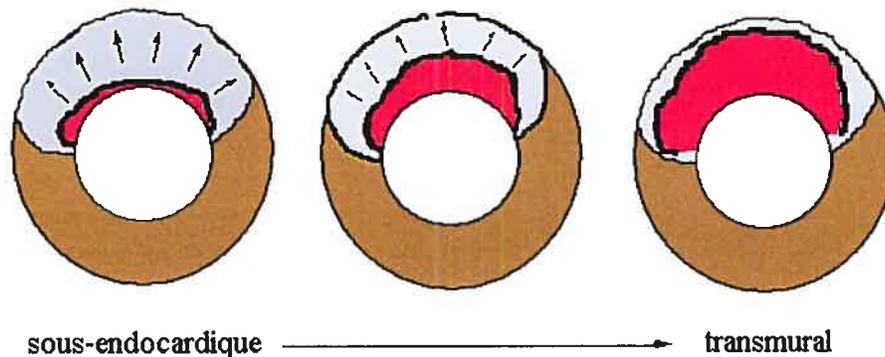
Si l'ischémie persiste au-delà de 20-30 minutes (en moyenne chez l'homme), les lésions cellulaires cardiaques atteignent un point de non-retour, aboutissant à une lésion irréversible et à la mort cellulaire (nécrose) [98]. La nécrose se définit comme étant une mort cellulaire « désordonnée » survenant lors d'une agression exogène à la cellule, principalement lors d'une insuffisance d'apport en oxygène. Le processus nécrotique agit sur les systèmes intracellulaires les plus vulnérables, étroitement liés les uns aux autres : le maintien de l'intégrité des membranes cellulaires, la respiration aérobie, la synthèse protéique et la préservation de l'appareil génétique de la cellule [105].

Le point de non-retour des lésions cellulaires est essentiellement lié aux altérations membranaires et à une diminution critique des concentrations de composés phosphate de haute énergie (ATP). Cette diminution énergétique inhibe la pompe à sodium provoquant un excès de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire [99-107-110]. Dans cette situation, la reperfusion des cellules ne permettra pas à celles-ci de recouvrir leurs fonctions normales, au contraire, la reperfusion aggrave la lésion cellulaire en activant certains processus nécrotiques [107].

Lors d'une ischémie prolongée, les premières cellules affectées sont celles du sous-endocarde car elles reçoivent moins de perfusion collatérale des territoires adjacents que le sous-épicaire. Si l'occlusion de l'artère coronaire persiste pendant plus de trois

heures, la nécrose se développe du sus-endocarde vers le sous-épicaide, un phénomène appelé « wavefront phenomenon » par Reimer et Jennings [106]. Plus la perfusion tarde à se rétablir après l'occlusion de l'artère coronaire, plus la quantité de myocarde sauvée par la reperfusion sera faible [98]. De plus, le tissu mort du cœur sera remplacé par un tissu cicatriciel, lequel fonctionne moins bien que le tissu d'origine. Cette cicatrice altère la capacité du cœur à pomper le sang. Elle interrompt également la conduction électrique normale du cœur, susceptible de provoquer une fibrillation ventriculaire aiguë et un danger mortel [47].

### Progression de la nécrose myocardique ("Wavefront phenomenon")



**Figure 3.** Extension de lésions irréversibles au cours de l'ischémie myocardique (Wavefront phenomenon). La nécrose s'étend de la zone sous-endocardique à la zone sous-épicaide durant une ischémie sévère [98-99].

L'ultrastructure du myocarde suite à une ischémie irréversible se caractérise entre autres par une agrégation de la chromatine, une apparition de densités amorphes dans la matrice mitochondriale (inclusions), une rupture des unités trilaminaires de la membrane et par une nécrose de coagulation [108-109].

## **7.5. Les facteurs déterminants**

L'extension de la nécrose du myocarde dépend principalement de trois facteurs : la durée de l'ischémie, la taille de la zone à risque (zone ischémique) ainsi que le débit collatéral [98-99].

### **7.5.1. La durée de l'ischémie**

Il existe une relation entre la taille de l'infarctus et la durée de l'ischémie. Plus l'ischémie myocardique se prolonge, plus les lésions irréversibles seront importantes ; la progression de la nécrose se faisant de l'endocarde vers l'épicarde. La nécrose apparaît généralement vers la vingtième minute d'ischémie. Lorsque la durée de l'ischémie est supérieure à 3 heures chez le chien ou chez l'humain, l'étendue de l'infarctus est presque maximale et une prolongation du temps d'ischémie n'engendre que peu de changements au niveau de cette taille [98-99]. Cette progression est plus rapide chez certaines espèces comme le rat et le lapin par exemple, à cause de divers facteurs comme la circulation collatérale.

### **7.5.2. La zone à risque**

La zone à risque ou zone ischémique est la région du myocarde vascularisée par l'artère coronaire occluse. Il a été démontré que plus la région perfusée par l'artère occluse irrigue un territoire important, plus l'étendue de la nécrose est importante. Pour limiter les effets de cette covariable, nous exprimons expérimentalement l'étendue de l'infarctus en fonction de la zone à risque ce qui élimine cette variabilité entre les individus [98-99].

### 7.5.3. Le débit collatéral

Le débit collatéral fait référence aux petites artères qui dévient le sang des artères coronaires obstruées vers des artères adjacentes ou en aval dans la même artère. Il constitue généralement une protection contre l'ischémie en permettant au sang d'atteindre la zone ischémique par plusieurs voies. Ainsi, selon la vascularisation native, le sang provenant des zones non ischémiques voisines se distribue dans la zone à risque. Ces connections artériolaires entre ces deux zones se situent essentiellement dans la couche sous-épicaudique du myocarde, la circulation collatérale étant moins intense dans le sous-endocarde. Au cours d'une ischémie, le sous-endocarde est le premier touché. Il est plus sensible à l'ischémie que le sous-épicaudique car il reçoit moins de perfusion collatérale des régions adjacentes. Cela peut expliquer le sens de l'onde de progression de la nécrose (wavefront phenomenon), et pourquoi le tissu sous-épicaudique est plus susceptible d'être sauvé [98-99].

Des études comparatives effectuées chez diverses espèces animales dont l'intensité de la circulation collatérale est différente, a permis de démontrer un rôle protecteur de cette dernière sur le myocarde ischémique. En effet, chez des espèces dont la circulation collatérale était très faible ou nulle (lapin, rat, porc), la nécrose devenait très rapidement transmurale tandis que chez les animaux possédant un réseau collatéral très développé (chien), la nécrose progressait plus lentement permettant ainsi de sauvegarder une partie de la masse musculaire avec une restauration rapide de la perfusion sanguine [98-99].

## **7.6. La reperfusion myocardique**

### **7.6.1. La reperfusion sauve le myocarde ischémique**

La reperfusion myocardique est la méthode la plus efficace pour limiter les dommages occasionnés par l'ischémie myocardique. Elle doit être entreprise suffisamment tôt en raison de la nature dynamique de la nécrose. Chez le chien, la période critique se situe aux environs de 3 heures d'ischémie après quoi le tissu est de moins en moins susceptible d'être sauvé par la reperfusion [98-99]. Chez le rat, pour sauvegarder du tissu myocarde, la reperfusion doit être établie avant la sixième minute d'ischémie. Chez l'homme, la période critique par reperfusion semble se situer autour de 6 heures après le début de la douleur thoracique bien qu'elle ne soit pas encore bien établie [111-112].

### **7.6.2. Les lésions de reperfusion**

Bien que la reperfusion soit la méthode la plus efficace pour réduire les dommages occasionnés par l'ischémie, il existe plusieurs évidences qui démontrent que la reperfusion est associée à des phénomènes délétères qui en atténuent les effets bénéfiques et que l'on appelle lésions de reperfusion [99]. Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer ces lésions dont une accumulation massive de neutrophiles dans le myocarde ischémique, une activation plaquettaire, une surcharge calcique, une production de radicaux libres, la présence d'apoptose, etc [99-113].

### 7.6.2.1. Adhésion des cellules inflammatoires et des plaquettes

Les neutrophiles s'accumulent rapidement dans les régions ischémiques reperfusées, principalement durant les premières heures de reperfusion [203]. Cette accumulation est associée à une nécrose en bande de contraction, nécrose caractéristique de la reperfusion suggérant un lien entre les neutrophiles et la mort cellulaire [116-203]. Pour établir ce lien, plusieurs études ont démontré, par différents moyens, qu'une réduction du nombre de neutrophiles circulants permettait non seulement de réduire l'accumulation de neutrophiles dans le myocarde mais également la taille de l'infarctus [116-204].

Diverses hypothèses ont été émises pour expliquer l'effet délétère des neutrophiles pour le myocarde compromis par l'ischémie dont la génération de radicaux libres, la libération de substances pro-inflammatoires dont les eïcosanoïdes et la libération d'enzymes lysosomiales. Malheureusement nous ne connaissons pas encore l'implication de chacun de ces mécanismes sur le myocarde ischémique reperfusé.

Au cours de la reperfusion, il y a également des plaquettes sanguines qui s'accumulent dans le myocarde ischémique reperfusé. Bien que les premières études sur le rôle des plaquettes dans les lésions de reperfusion se soient révélées négatives, des études subséquentes ont démontré qu'en présence de sténose critique, soit un rétrécissement de la lumière coronarienne qui n'affecte pas le débit basal, la réduction du nombre de plaquettes circulantes diminuait la taille de l'infarctus [114]. D'autres études ont également suggéré un rôle des plaquettes dans les lésions de reperfusion [115] mais le mécanisme par lequel les plaquettes auraient des effets délétères reste inconnu.

### **7.6.2.2. Surcharge calcique**

L'hypothèse d'une surcharge calcique suppose que l'excès d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  survenue au cours de la reperfusion, indiqué par une intense contraction cellulaire, serait la principale cause de mort cellulaire [113]. Durant la réoxygénation, il semble que la mitochondrie n'utilise pas l'énergie nouvellement acquise pour restaurer la formation d'ATP mais pour l'absorption du  $\text{Ca}^{2+}$  [117]. Il en résulte alors une sévère déplétion de l'ATP, une hypercontraction cellulaire ainsi qu'une aggravation de l'altération membranaire [118]. Une surcharge calcique peut, à pH neutre [119-120-121], activer des enzymes lytiques, comme les phosphatases et les protéases, menant à une perturbation des structures macromoléculaires. Finalement, l'augmentation de la concentration de calcium cytosolique peut déclencher les processus apoptotiques [122-123].

### **7.6.2.3. Production de radicaux libres**

D'autres recherches mettent l'emphase sur la surproduction de radicaux libres, molécules hautement réactives et très instables, survenant au cours de la reperfusion comme source de dommages cellulaires [124]. La reperfusion post-ischémique semble conduire à un déséquilibre exacerbé de la balance entre les défenses antioxydantes et les pro-oxydants en faveur de ces derniers. Les propriétés oxydantes des radicaux libres les mènent à réagir avec toute une série de substrats biologiques (lipides, protéines, ADN et glucose). La toxicité des radicaux libres accentue la peroxidation lipidique et la libération d'enzymes cytoplasmiques altérant ainsi davantage les membranes cellulaires [99]. Elle peut alors conduire à une détérioration des fonctions mitochondriales et à la mort cellulaire. En effet, l'apoptose initié par le stress oxydatif implique l'augmentation de la

perméabilité mitochondriale et la libération du cytochrome c. De plus, l'inhibition de la fragmentation de l'ADN et du clivage de PARP par les antioxydants suggère que les radicaux libres sont responsables de ces manifestations. La toxicité des radicaux libres peut également activer différents facteurs ou gènes impliqués dans le développement de diverses pathologies en interagissant avec des messagers secondaires. De plus, les neutrophiles activés contribuent à l'accentuation de la production de radicaux libres à travers l'activité du métabolisme oxydatif impliquant le NADH oxydase [200] et le NO synthase [201].

#### **7.6.2.5. Apoptose**

La reperfusion post-ischémique semble induire une cascade d'événements apoptotiques menant à la mort de la cellule. Ces événements, initiés entre autres par les radicaux libres, favorisent l'expression de plusieurs gènes associés à l'inflammation, à la réponse immunitaire et à l'apoptose, lesquels sont impliqués préalablement au cours de l'ischémie [125]. Comme l'apoptose est un processus qui dépend de la disponibilité de l'ATP cellulaire, la réoxygénation pourrait potentialiser l'apoptose par la restauration de l'énergie cellulaire. De plus, certaines voies de signalisation induites par un stress, dont celle de NF- $\kappa$ B/IKK, jouent un rôle important dans les lésions de reperfusion. NF-kappaB est un facteur de transcription nucléaire qui régule l'expression de plusieurs gènes impliqués dans l'inflammation, la réponse immunitaire, l'apoptose, la survie cellulaire et la prolifération. Au cours de la reperfusion, plusieurs de ces gènes sont activés, dont l'ICAM-1 qui joue un rôle central dans l'adhésion des neutrophiles [126-127]. Finalement, le niveau de l'apoptose dépend de la durée de la reperfusion [128]. Ces

études confirment que l'ischémie peut elle-même déclencher l'apoptose; la reperfusion accélérant le processus [129].

## **8. APOPTOSE**

### **8.1. Définition**

L'apoptose est un processus d'autodestruction des cellules en réponse à un signal. On la désigne souvent comme un suicide cellulaire programmé car la cellule joue un rôle actif dans sa disparition. Celle-ci s'effectue selon une séquence d'événements très précis qui permettent à la cellule d'être détruite en quelques heures sans laisser de traces. Typiquement, les cellules s'autodétruisent lorsque celles-ci ne sont plus utiles, lorsqu'elles sont endommagées ou lorsqu'elles sont dysfonctionnelles. Ainsi, l'apoptose est en équilibre constant avec la prolifération cellulaire. Une apoptose inefficace, inhibée ou suractivée est observée dans de nombreuses pathologies telles que les néoplasies, les maladies neurodégénératives, le SIDA, les hépatites, ou l'infarctus du myocarde [130-131].

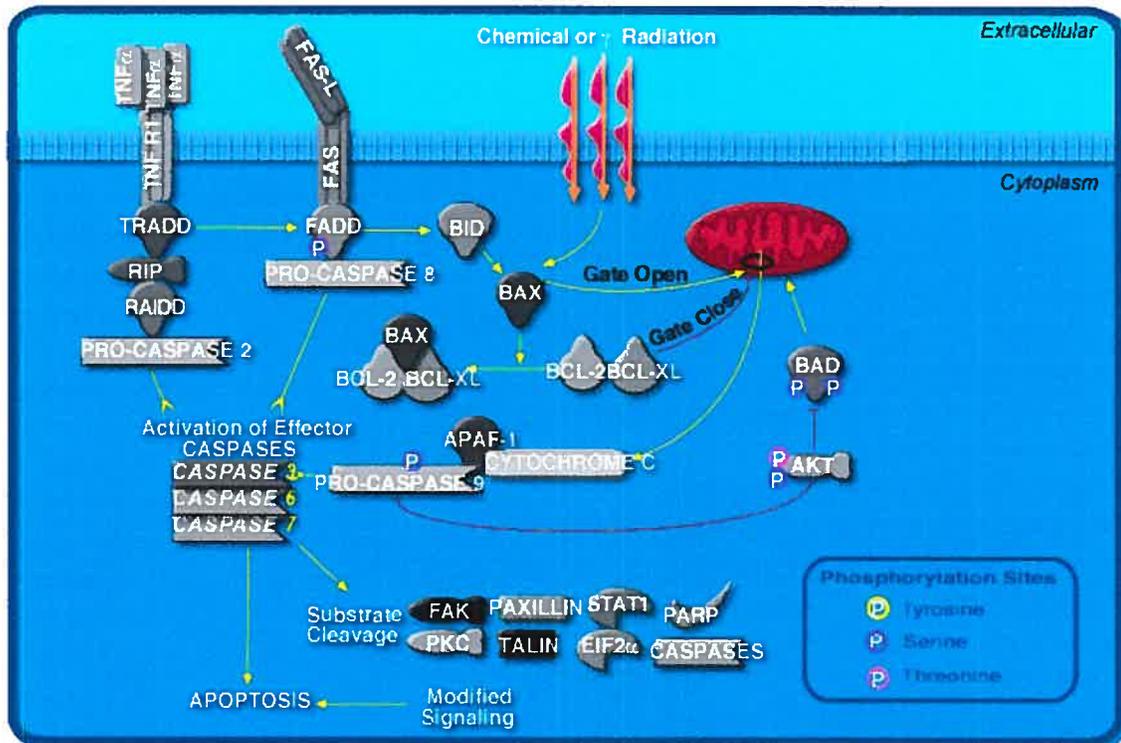
L'apoptose met en jeu des processus qui requiert de l'énergie [132-133-134]. Ainsi, des cellules déprimées totalement ou partiellement en ATP ne meurent pas par apoptose mais par nécrose ce qui peut expliquer pourquoi l'apoptose s'observe principalement durant la phase de la reperfusion. Cependant, certains événements apoptotiques ne nécessitent aucune source d'énergie, comme la fragmentation de l'ADN [135].

## **8.2. Critères morphologiques**

L'apoptose se traduit par de nombreux changements morphologiques. Il correspond à une rétraction progressive de la cellule, avec condensation de la chromatique et du cytoplasme, suivie d'une fragmentation de l'ADN qui aboutit à la formation de corps apoptotiques. Ces derniers sont relargués puis phagocytés par les cellules avoisinantes, avec peu de aucune réaction inflammatoire. En ce sens, l'apoptose se distingue de la nécrose (mort cellulaire accidentelle) qui aboutit à l'éclatement de la cellule abîmée déversant ainsi le contenu cellulaire dans le tissu environnant ce qui provoque une inflammation importante [136].

## **8.3. Mécanismes moléculaires**

La mort cellulaire par apoptose peut être initiée par une perturbation de l'homéostasie intracellulaire qui sont des signaux de stress cellulaire (diminution de l'apport en nutriments, accumulation des espèces réactives de l'oxygène, déséquilibre ionique, désorganisation du cytosquelette, ADN endommagé...) ou par des stimuli extracellulaires (TNF- $\alpha$ , ligand Fas) via les récepteurs de mort cellulaire (TNF-R1, Fas) [137]. Toutes ces atteintes mentionnées aboutissent à des perturbations du potentiel membranaire de la mitochondrie et au déclenchement de la cascade des caspases (Figure 4).



**Figure 4 :** Composantes majeures de la cascade apoptotique. L'apoptose met en jeu deux voies majeures qui perçoivent et intègrent les signaux de survie et de mort et qui régulent le déclenchement des cascades des caspases – la voie extrinsèque, initiée par le récepteur de mort cellulaire via un stimulus extracellulaire, et la voie intrinsèque, initiée par la mitochondrie via un stimulus intracellulaire.

Les signaux provenant de l'environnement extracellulaire sont généralement perçus par les récepteurs de mort. Parmi ceux-ci, notons Fas et TNF-R1 qui serviront ici d'exemples. La liaison du ligand Fas et de la cytokine TNF- $\alpha$  cause la trimérisation [138] de leur récepteur membranaire respectif (Fas ou TNF-R1) et conduit au recrutement de plusieurs protéines effectrices (TRADD, FADD) puis à l'activation de la caspase-8 qui déclenche l'apoptose [139] soit en activant les caspases effectrices directement, soit en clivant Bid amorçant ainsi le sentier apoptotique mitochondrial [140-148-149].

Des signaux intracellulaires (ex : hypoxie) peuvent amorcer la cascade apoptotique directement par le sentier mitochondrial [143-154]. La mitochondrie contrôle

la cascade des caspases [147-154]. Les caspases sont des protéases à cystéine exprimées à l'état zymogène [141]. Pour être actives, elles doivent être clivées au niveau des résidus aspartates et s'assembler en hétérotétramères (deux hétérodimères p10-p20) [142]. On retrouve, chez l'humain, au moins 14 caspases impliquées dans l'apoptose regroupées selon leur fonction dans la cascade de signalisation [144]: les caspases initiatrices (caspase-2, -8, -9 et -10), responsables du déclenchement des cascades d'activation des caspases [145] et les caspases effectrices (caspase-3, -6 et -7) qui dégradent des substrats cellulaires spécifiques (protéines de structure, enzyme de réparation de l'ADN, protéines cytoplasmiques) [146].

Lors de la cascade des caspases, la mitochondrie ouvre dans sa membrane interne des mégacanaux laissant échapper des molécules apoptogènes dont le cytochrome c, le facteur AIF et SMAC/Diablo [150-151-152-154]. Le cytochrome c ainsi relargué dans le cytoplasme interagit avec APAF-1 pour l'assemblage d'un complexe protéique (apoptosome) responsable de l'activation de la caspase-9, lequel active la caspase-3 [153-154]. La caspase-3 est responsable, entre autres, du clivage et de l'inactivation de la PARP (Poly ADP-Ribose Polymérase), une enzyme impliquée dans la réparation de l'ADN. Ainsi, les caspases engagent la phase terminale et irréversible de l'apoptose en détruisant d'importants composants moléculaires du noyau et du cytoplasme, ce qui conduit à la mort de la cellule [154].

L'ouverture des pores de transition de perméabilité (pores PT) des mitochondries est contrôlée par les protéines de la famille Bcl-2 [156] localisées sur la membrane externe de la mitochondrie [154-161-162-163]. La famille Bcl-2 contient des protéines

anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w,...) [154-159-160] et pro-apoptotiques (Bax, Bak,...) [157-158], agissant en homodimère (ex :Bax-Bax ou Bcl-2-Bcl-2) ou hétérodimères (ex :Bax-Bcl-2) [164-165-166]. La sensibilité de la cellule à l'apoptose dépend directement de l'équilibre entre les protéines anti- et pro-apoptotiques de la famille Bcl-2. Ainsi, par exemple, lorsque Bax est surexprimé, il y a formation d'homodimères Bax-Bax menant à la mort cellulaire. En revanche, une surexpression de Bcl-2 formera des dimères Bax-Bcl-2 et des homodimères Bcl2-Bcl-2 qui permettront la survie de la cellule [150-151-152-155]. Certains membres de la famille Bcl-2 semblent être capable de former des pores. Il a été montré que les molécules Bcl-xl (anti-apoptotique) et Bax (pro-apoptotique) pouvaient former des canaux ioniques en s'insérant dans la membrane lipidique mitochondriale. La formation de ces canaux semble être dépendant du pH environnant [167-168-169].

#### 8.4. AKT

Plusieurs études montrent qu'il est possible d'inhiber l'apoptose grâce à l'activation de l'AKT, une sérine/thréonine kinase impliquée dans la survie cellulaire, en réponse à des facteurs de croissance et autres stimuli extracellulaires [170-171]. L'AKT peut engendrer la survie cellulaire par la régulation des gènes de la famille Bcl-2 ou des caspases via des phosphorylations directes (phosphorylation de BAD, de la caspase 9). L'AKT phosphoryle les sérines 112 et 136 de la protéine Bad, laquelle ne peut plus se dimériser avec un partenaire anti-apoptotique tels que Bcl-xl mais, en revanche, est séquestrée dans le cytoplasme sous la forme d'un complexe avec la protéine 14-3-3 [170-172-173]. À l'inverse, lorsque Bad n'est pas phosphorylée, elle est recrutée à la

membrane de la mitochondrie où elle se dimérise avec Bcl-xl provoquant ainsi l'apoptose [170]. AKT régule la survie cellulaire également par l'induction transcriptionnelle de gènes impliqués dans la survie cellulaire via l'activation de NF- $\kappa$ B [170-174] et l'inactivation de GSK-3 [170-175-176] ainsi que par la répression transcriptionnelle de gènes pro-apoptotiques via la phosphorylation de facteurs de transcription séquestrés dans le cytoplasme [171].

### **8.5. TNF- $\alpha$**

Tumor necrosis factor alpha, ou facteur nécrosant des tumeurs (TNF- $\alpha$ ) est une cytokine impliquée dans l'inflammation et l'apoptose [177]. Il est libéré par les leucocytes activés en réponse à un dommage (infection, hypoxie). Il est synthétisé sous la forme d'un précurseur, un pro-TNF qui, sous l'influence d'une endopeptidase à zinc, donne le TNF- $\alpha$  [178-179-180]. Sa libération est stimulée par plusieurs autres médiateurs dont IL-1 [181-182]. La plupart des cellules, tels que les hépatocytes, les myocytes, les adipocytes, possèdent des récepteurs de TNF- $\alpha$ . La liaison du TNF- $\alpha$  à son récepteur TNF-R1 déclenche la cascade apoptotique [183].

## **II. OBJECTIFS ET HYPOTHÈSE EXPÉRIMENTALE**

### **1. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE**

Nous avons observé que les acides gras polyinsaturés oméga-3, à travers leur métabolisme, exercent des effets bénéfiques sur les maladies cardiovasculaires. Malheureusement, il n'existe aucune étude comparative des effets d'une diète dont les rapports oméga-3/6 sont inversés sur l'infarctus du myocarde. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à comparer l'effet de deux diètes sur la taille de l'infarctus du myocarde et certains marqueurs biochimiques. Le modèle expérimental consiste à nourrir des animaux pendant 2 mois avec l'une ou l'autre des diètes proposées : soit un rapport oméga-3/6 5 :1 ou un rapport oméga-3/6 1 :5. L'apport calorique pour les deux diètes était le même en termes de protéines, lipides et glucides. L'infarctus du myocarde a été provoqué par l'obstruction d'une artère coronaire pendant 40 minutes suivie d'une période de reperfusion de 3 jours. Lors du sacrifice, nous avons prélevé le coeur pour déterminer la taille de l'infarctus et le sang pour mesurer l'agrégation plaquettaire. Nous avons également effectué des analyses biochimiques sur les régions ischémiques et non ischémiques du tissu cardiaque afin de déterminer différents paramètres tels que l'activité de la caspase-3 et d'Akt ainsi que la présence de TNF $\alpha$  et de COX-2.

### **2. HYPOTHÈSE EXPÉRIMENTALE**

La prise de supplément en  $\omega$ -3 devrait exercer, contrairement à la prise de supplément en  $\omega$ -6, un effet protecteur sur le système cardiovasculaire. On s'attend, entre autres, à observer une réduction de la taille de l'infarctus du myocarde, de l'activité plaquettaire et de l'apoptose chez les rats qui ont consommé des  $\omega$ -3.

### III. MATÉRIELS ET MÉTHODES

#### 1. GROUPES EXPÉRIMENTAUX

Le protocole expérimental respecte les règles émises par le Conseil canadien sur la protection des animaux. Nous avons utilisé 23 rats Sprague–Dawley mâles (nombre impair en raison de décès de certains rats) pesant entre 50 et 100g (Charles River Canada, Saint-Constant, Québec). Les rats sont distribués aléatoirement en deux groupes selon la diète à recevoir pour une période de 8 semaines: diète riche en oméga-3 (huile de poisson) ou diète riche en oméga-6 (huile de Soya). Les diètes contiennent 19,89 % Kcal de protéines, 38,89 % Kcal de glucides et 41,22 % Kcal de lipides avec un rapport oméga-3/6 de 5 :1 pour la première diète et un rapport oméga-3/6 de 1 :5 pour la seconde. Les rats sont hébergés dans des cages individuelles avec de la nourriture et de l'eau disponible *ad libitum*. Le poids corporel des animaux et la consommation de nourriture sont mesurés quotidiennement. La température (22°C) et l'humidité (40–50%) de la pièce demeurent constantes tout au long de l'étude; la période de luminosité était de 12 heures (8h00-20h00). Après 8 semaines de diète, les rats sont soumis à une ischémie de 40 minutes et à une reperfusion de 72 heures.





Tableau IV: Composants de la diète riche en  $\omega$ -3.

High Omega-3 Diet			Protein	CHO	Fat	18:2	n-6	n-3
Ingredient	g/kg	%	g/kg	g/kg	g/kg	g/kg	g/kg	g/kg
Casein	248,4000	24,84	216,108	0,4968	2,484	0,03726	0,03726	0,022356
L-Cystine	3,6000	0,36	3,6	0	0	0	0	0
Corn								
Starch	159,1600	15,916	0,509312	143,244	0,31832	0	0	0
Maltodextrin (Lo-Dex)	180,0000	18	0	172,44	0	0	0	0
Sucrose	100,0000	10	0	100	0	0	0	0
Coconut Oil, Hydrogenated	50,0000	5	0	0	50	0	0	0
Flaxseed Oil	50,0000	5	0	0	50	7,2	7,2	26,3
Cellulose (Fiber)	50,0000	5	0	0	0	0	0	0
Mineral Mix, AIN-93G- MX	42,0000	4,2	0	9,270072	0	0	0	0
Calcium Phosphate Dibasic CaHPO <sub>4</sub>	4,8000	0,48	0	0	0	0	0	0
Vitamin Mix, Teklad 40060	12,0000	1,2	0	5,04	0	0	0	0
TBHQ (Antioxidant)	0,0400	0,004	0	0	0	0	0	0
Fish Oil	100,0000	10	0	0	100	1,81	4,11	32,6
<b>Totals (g/kg)</b>	<b>1000,00</b>	<b>100,00</b>	<b>220,2173</b>	<b>430,4909</b>	<b>202,8023</b>	<b>9,04726</b>	<b>11,34726</b>	<b>58,92236</b>
<b>Diet %</b>			<b>22,02</b>	<b>43,05</b>	<b>20,28</b>	<b>0,904726</b>	<b>1,134726</b>	<b>5,892236</b>
<b>kcal/kg</b>	<b>4428,05</b>		<b>880,87</b>	<b>1721,96</b>	<b>1825,22</b>			
<b>kcal/g</b>	<b>4,43</b>		<b>0,88</b>	<b>1,72</b>	<b>1,83</b>		<b>n-6:n-3</b>	<b>0,2</b>
<b>kcal %</b>			<b>19,89</b>	<b>38,89</b>	<b>41,22</b>			
<b>Ca:P</b>	<b>1,59</b>							

Tableau V: Composants de la diète riche en  $\omega$ -6.

<b>High Omega-6 Diet</b>			<b>Protein</b>	<b>CHO</b>	<b>Fat</b>	<b>18:2</b>	<b>n-6</b>	<b>n-3</b>
<b>Ingédient</b>	<b>g/kg</b>	<b>%</b>	<b>g/kg</b>	<b>g/kg</b>	<b>g/kg</b>	<b>g/kg</b>	<b>g/kg</b>	<b>g/kg</b>
Casein	248,4000	24,84	216,108	0,4968	2,484	0,03726	0,03726	0,022356
L-Cystine	3,6000	0,36	3,6	0	0	0	0	0
Corn								
Starch	159,1600	15,916	0,509312	143,244	0,31832	0	0	0
Maltodextrin (Lo-Dex)	180,0000	18	0	172,44	0	0	0	0
Sucrose	100,0000	10	0	100	0	0	0	0
Coconut Oil, Hydrogenated	50,0000	5	0	0	50	0	0	0
Flaxseed Oil	8,0000	0,8	0	0	8	1,152	1,152	4,208
Cellulose (Fiber)	50,0000	5	0	0	0	0	0	0
Mineral Mix, AIN-93G- MX	42,0000	4,2	0	9,270072	0	0	0	0
Calcium Phosphate Dibasic CaHPO <sub>4</sub>	4,8000	0,48	0	0	0	0	0	0
Vitamin Mix, Teklad 40060	12,0000	1,2	0	5,04	0	0	0	0
TBHQ (Antioxidant)	0,0400	0,004	0	0	0	0	0	0
Fish Oil		0	0	0	0	0	0	0
Soybean Oil	142,0000	14,2	0	0	142	75,544	75,544	11,076
<b>Totals (g/kg)</b>	<b>1000,00</b>	<b>100,00</b>	<b>220,2173</b>	<b>430,4909</b>	<b>202,8023</b>	<b>76,73326</b>	<b>76,73326</b>	<b>15,30636</b>
<b>Diet %</b>			<b>22,02</b>	<b>43,05</b>	<b>20,28</b>	<b>7,673326</b>	<b>7,673326</b>	<b>1,530636</b>
<b>kcal/kg</b>	<b>4428,05</b>		<b>880,87</b>	<b>1721,96</b>	<b>1825,22</b>			
<b>kcal/g</b>	<b>4,43</b>		<b>0,88</b>	<b>1,72</b>	<b>1,83</b>		<b>n-6:n-3</b>	<b>5,0</b>
<b>kcal %</b>			<b>19,89</b>	<b>38,89</b>	<b>41,22</b>			
<b>Ca:P</b>	<b>1,59</b>							

## **2. PROCÉDURES CHIRURGICALES**

L'anesthésie des rats est induite par une solution de kétamine/xylazine (35–50 mg/kg et 5 mg/kg; injection intramusculaire) et maintenue par une ventilation à l'isoflurane (1.5%). L'électrocardiogramme (ECG) et la fréquence cardiaque sont continuellement observés durant la procédure chirurgicale. Une thoracotomie gauche est effectuée au cinquième espace intercostal et l'ischémie est provoquée par l'occlusion de l'artère coronaire gauche en utilisant un fil à suture. L'ischémie est confirmée par un sus-décalage du segment ST et par la présence d'une cyanose épicaudique. Après 40 minutes d'occlusion, l'occlusion est retirée et le tissu myocardique est reperfusé. La reperfusion est confirmée par la disparition de la cyanose épicaudique. Le thorax est refermé et l'animal est retourné dans sa cage. Un antibiotique (15,000 IU pénicilline G) et un analgésique (2 mg/kg de Butorphanol) sont administrés aux animaux à leur retour dans la cage. Après 72 heures de reperfusion, les rats sont sacrifiés par décapitation et le cœur est rapidement prélevé.

## **3. MESURE DE L'AGRÉGATION PLAQUETTAIRE**

L'agrégation plaquettaire est mesurée par impédance sur sang complet dilué à l'aide d'un agrégomètre (Whole Blood Lumi-Aggregometer Chrono-Log). Un ml de sang est prélevé lors de la décapitation de l'animal dans de l'héparine (20 U/ml) et dilué 1 :1 avec de la saline. Après une courte période de stabilisation (30 secondes), l'activateur plaquettaire, l'adénosine diphosphate (40  $\mu$ M) est ajouté au sang dilué. L'agrégation plaquettaire est quantifiée en ohms ( $\Omega$ ) en déterminant la hauteur maximale de la courbe obtenue en utilisant le programme Aggrolink (Chrono-Log).

#### **4. ESTIMATION DE LA TAILLE DE L'INFARCTUS**

Le coeur est canulé via l'aorte et lavé avec la saline puis l'artère coronaire gauche est occluse de nouveau au même endroit pour déterminer l'aire de la zone à risque (ZR) par infusion de 2 ml de bleu d'Evans (0,5%) dans l'aorte. Par la suite, le coeur est placé dans un congélateur à  $-80^{\circ}\text{C}$  durant 5 minutes, puis coupé en 4 sections transversales de 2 mm. Une tranche est conservée dans un congélateur à  $-80^{\circ}\text{C}$  pour des analyses biochimiques. Cette tranche a été préalablement sectionnée en deux parties égales, une région ischémique et une autre non-ischémique (témoin). Les autres tranches sont incubées durant 5 minutes à  $37^{\circ}\text{C}$  dans une solution de chlorure de triphenyltetrazolium (TTC 1%, pH 7,4) afin de déterminer l'aire de nécrose (I). La taille de l'infarctus est exprimée en pourcentage de nécrose (I) de la zone à risque (ZR), et la ZR est exprimée en pourcentage de l'aire du ventricule gauche (VG).

#### **5. ACTIVITÉ DE LA CASPASE-3**

Les tissus cardiaques sont homogénéisés dans un tampon de lyse (1% Triton X-100, 0.32 M sucrose, 10 mM/mL Tris pH 8.0, 5 mM/ml EDTA, 2 mM/ml DTT, 1 mM/ml PMSF, 10 mg/ml Leupeptine, 10 mg/ml Pepstatine A, 10 g/ml Aprotinine). L'homogénat est incubé dans la glace durant 30 minutes, soumis à 3 cycles de gel/dégel (azote liquide, bain à  $37^{\circ}\text{C}$ ) puis centrifugé à 13,000g à  $4^{\circ}\text{C}$  durant 10 minutes. Le dosage des protéines est réalisé par la méthode Bradford (Nous avons établi qu'il est préférable d'utiliser la méthode Bradford ici comme technique de dosage en accord avec les tampons utilisées par cette technique).

Les réactions enzymatiques ont lieu dans un tampon de réaction (50 mmol/mL Tris pH 7.5, 5 mmol/mL MgCl<sub>2</sub>, 1 mmol/mL EGTA, 0.1% CHAPS, 1 mmol/mL DTT) en présence de 25 µg de protéines et un substrat fluorogénique (10 mM Ac-DEVD-AMC). Dans une série de tubes, un inhibiteur de la réaction est ajouté (800 µM DEVD-CHO) comme témoin négatif. Les réactions se poursuivent à 37°C durant 3 heures et arrêtées par l'ajout du tampon contenant 0.4 M glycine et 0.4 M NaOH. La fluorescence est quantifiée au moyen d'un spectrophotomètre (Photon Technology International, Lawrenceville, NJ) dont la longueur d'onde d'excitation est ajustée à 365 nm et celle de l'émission est fixée à 465 nm.

## **6. IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN**

Les tissus sont homogénéisés dans un tampon de lyse (50 mM Tris pH 7.5, 20 mM β-glycérophosphate, 20 mM NaF, 5 mM EDTA, 10 mM EGTA, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM benzamidine, 0.5 mM PMSF, 10 µg/ml Leupeptine, 5 mM DTT, 1 µM microcystin LR, et 1% Triton X-100). L'homogénat est incubé à 4°C durant 30 minutes et centrifugé à 10,000 g à 4°C durant 15 minutes. Le dosage des protéines est réalisé au moyen de la méthode Lowry (Bio-Rad) (Nous avons établi qu'il est préférable d'utiliser la méthode Lowry ici comme technique de dosage en accord avec les tampons utilisées par cette technique).

Une quantité égale de protéines est chargée dans chacun des puits d'un gel d'électrophorèse contenant 10 ou 15% de polyacrylamide (SDS-PAGE). Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose afin de rendre les protéines accessibles à la détection par anticorps. Les protéines chargées migrent depuis le gel vers la membrane en conservant l'organisation relative qu'elles avaient dans le gel. Il résulte de ce "blotting" que les protéines sont exposées sur une surface mince, ce qui facilite les étapes de détection ultérieures. Pour assurer la spécificité de la technique, tous les sites de fixation potentiels non utilisés de la membrane doivent être bloqués. On parle alors de blocage de la membrane (lait dilué à 5% - 5 g pour 100 ml en présence de détergent, typiquement du Tween® 20). Après le blocage, une solution diluée d'anticorps primaire (1 :1000) est incubée avec la membrane et dirigée contre l'une des protéines suivantes : AKT (Anticorps polyclonal; 60 KDa; lapin; New England Biolabs-#9272), P-AKT (Phosphorylation à l'intérieur du C-terminal sur la sérine 473; Anticorps polyclonal; 60 KDa; lapin; New England Biolabs-#9271), TNF- $\alpha$  (Anticorps polyclonal; 26/17 KDa; chèvre; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, Calif.-TNF- $\alpha$ (N-19) :sc-1350) ou COX-2 (Anticorps polyclonal; 74 KDa; lapin; New England Biolabs-#4842). Après rinçage de la membrane, une solution diluée d'anticorps secondaires (1 :5000) se liera à pratiquement tout anticorps primaire (anti-lapin IgG-HRP de Santa Cruz Biotechnology, Calif-#7074; dindon anti-chèvre IgG-HRP :sc-2033 de Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, Calif.). L'anticorps secondaire est couplé à une peroxydase et le produit de la réaction émet une luminescence proportionnelle à la concentration en protéine. Après rinçage des anticorps secondaires non-liés, la membrane est prête pour la détection des sondes marquées et

liées à la protéine d'intérêt. Une trousse de chimioluminescence (Perkin Elmer, Mississauga, Ont.) est utilisée pour visualiser les bandes, et l'analyse quantitative est effectuée à l'aide d'un numériseur d'images (Kodak ImageStation 440CF). La protéine d'intérêt est identifiée approximativement grâce à un marqueur de poids moléculaire (RPN800-Armersham Biosciences) chargé dans l'un des puits en même temps que les échantillons. Après quantification, les membranes sont placées dans un tampon permettant la dissociation de l'anticorps de son antigène (0.1 M glycine, 1% SDS, pH 2.0, 1 heure à la température ambiante). Cette étape est utilisée pour déterminer le rapport pAKT/AKT sur la même préparation. Afin de comparer différents gels, nous avons décidé d'utiliser la moyenne obtenue sur chaque gel du groupe oméga-6 comme étant 100%. Par la suite toutes les valeurs ont été exprimées par rapport à ce 100%. Ainsi il nous était possible de comparer différents gels d'autant plus que les mesures ne pouvaient ce faire sur un même gel.

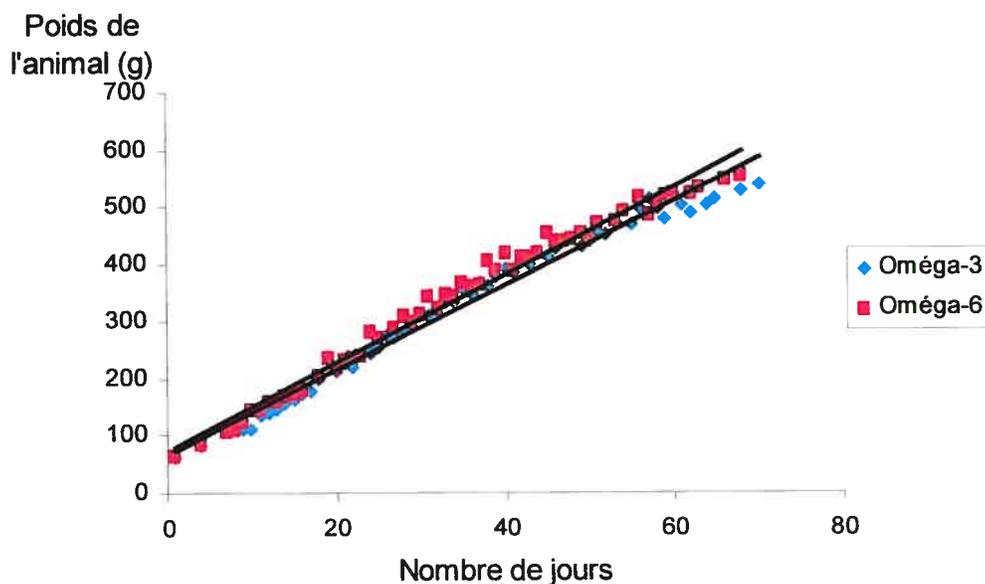
## 7. STATISTIQUE

L'analyse statistique est réalisée par un test t de Student pour comparer les résultats des deux groupes expérimentaux (diète  $\omega$ -3 versus diète  $\omega$ -6). Les différences sont considérées comme significatives pour  $p < 0.05$ .

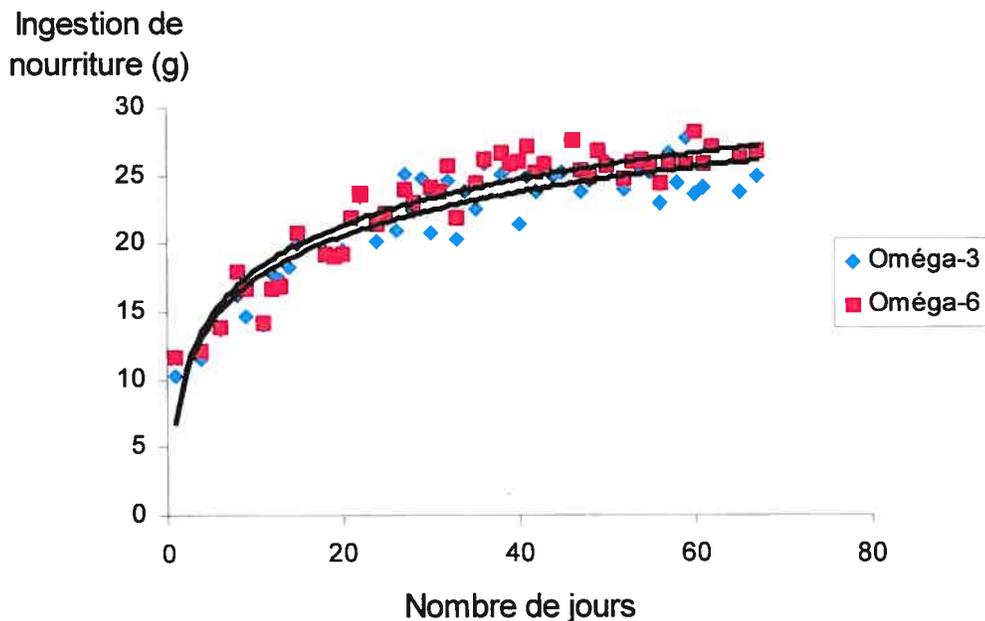
## IV. RÉSULTATS

### 1. POIDS CORPOREL ET CONSOMMATION D'ÉNERGIE

Aucune différence de poids corporel et de consommation de nourriture durant les 8 semaines de traitement n'a été observée entre les animaux ayant reçu une diète enrichie en acides gras polyinsaturés  $\omega$ -3 (huile de poisson) et ceux ayant reçu une diète enrichie  $\omega$ -6 (huile de Soya). (Figure 5 et Figure 6). Ces paramètres sont donc similaires dans les deux groupes au moment de procéder à la chirurgie.



**Figure 5.** Poids corporel (en gramme) des animaux ayant reçu l'une ou l'autre des diètes enrichies en acides gras polyinsaturés (diète enrichie en  $\omega$ -3 versus diète enrichie en  $\omega$ -6) durant les 8 semaines qui précèdent le protocole chirurgical. On ne dénote aucune différence significative entre les deux groupes.



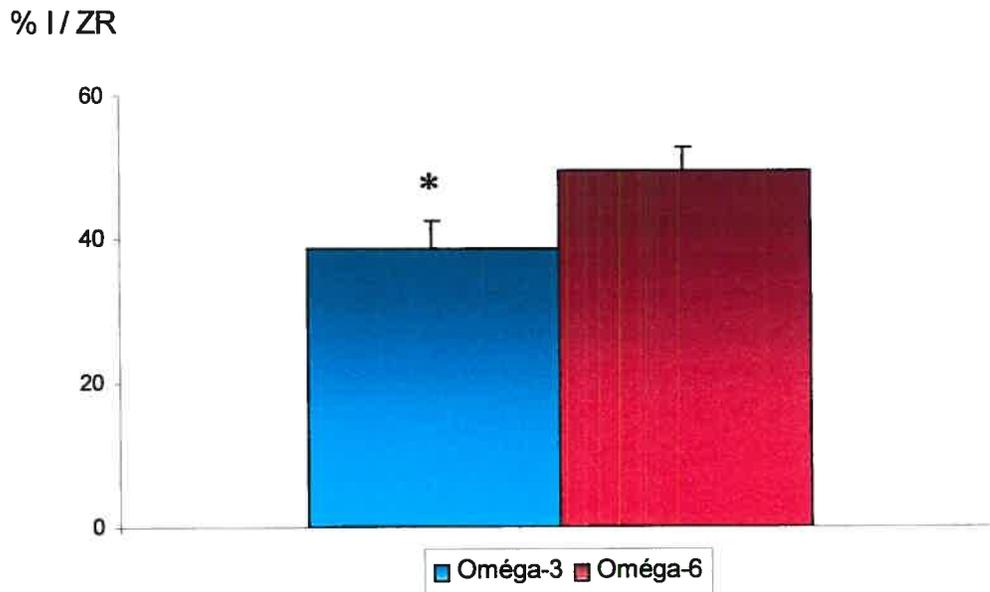
**Figure 6.** Consommation de nourriture sous forme d'une diète enrichie d' $\omega$ -3 ou d'une diète enrichie d' $\omega$ -6 durant les 8 semaines qui précèdent le protocole chirurgical. Aucune différence significative dans la consommation de nourriture n'est observée entre les deux groupes.

## 2. TAILLE DE L'INFARCTUS ET AIRE DE LA ZONE À RISQUE

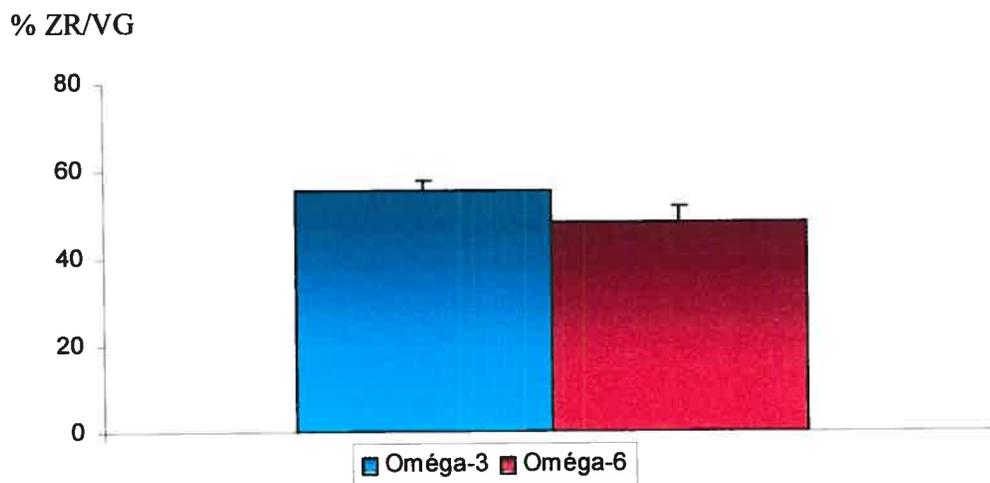
La taille de l'infarctus (I) est exprimée en pourcentage de la zone à risque (ZR).

La **Figure 7** montre qu'une consommation quotidienne en  $\omega$ -3 pour une période de 8 semaines réduit significativement la taille de l'infarctus (I/ZR) après 72 heures de reperfusion (\*  $p=0,0377$ ).

L'aire de la zone à risque (ZR), exprimée en pourcentage de l'aire du ventricule gauche (VG), est comparable entre les deux groupes expérimentaux (**Figure 8**).



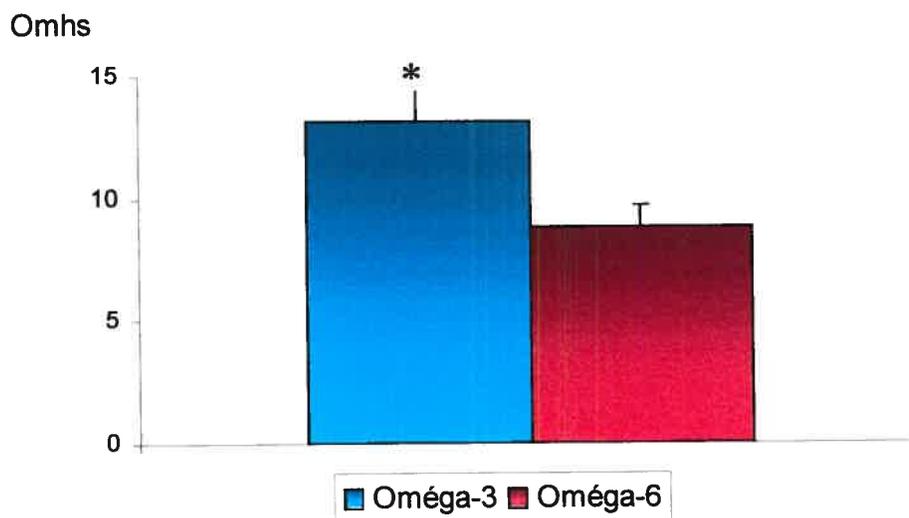
**Figure 7.** La taille de l'infarctus (I), exprimée en pourcentage de la zone à risque (ZR), est significativement réduite chez les rats nourris avec une diète riche en  $\omega$ -3 ( $n=11$ ) comparativement à ceux nourris avec une diète riche en  $\omega$ -6 ( $n=12$ ) après 72 heures de reperfusion (\*  $p=0,0377$ ).



**Figure 8.** L'aire de la zone à risque (ZR), exprimée en pourcentage de l'aire du ventricule gauche (VG), est semblable chez les rats nourris avec une diète riche en  $\omega$ -3 ( $55,5 \pm 2,1$  pour  $n=11$ ) et ceux nourris avec une diète riche en  $\omega$ -6 ( $48,3 \pm 3,4$  pour  $n=12$ ) après 72 heures de reperfusion.

### 3. AGRÉGATION PLAQUETTAIRE

Les effets d'une diète enrichie en  $\omega$ -3 sur l'agrégation plaquettaire sont présentés à la **Figure 9**. Après une ischémie de 40 minutes suivie 72 heures de reperfusion, le taux d'agrégation plaquettaire est significativement plus élevé ( $p < 0,05$ ) chez les animaux nourris avec une diète riche en  $\omega$ -3 ( $13,1 \pm 0,9\Omega$  pour  $n=5$ ) comparativement à celui des animaux nourris avec une diète riche en  $\omega$ -6 ( $8,8 \pm 3,4\Omega$  pour  $n=5$ ).

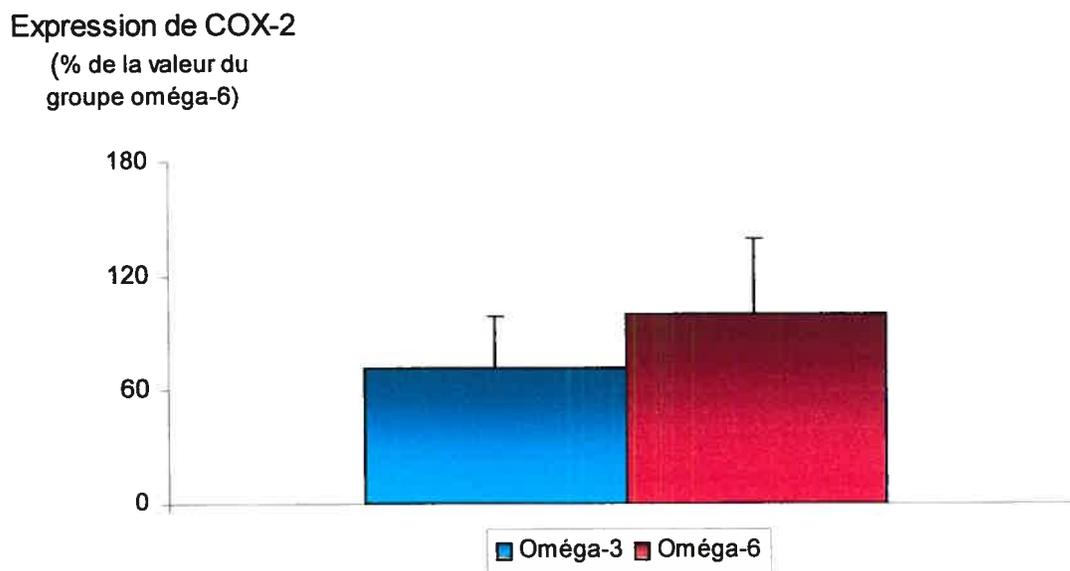


**Figure 9.** Le taux d'agrégation plaquettaire (en Ohms) dans le sang des rats nourris avec une diète riche en  $\omega$ -3 ( $n=5$ ) est significativement plus élevé comparé à celui des rats nourris avec une diète riche en  $\omega$ -6 ( $n=5$ ) après 72 heures de reperfusion (\*  $p=0,0461$ ).

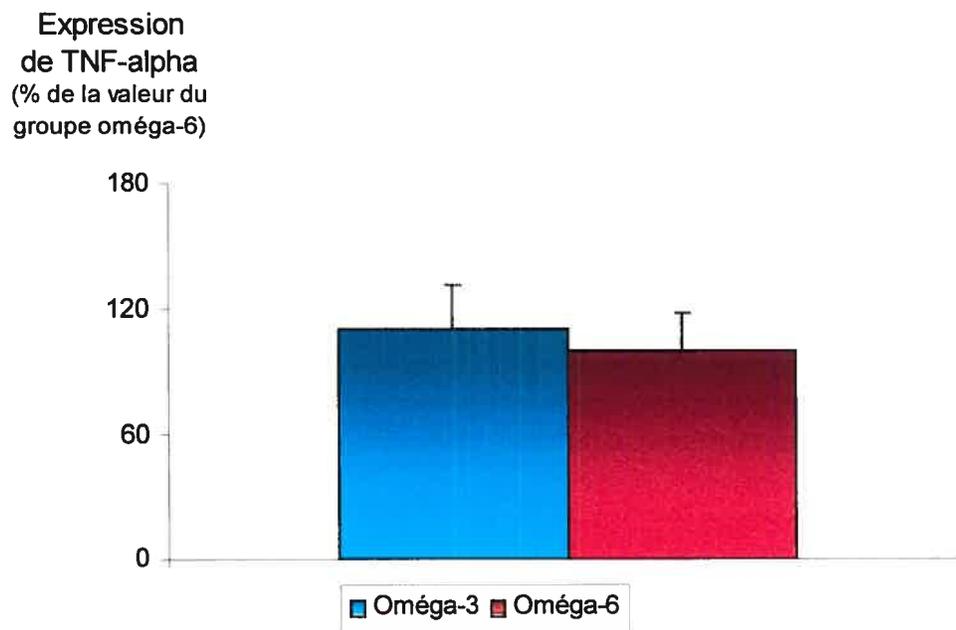
#### 4. EXPRESSION DE COX2 ET DE TNF- $\alpha$

L'expression de l'enzyme COX-2 du tissu cardiaque est légèrement plus faible chez les animaux nourris avec la diète riche en  $\omega$ -3 ( $72 \pm 27\%$  pour  $n=6$ ) que chez les rats nourris avec la diète riche en  $\omega$ -6 ( $100 \pm 39\%$  pour  $n=5$ ) (**Figure 10**). Toutefois cette différence n'est pas significative.

La **Figure 11** montre que l'expression tissulaire cardiaque de la cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$  est similaire entre les groupes.



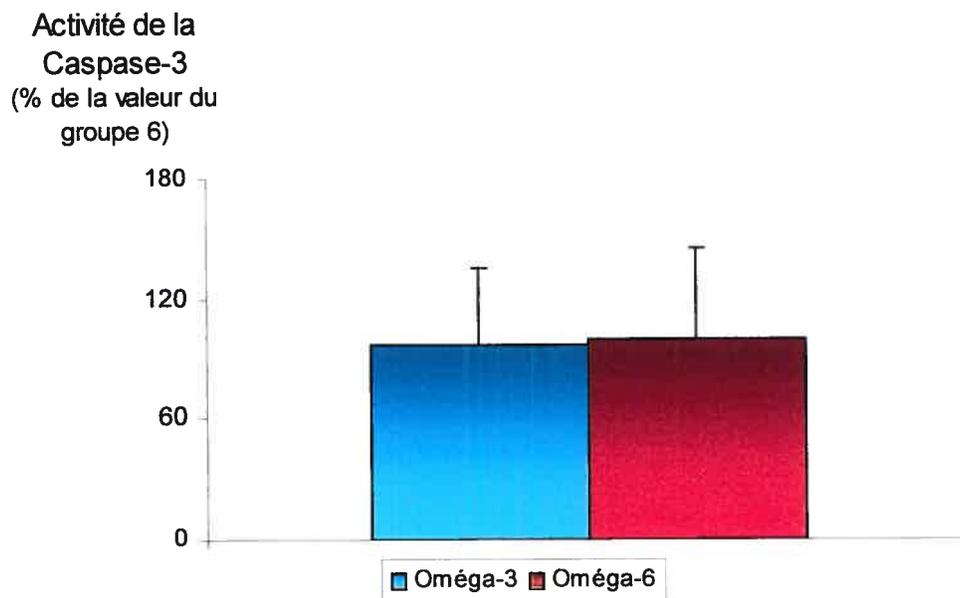
**Figure 10.** L'expression de l'enzyme cyclo-oxygénase-2 (COX-2) dans le tissu cardiaque est semblable chez les deux groupes : rats nourris avec une diète riche en  $\omega$ -3 ( $n=6$ ) et ceux nourris avec une diète riche en  $\omega$ -6 ( $n=5$ ). Elle est exprimée à 100% chez le groupe  $\omega$ -6.



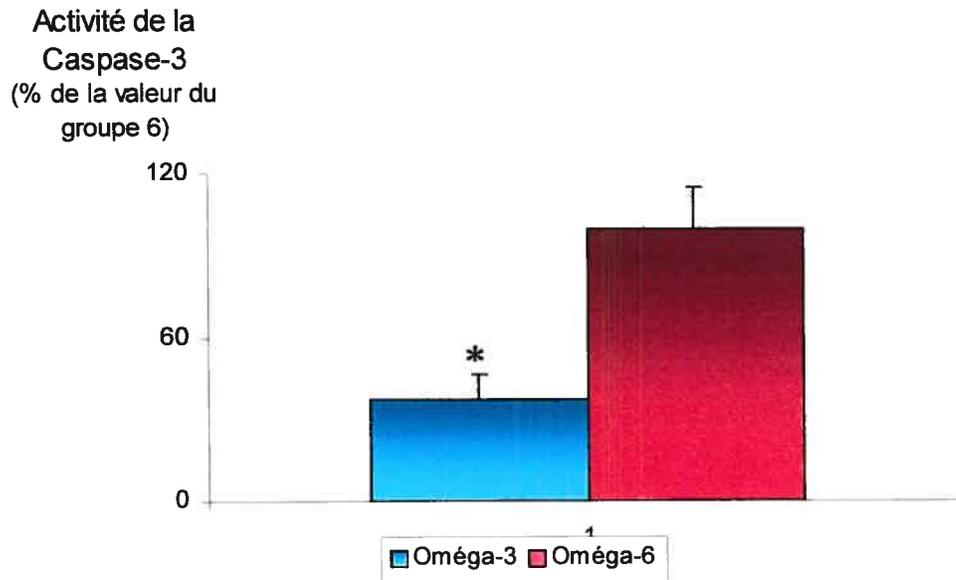
**Figure 11.** L'expression de la cytokine TNF- $\alpha$  est semblable dans le tissu cardiaque des rats nourris avec une diète riche en  $\omega$ -3 (n=6) et ceux nourris avec une diète riche en  $\omega$ -6 (n=5). Elle est exprimée à 100% chez le groupe  $\omega$ -6.

## 5. ACTIVITÉ DE LA CASPASE-3

L'activité de la Caspase-3 dans la zone normale (zone non-ischémique) du tissu cardiaque, présentée à la **Figure 12**, ne révèle aucune différence entre les animaux des groupes  $\omega$ -3 ( $96,8 \pm 38,9\%$  pour  $n=6$ ) et oméga-6 ( $100,0 \pm 45,0\%$  pour  $n=4$ ). Cependant, la **Figure 13** montre que son activité est réduite de manière significative ( $p=0,0051$ ). dans la zone à risque (zone ischémique) du tissu cardiaque des animaux nourris avec une diète enrichie en  $\omega$ -3. La consommation de cette diète a diminué l'activité de la Caspase-3 à  $37,1 \pm 9,3\%$ , comparativement à  $100 \pm 14,8\%$  pour le groupe nourri avec la diète riche en oméga-6.



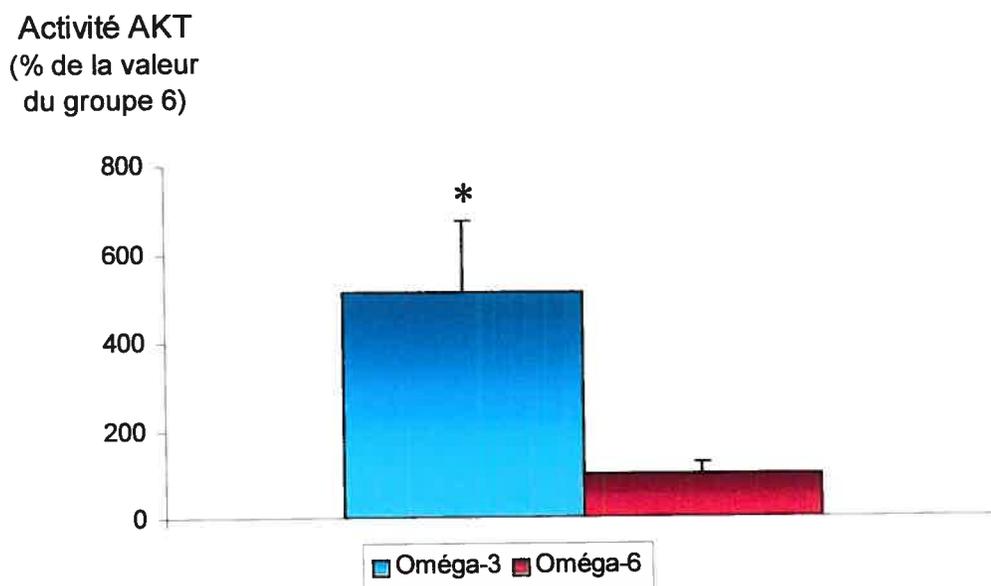
**Figure 12.** L'activité de la Caspase-3 dans la zone normale (zone non-ischémique) du tissu cardiaque des rats nourris avec une diète riche en  $\omega$ -3 ( $n=6$ ) est réduite comparativement à ceux nourris avec une diète riche en  $\omega$ -6 ( $n=4$ ). Elle est exprimée à 100% chez le groupe  $\omega$ -6.



**Figure 13.** L'activité de la Caspase-3 dans la zone à risque (zone ischémique) du tissu cardiaque des rats nourris avec une diète riche en  $\omega$ -3 (n=6) est réduite comparativement à ceux nourris avec une diète riche en  $\omega$ -6 (n=4) (\*  $p=0,0051$ ). Elle est exprimée à 100% chez le groupe  $\omega$ -6.

## 6. ACTIVITÉ DE L'AKT

La **Figure 14** montre que, dans la zone ischémique, l'activation de l'AKT (exprimée par le rapport de la forme phosphorylée comparée à la quantité totale de la protéine AKT) est significativement supérieure chez les animaux ayant reçu un supplément nutritionnel en  $\omega$ -3 ( $512,9 \pm 159,5$  pour  $n=5$ ) comparé à ceux ayant reçu un supplément nutritionnel en  $\omega$ -6 ( $100 \pm 24,2$  pour  $n=5$ ).



**Figure 14.** L'activation de la protéine l'AKT présent dans le tissu cardiaque ischémique des rats nourris avec une diète riche en  $\omega$ -3 ( $n=5$ ) est significativement plus élevée comparativement à ceux nourris avec une diète riche en  $\omega$ -6 ( $n=5$ ) (\*  $p=0,0337$ ). Elle est exprimée à 100% chez le groupe  $\omega$ -6.

## V. DISCUSSION

### 1. POIDS CORPOREL ET CONSOMMATION D'ÉNERGIE

Dans cette étude, nous avons démontré qu'une consommation quotidienne d'une diète riche en acides gras polyinsaturés  $\omega$ -3 (huile de poisson) ou  $\omega$ -6 (huile de Soya) pour une période de 8 semaines n'engendre, entre les deux groupes, aucune différence significative sur le gain de poids corporel (**Figure 4**). Ces résultats contrastent avec plusieurs études qui observent que les acides gras polyinsaturés  $\omega$ -6, retrouvés dans l'huile de Soya, induisent un gain de poids chez la souris et le rat [184-185]. Il semble que les  $\omega$ -6 ont tendance à augmenter la taille des adipocytes [186] ou le nombre des cellules adipeuses [187] et à amplifier l'activité des enzymes lipogéniques hépatiques [188]. Au contraire, les  $\omega$ -3, particulièrement ceux présents dans les huiles de poisson, tendent à favoriser la perte de poids [189-190], en freinant la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes [191]. Hye-Kyeong Kim et son équipe ont observé que l'ajout du DHA à concentrations variables à des cultures de cellules pré-adipocytes ont eu pour effet de réduire le nombre de pré-adipocytes viables en induisant leur mort par apoptose et de réduire l'accumulation de graisse dans les pré-adipocytes. Donc, plus il y a de DHA, moins la graisse s'accumule [192]. Les résultats contradictoires obtenus au cours de notre étude peuvent s'expliquer par la durée de l'étude, qui est de 8 semaines. Selon les normes en vigueur pour le Conseil canadien de protection des animaux, il est important de laisser les rats s'habituer sur une période de 4 semaines lors d'un changement de diète. Ainsi nous avons choisi d'utiliser deux mois pour s'assurer de la stabilité des changements. Nos résultats contradictoires peuvent aussi s'expliquer par le profil en acide gras polyinsaturés des diètes, lesquels affecteraient la régulation métabolique du poids corporel. En effet, les diètes  $\omega$ -3 et  $\omega$ -6 utilisées pour notre étude

contiennent 20,3% de lipides (**Tableau IV**), ce qui est le double de la diète normale chez le rat, laquelle se compose généralement 10% de lipides. Les diètes  $\omega$ -3 et  $\omega$ -6 se différencient uniquement par le rapport lipidique  $\omega$ -3/  $\omega$ -6 (0,2 pour la diète  $\omega$ -3 et 5,0 pour la diète  $\omega$ -6), lequel est de 1/5 pour notre étude. Dans une diète normale, ce même rapport est d'environ 1/10. De plus, dans une diète normale, le taux en  $\omega$ -3 est de 0,2 g/kg, ce qui faible si l'on compare à celui de notre diète riche en  $\omega$ -3 (58,9 g/kg) et de notre diète riche en  $\omega$ -6 (15,3 g/kg). Il ne semble pas avoir de norme pour la teneur en  $\omega$ -3 dans une diète normale. Comme nous avons décidé d'utiliser des diètes riches en lipides, il est donc normale d'obtenir une plus grande teneur en  $\omega$ -3 dans nos diètes que dans la diète normale. Afin de s'assurer l'absence de déficience nutritive chez les rats ayant reçu une diète riche en lipides ( $\omega$ -3 ou  $\omega$ -6), nous avons nourris une série de rat avec une diète normale (non montré). Nos résultats révèlent aucun problème de croissance chez les rats nourris avec nos diètes riches en lipides (non montré). Le profil lipidique des diètes riches en gras peut varier énormément selon les études puisqu'il n'existe aucune norme quant à la teneur en certains lipides que doit contenir ces diètes. Par exemple, Jen et ses collègues ont utilisé des diètes contenant 65,4% de lipides (400 g/kg en huile de poisson ou 330 g/kg en huile de soya) [224], alors que nos diètes en contiennent 20,3% (32,6 g/kg en huile de poisson ou 11,1 g/kg). Cependant, Pellizzon affirme que « les types des acides gras polyinsaturés utilisés, la quantité de lipides dans les diètes et la durée de l'étude sont seulement quelques facteurs qui peuvent affecter les résultats » [187-190]. Il est vrai que les acides gras polyinsaturés exercent une variété d'effets au sein de l'organisme, de nouvelles recherches en ce sens devront être élaborées pour mieux comprendre le phénomène.

Nous avons décidé d'utiliser une diète riche en lipides parce que cette diète est plus représentative de la diète nord-américaine et que nous pensions qu'une forte concentration de

lipides accentuerait les différences entre les groupes. Or selon nos résultats, la taille moyenne de l'infarctus dans le groupe  $\omega$ -6 est similaire à la taille de l'infarctus que l'on obtient avec notre diète standard [218] suggérant que l'augmentation de lipides, n'a pas d'effet majeur sur la taille de l'infarctus. Toutefois pour valider cette hypothèse, une nouvelle étude devrait être entreprise pour comparer les effets d'une diète normale et notre diète oméga-6. C'est une des limites de notre étude.

Si la composition en acides gras de la diète peut affecter le poids corporel, elle peut également affecter l'appétit. Certaines études font le lien entre les acides gras polyinsaturés et la leptine. La leptine est une hormone produite et sécrétée dans la circulation sanguine par les adipocytes. Son action essentielle est de couper l'appétit en se fixant sur des récepteurs au niveau de l'hypothalamus, causant ainsi une perte de poids corporel chez le rat [193-194]. Il a été confirmé, chez l'humain, que la concentration de leptine dans le sang est liée au pourcentage de graisses dans le corps et au poids corporel [195-196]. Par ailleurs, il semble donc qu'une consommation d' $\omega$ -3 stimule la production de la leptine, d'où une perte d'appétit [197]. Or, nos résultats ne révèlent aucune différence significative entre les deux groupes concernant l'appétit (**Figure 5**). La durée de l'étude et le profil en acides gras polyinsaturés des diètes pourraient jouer un rôle dans l'appétit via la sécrétion de la leptine. Des études en ce sens seraient très intéressantes.

## **2. TAILLE DE L'INFARCTUS ET AIRE DE LA ZONE À RISQUE**

Notre étude démontre l'effet bénéfique d'une consommation d'acides gras polyinsaturés  $\omega$ -3 d'origine marine sur la taille de l'infarctus du myocarde chez le rat. En effet, nos résultats révèlent une réduction significative d'environ 22 % de la taille de l'infarctus chez les rats nourris

avec une diète enrichie aux  $\omega$ -3 par rapport à ceux nourris avec la diète enrichie aux  $\omega$ -6 (Figure-6). Lorsqu'on utilise la diète standard de l'animalerie, la taille d'infarctus de nos groupes témoin est de l'ordre de 50%, ce qui est similaire à celle retrouvée dans le groupe  $\omega$ -6. Ainsi les  $\omega$ -6 ne semblent pas avoir un effet négatif par rapport à notre diète standard et suggèrent que les  $\omega$ -3 ont plutôt des effets positifs. Pour confirmer ou infirmer la validité du traitement aux  $\omega$ -3, il aurait été souhaitable de mesurer les proportions lipidiques dans les membranes des tissus cardiaques chez les groupes à l'étude afin de vérifier si les  $\omega$ -3 sont bien incorporés dans les membranes lipidiques. Une étude de Oskarsson *et al* nous montre des résultats similaires chez un autre modèle animal, le chien. Ils ont obtenu une taille de l'infarctus de 29 +/- 7% pour le groupe contrôle et de 13 +/- 3% pour le groupe ayant reçu l'huile de poisson ( $p < 0.05$ ) [223]. Quant à la taille de l'infarctus (I/ZR) chez les rats nourris avec la diète, elle est d'environ 50%, ce qui est similaire à celle observée, chez les rats de notre étude, qui ont été nourris avec enrichie aux  $\omega$ -6. L'hypothèse que les acides gras  $\omega$ -3 protègent le cœur a été exposée suite à l'observation du faible taux d'incidence des maladies ischémiques coronariennes chez les Inuits du Groenland et les Japonais [37]. Une forte consommation de EPA et DHA altère le rapport  $\omega$ -6/  $\omega$ -3 dans les membranes phospholipidiques des cardiomyocytes causée par une diminution des  $\omega$ -6 au profit des  $\omega$ -3 [198]. Ce remplacement s'effectue dans l'ensemble des membranes tissulaires [37]. Bien que le rapport  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 idéal soit de 1 :1. Plusieurs scientifiques proposent plutôt un rapport égale à 5 [42] pour satisfaire la totalité de l'organisme, ce qui correspond à celui utilisé pour notre étude. Il semble toutefois exister des effets distincts sur les fonctions physiologiques du cœur selon que l'on utilise les AGPI isolés (EPA et/ou DHA) ou les huiles riches en AGPI (huile de poisson). Sergiel et ses collègues révèlent que l'effet anti-ischémique de l'huile de poisson alimentaire n'est pas observé avec l'EPA ou le DHA seul. Cet effet semble relié à la teneur en EPA dans les phospholipides membranaires [202]. En effet, l'acide arachidonique est diminuée de façon plus

importante par le DHA que par l'EPA alimentaire. Dans le groupe EPA, le DHA membranaire est plus faible que dans le groupe DHA, mais les acides éicosapentaénoïque et docosapentaénoïque sont plus élevés. Ces variations de la composition en acides gras des membranes modifient donc le fonctionnement cardiaque. Il convient maintenant de déterminer les conditions alimentaires optimales pour favoriser l'accumulation d'EPA [202]. L'effet protecteur des  $\omega$ -3 sur les maladies cardiovasculaires tient compte de plusieurs mécanismes dont le métabolisme des eicosanoïdes, l'inflammation, la dysfonction endothéliale, les cytokines, et l'expression génique [217]. Les  $\omega$ -3 peuvent inhiber les médiateurs lipidiques issus de l'AA, lesquels possèdent des propriétés vasoconstrictrices et pro-agrégante comme le  $\text{TXA}_2$ . Ils peuvent aussi inhiber la synthèse et la libération des cytokines pro-inflammatoires comme  $\text{TNF-}\alpha$  et IL-1 libéré au cours de l'ischémie, diminuant ainsi la réponse inflammatoire, laquelle est une caractéristique de l'infarctus du myocarde.

### 3. AGRÉGATION PLAQUETTAIRE

De nombreuses études mettent en relief l'action antihémostatique et antithrombotique des acides gras  $\omega$ -3 à longue chaîne d'origine marine (EPA, DHA). Cependant, l'effets des  $\omega$ -3 sur la fonction plaquettaire et sur le thrombose demeurent controversés. Bien que Dyerberg et al aient démontré que les huiles de poissons réduisent l'agrégation plaquettaire par l'intermédiaire du métabolisme des eicosanoïdes, des études subséquentes ont obtenues des résultats contradictoires [199]. C'est notamment le cas de notre étude où l'on observe un taux d'agrégation plaquettaire significativement plus élevé que nous avons obtenus chez les rats nourris avec une diète riche en  $\omega$ -3 que chez ceux nourris avec une diète riche en  $\omega$ -6 après 72 heures de reperfusion (**Figure 8**). Il est possible que les plaquettes les plus réactives provenant des animaux avec la diète  $\omega$ -6 soient déjà emprisonnées dans le tissu cardiaque ou ailleurs alors que les plaquettes circulantes

soient celles qui sont les moins réactives. A l'opposé les plaquettes des animaux avec la diète  $\omega$ -3 ne sont pas activées et donc représentent vraiment toute la population plaquettaire. Pour répondre à cette hypothèse, le nombre de plaquettes accumulées dans le myocarde devrait être mesuré afin de déterminer si une différence existe entre les groupes. De plus, l'agrégation plaquettaire devrait être mesurée avant le début de l'ischémie afin de déterminer si une différence existe à l'état basal.

#### 4. EXPRESSION DE COX-2 ET DE TNF- $\alpha$

Notre étude a tenté de démontrer les effets bénéfiques des acides gras  $\omega$ -3 d'origine animale sur l'inflammation engendrée par un infarctus du myocarde et ce à travers l'analyse du taux de la COX-2 et de la cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$  chez les tissus cardiaques. En ce qui concerne la cytokine TNF- $\alpha$ , nos résultats n'indiquent aucun changement significatif (**Figure 10**). Pourtant, bon nombre de chercheurs s'accordent pour dire que les  $\omega$ -3 inhibent la synthèse et l'action de TNF- $\alpha$  et autres cytokines pro-inflammatoires (ex : IL1 et IL-6) [64-205-220], dont les mécanismes impliquent probablement les médiateurs inflammatoires que sont les eicosanoides [206]. De plus, Tashiro *et al* révèlent que les  $\omega$ -6 augmentent la synthèse de TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 alors que les  $\omega$ -3 réduisent leur production [221]. Toutefois, il peut s'avérer qu'à un certain rapport  $\omega$ -6/  $\omega$ -3 les effets bénéfiques des  $\omega$ -3 soient inconstants. En effet, il semble que, dans certaines situations, une diète composée d'huile de poissons peut agir comme un « antagoniste » de l'agent anti-inflammatoire PGE2 de la série  $\omega$ -6, engendrant ainsi des effets opposés à ceux prévus préalablement [207]. De plus, certains métabolites de la série des  $\omega$ -6, tels que l'acide linoléique gamma, agissent en tant qu'agent anti-inflammatoire [210]. Ainsi, ces observations peuvent expliquer en partie l'effet « neutre » de nos résultats sur le contenu en TNF- $\alpha$  cardiaque.



On sait que la COX-2 est une enzyme principalement exprimée aux sites inflammatoires et qui produit les eicosanoïdes pro-inflammatoires [208]. Il semble que les effets bénéfiques des  $\omega$ -3 anti-inflammatoires rapporté par différents chercheurs inhiberaient la production des ces médiateurs pro-inflammatoires [34]. Denkins *et al* révèlent que les  $\omega$ -3 et les  $\omega$ -6 régulent l'expression de l'ARNm de COX-2 et la production de PGE<sub>2</sub>. AA augmente significativement l'expression de l'ARNm de COX-2 et la production de PGE<sub>2</sub> dans les cellules 70W stimulé par  $\omega$ -6. Par contre, l'expression de l'ARNm de COX-2 est diminuée dans les cellules incubées avec EPA et DHA. Donc, l'effet bénéfique des  $\omega$ -3 semble lié à l'inhibition de l'activité de COX-2 et, par conséquent, à la réduction des niveaux de production PGE<sub>2</sub> [222]. Comme pour la cytokine TNF- $\alpha$ , nos recherches ne montrent aucun changement significatif dans le taux de la COX2 chez les rats nourris aux  $\omega$ -3 durant 8 semaines (**Figure 9**). Toutefois, la présence d'une protéine ne nous donne pas d'informations sur son activité. Or il est possible que l'activité de COX-2 soit plus faible dans le groupe  $\omega$ -3 que dans le groupe  $\omega$ -6, ce qui reste devraient être vérifié lors d'études futures.

## 5. ACTIVITÉ DE LA CASPASE-3 ET DE AKT

La **Figure 12** nous montre une réduction significative de l'activité de la Caspase-3 dans la zone à risque (zone ischémique) du tissu cardiaque chez les rats nourris avec une diète enrichie en  $\omega$ -3 suite à une ischémie de 40 minutes et une reperfusion de 72 heures. Il est intéressant de constater l'effet bénéfique d'une supplémentation en  $\omega$ -3 sur l'infarctus du myocarde. Des études sur le cancer démontrent que les  $\omega$ -3 induisent un arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose par l'activation des protéines phosphatases qui implique la protéine Bcl-2. Cette dernière régule la libération du cytochrome c de la mitochondrie aboutissant éventuellement à l'activation de

l'enzyme apoptotique caspase-3 [210]. Or, le mécanisme moléculaire des  $\omega$ -3 sur le phénomène de l'apoptose suite à une ischémie/reperfusion n'est pas totalement compris et doit intégrer un grand nombre de voies de signalisation dont celles affectant l'activation des MAPKs. L'activation des MAPKs inclue celle des cascades de ERK ½ p38 MAPK et JNK, des protéines aux fonctions biologiques diverses. [211-212-213-214]. L'activation de ces différentes cascades peut conduire à la translocation nucléaire des MAPKs, qui phosphorylent et activent des facteurs de transcription spécifiques jouant [219]. Une étude de Shizukuda et Buttrick démontre que l'apoptose a été induite à travers la stimulation du récepteur de TXA2 (eicosanoïdes de la famille des oméga-6) qui active PKC, lequel supprime l'activation de l'AKT [215]. La protéine AKT est la clé de voûte de la prolifération et de la survie cellulaire. Son activation par phosphorylation met en œuvre plusieurs mécanismes pour contrer le processus de l'apoptose. Nos résultats révèlent une activité significativement plus élevée chez les rats nourris aux  $\omega$ -3 (**Figure 13**). Selon Akbar, l'altération de la membrane par les  $\omega$ -3 affecte la voie de signalisation de PI3K/AKT en facilitant la translocation et l'activation de AKT à la membrane puisqu'ils ont la capacité d'augmenter la phosphatidylsérine, un phospholipide majeur des membranes cellulaires [216].

## VI. CONCLUSION

Plusieurs études effectuées sur un modèle animal ont mis en évidence l'effet bénéfique de la consommation des poissons sur les maladies cardiovasculaires. L'ensemble de ces études suggèrent que les acides gras polyinsaturés de la famille des  $\omega$ -3 exercent à travers leur métabolisme, une action préventive sur certains facteurs de risque impliqués dans les maladies cardiovasculaires, dont la coagulation et l'agrégation plaquettaire, la tension artérielle, l'hypertriglycémie, l'arythmie ventriculaire et l'inflammation. Les résultats du présent mémoire montrent que l'ajout des acides gras polyinsaturés de la famille  $\omega$ -3 ou de la famille  $\omega$ -6 à la ration des rats, et ce durant 8 semaines, n'influence en rien le poids corporel et la consommation en énergie de l'animal. Cependant, nos résultats indiquent qu'une diète riche en  $\omega$ -3 réduit significativement la taille de l'infarctus du myocarde suite à une ischémie de 40 minutes suivie de 72 heures de reperfusion. Certains paramètres, tels que l'activité de la caspase-3 ainsi que celle de Akt dans la zone à risque, viennent renforcer notre hypothèse de départ.

La présente étude semble justifier l'intérêt grandissant pour les  $\omega$ -3 à longue chaîne pour contrer les maladies cardiovasculaires. Malgré les vertus qu'on leur prête, bon nombre d'interrogations demeurent en suspens. Une recherche plus approfondie de l'influence des rapports alimentaires d'acides gras essentiels ( $\omega$ -6/  $\omega$ -3) sur l'infarctus du myocarde chez différents modèles animaux reste pertinente et contemporaine. Néanmoins, il reste beaucoup de travail à faire pour évaluer tous les mécanismes dans lesquels sont impliqués les  $\omega$ -3 dans les maladies cardiovasculaires.

## VI. BIBLIOGRAPHIE

1. **Dyerberg *et al.*** Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis. *Lancet.* **1978**;2:117-9.
2. **Yamori *et al.*** Comparaison of serum phospholipid fatty acids among fishing and farming Japanese populations and American islanders. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **1985**;31:417-22.
3. **Albert *et al.*** Blood levels of long-chain n-3 fatty acids and the risk of sudden death. *N. Engl. J. Med.* **2002**;346(15):1113-8.
4. **Dolecek & Granditis.** Dietary polyunsaturated fatty acids and mortality in the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *World Rev. Nutr. Diet.* **1991**;66:205-16.
5. **Jialal *et al.*** GISSI-Prevenzione. *Trials Lancet.* **1999**;354(9189):1554; author reply 1556-7.
6. **Burr *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):757-61.
7. **Voet & Voet.** *Biochimie.* **1998**, DeBoeck Université, Traduction de la 2<sup>e</sup> édition américaine par Yves Gaudemer, Paris, 1361p.
8. **Koolman & Röhm.** *Atlas de Biochimie.* **1999**, Medecine-Sciences, Flammarion, 2<sup>e</sup> édition, Paris, 462p.
9. **McMurry.** *Chimie organique : Les grands principes - Cours et exercices corrigés.* **2000**, Traduit de l'américain par C. Darcel et J. Uziel, Dunod, Paris, 615p.
10. **Solomons & Fryhle.** *Chimie organique.* **2000**, Modulo Éditeur, traduction française, Mont-Royal (Québec) Canada, 1151p.
11. **Gunstone *et al.*** *The Lipid Handbook.* **1994**, Chapman & Hall (2nd Edition), London.
12. **Cuveler *et al.*** Acides gras : nomenclature et sources alimentaires. *Ann. Méd. Vet.* **2004**;148:13-140.
13. UN. Clinical significance of essential fatty acids. *Nutrition.* **1988**;4 :337-42.
14. UN. Essential fatty acids : Biology and their clinical implications. *Asian Pacific J. Pharmacol.* **1991**; 6: 317-30.
15. <http://www.eufic.org/article/fr/page/BARCHIVE/expid/basics-graisses/> [14 mai 2007]

16. **Guesnet *et al.*** Les rôles physiologiques majeurs exercés par les acides gras polyinsaturés (AGPI). *OCL.* **2005**;12 (5-6).
17. **Bazan *et al.*** Chain elongation and desaturation of eicosapentaenoate to docosahexaenoate and phospholipid labeling in the rat retina in vivo. *Biochim. Biophys. Acta.* **1982**;712(1):123-8.
18. **Sprecher.** Metabolisme of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta.* **2000**;1486:219-31.
19. **Manabu *et al.*** Structure, Function and Dietary Regulation of  $\Delta$ 6,  $\Delta$ 5, and  $\Delta$ 9 Desaturases. *Annu. Rev. Nutr.* **2004**; 24:345-76.
20. **Cho *et al.*** Cloning, expression, and fatty acid regulation of the human delta-5 desaturase. *J. Biol. Chem.* **1999**;274:37335-39.
21. **Cho *et al.*** Cloning, expression, and nutritional regulation of the mammalian delta-6 desaturase. *J. Biol. Chem.* **1999**;274:471-77.
22. **Calder.** n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: evidence explained and mechanisms explored. *Clinical Science.* **2004**;107:1-11.
23. **Sprecher.** Biochemistry of essential fatty acids. *Prog. Lipid Res.* **1981**;20:13–22.
24. **Undurti.** Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology. *Biotechnol. J.* **2006**;1:420-39.
25. **Nervi *et al.*** Dietary and hormonal effects upon activity of «soluble» protein and particulate fraction of fatty acid desaturation system of rat liver microsomes. *Lipids.* **1975**;10:348.
26. **Jeffcoat & James.** Interrelationship between the dietary regulation of fatty acid synthesis and the fatty acyl-CoA desaturases. *Lipids.* **1977**;12:469.
27. **Mahfouz *et al.*** Effect of dietary fats on desaturase activities and the biosynthesis of fatty acids in rat-liver microsomes. *Lipids.* **1984**;19:214–22.
28. **Pugh & Kates.** The dietary regulation of acyltransferase and desaturase activities in microsomal membranes of rat liver. *Lipid.* **1984**;19(1):48-55.
29. **Garg *et al.*** Delta 6-desaturase activity in liver microsomes of rats fed diets enriched with cholesterol and/or omega 3 fatty acid. *Biochem. J.* **1988**;249:351–56.
30. **Blond.** Delta-6 and delta-5 desaturase activities in liver from obese Zucker rats at different ages. *Lipids.* **1989**;24:389-95.

31. **Giron *et al.*** Short-term effects of dietary fats on the lipid composition and desaturase activities of rat liver microsomes. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1996;40(4): 843-51.
32. Scientific Review committee, Nutrition recommendations Ottawa: Minister of National Health and Welfare, Canada, 1990.
33. **Simopoulos & Cleland.** Oméga-6/Oméga-3 Essential Fatty Acid Ratio: The Scientific Evidence. *World Review of Nutrition and Dietetics.* 2003;92.
34. **Aselmino et al.** Omega-3 et bénéfique santé. *NutriScience.* Paris, 1988.
35. **Dufour & Festy.** *La révolution des oméga-3 : 36 questions/réponses sur les nouvelles stars de la santé.* 2004, Leduc.s Éditions, Paris, 127p.
36. **Rueff.** *Oméga-3 : Mieux vivre et préserver sa santé.* 2004, Éditions Jouvence, 94p.
37. **de Lorgeril & Salen.** *Le Pouvoir des oméga-3 : Une nouvelle médecine nutritionnelle.* 2004, Editions Alpen, Monaco, 127p.
38. **Sears & Barry.** *Le Régime oméga-3 : le miracle des suppléments d'huile de poisson.* 2003, Les Éditions de l'Homme, Québec, 405p.
39. **Gerster.** Can adults adequately convert alpha-linolenic acid (18:3n-3) to eicosapentaenoic acid (20:5n-3) and docosahexaenoic acid (22:6n-3)? *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 1998;68:159-73.
40. **Emken *et al.*** Effect of triacylglycerol structure on absorption and metabolism of isotope-labeled palmitic and linoleic acids by humans. *Lipids.* 2004;39:1-9.
41. **Burdge *et al.*** Effect of altered dietary n-3 fatty acid intake upon plasma lipid fatty acid composition, conversion of [13C]alpha-linolenic acid to longer-chain fatty acids and partitioning towards beta-oxidation in older men. *Br. J. Nutr.* 2003;90(2):311-21.
42. **Burdge.** Alpha-linolenic acid metabolism in men and women: nutritional and biological implications. *Curr. Opin. Clin. Metab. Care.* 2004;7(2):137-44.
43. **Burdge & Wootton.** Conversion of alpha-linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women. *Br. J. Nutr.* 2002;88:411-20.
44. **Williams & Burdge.** Long-chain n-3 PUFA: plant v. marine sources. *Proc. Nutr. Soc.* 2006;65(1):42-50.
45. **Hwang.** Effects of Brazilin on the phospholipase A2 activity and changes of intracellular free calcium concentration in rat platelet. *Arch. Pharm. Res.* 1998;21(6):774-8.

46. **Miles & Calder.** Modulation of immune function by dietary fatty acids. *Proc. Nutr. Soc* **1998**;57(2):277-92.
47. **Silbernagl & Lang.** *Atlas de poche de physiopathologie.* **2000**, Médecine-Science Flammarion pour la traduction française. 406p.
48. **Mayer & Marshall.** New insights on mammalian phospholipase A2(s); comparison of arachidonoyl-selective and nonselective enzymes. *FASEB J.* **1993**;7(2):339-48.
49. <http://fr.wikipedia.org/wiki/Cyclo-oxyg%C3%A9nase>[14 mai 2007]
50. **Willoughby & Moore.** Colville-Nash.COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. *The Lancet.* **2000**;355(9204):646-48.
51. **Chandrasekharan et al.** COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. *PNAS.* **2002**;99(21):13926-31.
52. **Smith et al.** Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu. Rev. Biochem.* **2000**;69:145-82.
53. **Warner & Mitchell.** Cyclooxygenase-3 (COX-3): filling in the gaps toward a COX continuum? *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **2002**;99(21):13371-3.
54. **Khanapure et al.** Eicosanoids in inflammation: biosynthesis, pharmacology, and therapeutic frontiers. *Curr. Top. Med. Chem.* **2007**;7(3):311-40.
55. **Folco & Murphy.** Eicosanoid Transcellular Biosynthesis: From Cell-Cell Interactions to in Vivo Tissue Responses. *Pharmacological Reviews.* **2006**;58:375-388.
56. **Emken.** Alpha-Linolenic Acid Conversion to n-3 LC-PUFAs. *PUFA Newsletter*, September **2003**. [www.fatsoflife.com](http://www.fatsoflife.com)
57. **Rang et al.** *Pharmacology.* **2003**, Fifth Edition. Churchill Livingstone, 797p.
58. **Katzung.** *Basic & Clinical Pharmacology.* **2004**, Ninth edition by The McGraw-Hill Companies, Inc, 1202p.
59. **Dilprit Bagga et al.** Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2003**;100(4):1751-6.
60. **Fischer & Weber.** Thromboxane A3 (TXA3) is formed in human platelets after dietary eicosapentaenoic acid (C20:5 omega 3). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1983**;116(3):1091-9.

61. **Peter-Golden & Brock.** 5-lipoxygenase and FLAP. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. **2003**;69(2-3):99-109.
62. **Werz.** 5-lipoxygenase: cellular biology and molecular pharmacology. *Curr. Drug. Targets Inflamm. Allergy.* **2002**;1(1):23-44.
63. **Lee et al.** Effects of dietary enrichment with eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on in vitro neutrophil and monocyte leukotriene generation and neutrophil function. *N. Eng. J. Med.* **1985**; 312:1217–24.
64. **Endres et al.** The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. *N. Eng. J. Med.* **1989**;320:265–71.
65. **Von Schacky et al.** N-3 fatty acids and cysteinyl-leukotriene formation in humans in vitro, ex vivo and in vivo.*J. Lab. Clin. Med.* **1993**;121:302–9.
66. <http://expobiologie.free.fr/eicosanoides.htm> [14 mai 2007]
67. [http://www.pharmacorama.com/Rubriques/Output/Eicosanoidesa2\\_2.php](http://www.pharmacorama.com/Rubriques/Output/Eicosanoidesa2_2.php) [14 mai 2007]
68. **Leonard et al.** Elongation of long-chain fatty aids. *Progress in Lipid Research.* **2004**;43:36-54.
69. **Jump.** The Biochemistry of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids. *JBC.* **2002**;277(11):8755-8.
70. <http://www.nutrisana.com/canada/omegafr.html> [14 mai 2007]
71. **Harrison & Abhyankan.** The mechanism of action of oméga-3 fatty acids in secondary prevention post-myocardial infarction. *Current medical research and opinions.* **2005**;21(1):95-100.
72. **Holub.** Clinical nutrition: 4. Oméga-3 fatty acids in cardiovascular care. *JAMC.* **2002**;166(5):608-15.
73. **Harris.** Expert opinion: omega-3 fatty acids and bleeding-cause for concern? *Am J Cardiol.* **2007**;99(6A):44C-46C.
74. **Mueller & Talbert.** Biological mechanisms and cardiovascular effects of omega-3 fatty acids. *Clin Pharm.* **1988**;11:795-807.
75. **Mori et al.** Differential effects of eicosapentaenoic acid and docasahexaenoic acid on forearm vascular reactivity of microcirculation in hyperlipidaemic, overweight men. *Circulation.* **2000**;102:1264-9.
76. **Mori.** Omega-3 fatty acids and hypertension in humans. *Clinical and experimental Pharmacology and Physiology.* **2006**;33:842-6.

77. **Cobiac *et al.*** A low sodium diet supplemented with fish oil lowers blood pressure in the elderly. *J Hypertens.* **1992**;10:87-92.
78. **Nenseter *et al.*** Effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on physical properties and metabolism of low density lipoprotein in humans. *Atheroscler Thromb.* **1991**;12:369-79.
79. **Nestel.** Fish oil and cardiovascular disease: lipids and arterial function. *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**;71:228S-31S.
80. **Harris *et al.*** Safety and efficacy of Omacor in severe hypertriglyceridemia. *J Cardiovasc Risk.* **1997**; 3: 385-91.
81. **Pegorier *et al.*** Control of gene expression by fatty acids. *J. Nutr.* **2004**;134(9):2444S-2449S.
82. **Clarke *et al.*** Peroxisome proliferator-activated receptors: a family of lipid-activated transcription factors. *Am. J. Clin. Nutr.* **1999**;70:566-71.
83. **Clarke *et al.*** Polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *J. Nutr.* **1996**;126:1105S-9S.
84. **Keller *et al.*** Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptors-retinoid X receptor heterodimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1993**;90:2160-4.
85. **Sakai & Rawson.** The sterol regulatory element-binding protein pathway: control of lipihomeostasis through regulated intracellular transport. *Curr. Opin. Lipidol.* **2001**;12:262-6.
86. **Leaf *et al.*** Diet and sudden cardiac death. *J Nutr Health Aging* **2001**;5:173-8
87. **Xiao *et al.*** Suppression of voltage-gated L-type Ca<sup>2+</sup> currents by polyunsaturated fatty acids in adult and neonatal rat ventricular myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1997**;94:4182-87.
88. **Xiao *et al.*** Fatty acids suppress voltage-gated Na<sup>+</sup> currents in HEK293t cells transfected with the  $\alpha$ -subunit of the human cardiac Na<sup>+</sup> channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1998**;92:2680-85.
89. **Christensen *et al.*** Effect of fish oil on heart rate variability in survivors of myocardial infarction: a double blind randomised controlled trial. *Br. Med. J.* **1996**;312:1441-2.
90. **Robinson & Neil.** Antitherosclerotic and Antithrombotic Effects of Omega-3 Fatty Acids. *Am. J. Cardiol.* **2006**;98:39i-49i.

91. **De Caterina et al.** the omega-3 fatty acid docosahexaenoate reduces cytokine-induced expression of proatherogenic and proinflammatory proteins in endothelial cells. *Arterioscler. Thromb.* **1994**;14:1826-36.
92. **Collie-Duguid & Wahle.** Inhibitoray effect of fish oil n-3 polyunsaturated fatty acids on the expression of endothelial cell adhesion molecules. *Biochem. Biophy. Res. Commun.* **1996**;220:969-74.
93. **Prescott & Stenson.** Fish oil fix. *Nat. Med.* **2005**;11:596-8.
94. **Simopoulos.** Omega-3 Fatty Acids in Inflammation and Autoimmune Diseases. *J. Ameri. Coll. Nutr.* **2002**;21(6):495-505.
95. [http://fr.wikipedia.org/wiki/Infarctus\\_du\\_myocarde](http://fr.wikipedia.org/wiki/Infarctus_du_myocarde) [14 mai 2007]
96. <http://fr.wikipedia.org/wiki/Infarctus> [14 mai 2007]
97. <http://www.swissheart.ch/f/herz/krankheiten/herzinfarkt.htm> [14 mai 2007]
98. <http://spiral.univ-lyon1.fr/polycops/Cardiologie/Cardiologie-61.html> [14 mai 2007]
99. **Ovize et al.** Ischémie-reperfusion myocardique. Dans GRRC. *Biologie et pathologie du coeur et des vaisseaux. Medecine-Sciences, Flammation*, **2002**, Paris.
100. **Marieb.** *Anatomie et physiologie humaine. Édition du renouveau pédagogique*, **1993**, Québec, 1014p.
101. **Opie.** *The Heart: Physiology and Metabolism.* **1991**, Raven. Press. NY.
102. **Kusuoka et al.** Delayed effects to sublethal ischemia on acquisition of tolerance ischemia. *Circ. Res.* **1993**;72:1293-9.
103. **Murry et al.** « Preconditionning » with ischemia : a delay of lethal cell injury in ischemia myocardium. *Circulation.* **1986**;5:1124-36.
104. **Buja et al.** Altered calcium homeostasis in the pathogenesis of myocardial ischemic and hypoxic injury. *Cell Calcium.* **1988**;5-6:205-17.
105. **Kroemer et al.** The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu. Rev. Physiol.* **1998**;60:619-42.
106. **Inoue et al.** ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature.* **1991**;352:244-7.
107. **Moens et al.** Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process. *Int. J. Cardiol.* **2005**;100(2):179-90.

108. **Barry.** Mechanisms of myocardial cell injury during ischemia and reperfusion. *J. Card. Surg.* **1987**;2(3):375-83.
109. **Piper.** Energy deficiency, calcium overload or oxidative stress: possible causes of irreversible ischemic myocardial injury. *Klin. Wochenschr.* **1989**;67(9):465-76.
110. **Farber et al.** Myocardial ischemia: the pathogenesis of irreversible cell injury in ischemia. *Am. J. Pathol.* **1981**;102(2):271-81.
111. **Reimer et al.** The wavefront phenomenon of myocardial ischemic cell death, I: myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation.* **1977**;56:786-94
112. **Reimer & Jennings.** The wavefront phenomenon of myocardial ischemic cell death, II: transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow. *Lab. Invest.* **1979**;40:633-44.
113. **Poole-Wilson.** Recovery of severely ischemic myocardium—a challenge for the clinical cardiologist. *Pathophysiology of severe ischemic myocardial injury.* **1990**;15-24.
114. **Rousseau et al.** Importance of platelets in myocardial injury after reperfusion in the presence of residual coronary stenosis in dogs. *Am Heart J.* **1993**;125(6):1553-63.
115. **Libersan et al.** The low molecular weight heparin, enoxaparin, limits infarct size at reperfusion in the dog. *Cardiovasc Res.* **1998**;37(3):656-66.
116. **De Lorgeril et al.** Spacial and temporal profiles of neutrophil accumulation in the reperfused ischemic myocardium. *Am J Cardiovasc Pathol.* **1990**;3(2):143-54.
117. **Carafoli.** The homeostasis of calcium in heart cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **1985**;17:203-212.
118. **Piper.** Irreversible ischemia injury—definition or the problem. *Pathophysiology of severe ischemic myocardial injury.* **1990**; 3-14.
119. **Chien et al.** Ischemic myocardial cell injury: prevention by chlorpromazine of an accelerated phospholipid degradation and associated membrane dysfunction. *Am. J. Pathol.* **1979**;97:505–29.
120. **Farber.** The pathogenesis of irreversible cell injury in ischemia. *Am J. Pathol.* **1981**;102:271–81
121. **Pontremoli.** **1986.** Extralyosomal protein degradation. *Annu Rev Biochem* **55**, pp. 455–481.

122. **Anversa et al.** Apoptosis and myocardial infarction. *Basic Res. Cardiol.* **1998**;93:suppl. 3,8–12.
123. **James.** Apoptosis in cardiac disease. *Am. J. Med.* **1999**;107:606–20.
124. **McCord.** Free radicals and myocardial ischemia: overview and outlook. *Free Radical Biol. Med.* **1988**;4:9–14.
125. **Lopez-Neblina.** Molecular biology of apoptosis in ischemia and reperfusion. *Journal of Investiative Surgery.* **2005**;18:335-50.
126. **Arii et al.** Current progress in the understanding of th therapeutic strategies for ischemia and reperfusion injury of the liver. *J. Hepatobiliary Pancreat Surg.* **2003**;10:189-94.
127. **Takahashi et al.** Role of NF-kappaB on liver cold ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol Gastrointes.t Liver Physiol.* **2002**;283:G1175-G1184.
128. **Dumont et al.** Cardiomyocyte death induces by myocardial ischemia and reperfusion : measurement with recombinant human Annexi-V in a mouse model. *Circulation* **2000**;102:1564-8.
129. **Eefting et al.** Role of apoptosis in reperfusion injur. *Cardiovascular Research.* **2004**;61:414-26.
130. <http://en.wikipedia.org/wiki/Apoptosis> [14 mai 2007]
131. <http://www.baclesse.fr/cours/fondamentale/4-division-cellulaire/Divis-i-17.htm>  
[14 mai 2007]
132. **Leist et al.** Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J. Exp. Med.* **1997**;185:1481-6.
133. **Eguchi et al.** Intracellular ATP levels determine cell fated by apoptosis or necrosis. *Cancer Res.* **1997**;57:1835-40.
134. **Kass et al.** Chromatin condensation during apoptosis requires ATP. *Biochem. J.* **1996**;318:749-52.
135. **Kroemer et al.** The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu. Rev. Physiol.* **1998**;60:619-42.
136. **Wilson.** Apoptotic signal transduction : emerging pathways. *Biochem. Cell. Biol.* **1998**;76:573-82.
137. **Tanaka et al.** Expression of the functional soluble form of human Fas ligand in activated lymphocytes. *EMBO J.* **1995**;14:1129-35.

138. **Mallat & Tedgui.** Apoptose dans le système vasculaire. Mécanismes et fonctions. Dans GRRC. *Biologie et pathologie du coeur et des vaisseaux. Médecine-Sciences, Inflammation*, 2002, Paris.
139. **Gustafsson & Gottlieb.** Mechanisms of Apoptosis in the Heart. *J. Clin. Immunol.* 2003; 23(6):447-59.
140. **Wang et al.** Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. *Cell.* 1996;87:629-38.
141. **Alnemri et al..** Human ICE/Ced-3 protease nomenclature. *Cell.* 1996;87:171.
142. **Walker et al.** Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme: a (p20-p10) $_2$  homodimer. *Cell.* 1994;78:343-52.
143. **De Moissac et al.** Caspase activation and mitochondrial cytochrome c release during hypoxia-mediated apoptosis of adult ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 32:53-63, 2000.
144. **Troy & Salvesen.** Caspases on the brain. *J. Neurosci. Res.* 2002;69:145-150.
145. **Fuentes-Prior & Salvesen.** The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem. J.* 2004;384:201-32.
146. **Stennicke et al.** Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J. Biol. Chem.* 1998;273:27084-90.
147. **Zamzami et al.** Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J. Exp. Med.* 1996;183:1533-44.
148. **Li et al.** Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell.* 1998;94:491-501.
149. **Luo et al.** Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell.* 1998;94:481-90.
150. **Kluck et al.** The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science.* 1997;275:1132-6.
151. **Vander Heiden et al.** Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria *Cell.* 1997;91:627-37.
152. **Yang et al.** Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science.* 1997;275:1129-32.

153. **Zou et al.** An APAF-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem.* **1999**;214:11549-56.
154. **Green & Reed.** Mitochondrial and apoptosis. *Science.* **1998**;281:1309-12.
155. **Yang & Korsmeyer.** Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood.* **1996**;88:386-401.
156. **White, E.** Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev.* **1996**;10:1-15.
157. **Oltvai et al.** Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell.* **1993**;74:609-19.
158. **Chittenden et al.** Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature.* **1995**;374:733-6.
159. **Boise & Thompson.** Bcl-x(L) can inhibit apoptosis in cells that have undergone Fas-induced protease activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1997**;94:3759-64.
160. **Gibson et al.** bcl-w, a novel member of the bcl-2 family, promotes cell survival. *Oncogene.* **1996**;13:665-75.
161. **Jurgensmeier et al.** Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1998**;95:4997-5002.
162. **Narita et al.** Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1998**;95:14681-6.
163. **Shimizu et al.** Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**;95:1455-9.
164. **Oltvai et al.** Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell.* **1993**;74:609-19.
165. **Oltvai & Korsmeyer.** Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. *Cell.* **1994**;79:189-92.
166. **Sedlak et al.** Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1995**;92:7834-8.
167. **Antonsson et al. (1997).** Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science.* **1995**;277:370-2.
168. **Schendel et al.** Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1997**;94:5113-8.

169. **Schlesinger et al.** Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1997**;94:11357-62.
170. **Datta et al.** Cellular survival : a play in three AKTs. *Genes & development.* **1999**;13:2905-27.
171. **Song et al.** The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J. Cell. Mol. Med.* **2005**;9(1):59-71.
172. **De la Coste & Perret.** Bad est-elle la protéine cible des facteurs de survie? *Med. Sci.* **1997**;13 :384-6.
173. **Del Peso et al.** Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell.* **1997**;91:231-41.
174. **Ozes et al.** NF- $\kappa$ B activation by tumour necrosis factor require the Akt serine-threonine kinase. *Nature.* **1999**;401:82-5.
175. **Cross et al.** Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature.* **1995**;378:785-9.
176. **Hadjdouch et al.** Constitutive activation of protein kinase B $\alpha$  by membrane targeting promotes glucose and system A amino acid transport, protein synthesis and inactivation of glycogen synthase kinase-3 in L6 muscle cells. *Diabetes.* **1998**;47:1006-13.
177. **Meldrum.** Tumor necrosis factor in the heart. *Am Physiol Soc* **1998**; invited review:R577-R595.
178. **Dinarello & Marpolis.** Stopping the cuts: the recently discovered enzymes that process the precursor of inflammatory cytokines are good targets for the design of new anti-inflammatory therapeutic agents. *Curr. Biol.* **1995**;5:587-90.
179. **McGeehan et al.** Regulation of TNF-alpha processing by a metalloproteinase inhibitor. *Nature.* **1994**;370:558-61.
180. **Molher et al.** Protection against a lethal dose of endotoxine by a inhibitor of TNF processing. *Nature.* **1994**;370:218-220.
181. **Dinarello.** Interleukin-1 and its biologically related cytokines. *Adv. Immunol.* **1989**;44:153-205.
182. **Dinarello.** Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood.* **1996**;87:2095-147.

183. **Ferguson & Griffith.** The role of Fas ligand and TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in the ocular immune response. *Chem. Immunol. Allergy.* **2007**;92:140-54.
184. **Hill et al.** Development of dietary obesity in rats: influence of amount and composition of dietary fat *Int. J. Obes Relat. Metab. Disord.* **1992**;16:321-33.
185. **Ikemoto et al.** High-fat diet-induced hyperglycemia and obesity in mice: differential effects of dietary oils *Metabolism.* **1996**;45:1539-46.
186. **Van Amelsvoort et al.** Dietary influence on the insulin function in the epididymal fat cell of the Wistar rat. *Ann. Nutr. Metab.* **1988**;32:138-48
187. **Pellizzon et al.** Effects of dietary fatty acids and exercise on body-weight regulation and metabolism in rats. *Obesity Research.* **2002**;10:947-55.
188. **Cleary et al.** Genotype and diet effects in lean and obese Zucker rats fed either safflower or coconut oil diets *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1999**;220:153-61.
189. **Jen et al.** Lipid lowering effect of omega-3 fatty acids in genetically obese Zucker rats *Nutr. Res.* **1989**;9:1217-1228.
190. **Hill et al.** Lipid accumulation and body fat distribution is influenced by type of dietary fat fed to rats *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **1993** ;17:223-6.
191. **Kim et al.** Docosahexaenoic acid inhibits adipocyte differentiation and induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes. *J. Nutr.* **2006**;136(12):2965-9.
192. **Hye-Kyeong et al.** Docosahexaenoic Acid Inhibits Adipocyte Differentiation and Induces Apoptosis in 3T3-L1 Preadipocytes. *J. Nutr.* **2006**;136:2965-9.
193. **Campfield et al.** Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks, *Science.* **1995**;269:546-9.
194. **Halaas et al.** Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the ob gene, *Science.* **1995**;269:543-6.
195. **Considine et al.** Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans, *N. Engl. J. Med.* **1996**;334:292-5.
196. **Shimizu et al.** Serum leptin concentration is associated with total body fat mass, but not abdominal fat distribution, *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **1997**;21:536-41.
197. **Wang et al.** Effects of dietary fat types on body fatness, leptin, and ARC leptin receptor, NPY, and AgRP mRNA expression. *Am. J. Physio. Endocrin. metabolis.* **2002**;282(6):E1352-9

198. **Owen et al.** Dietary fish oil dose- and time-response effects on cardiac phospholipid fatty acid composition. *Lipids*. 2004; 39:955–61.
199. **Knapp.** Dietary fatty acids in human thrombosis and hemostasis. *Am J Clin Nutr*.1997;65:1687S–1698S.
200. **Sheppard et al.** Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *J. Leukocyte Biol*. 2005;78:1025–1042.
201. **Kleinert et al.** Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur. J. Pharmacol*. 2004;500:255–266.
202. **Sergiel et al.** Individual effects of dietary EPA and DHA on the functioning of the isolated working rat heart. *Can. J. Physiol. Pharmacol*. 1998;76:728-736.
203. **Chatelain et al.** Neutrophil accumulation in experimental myocardial infarcts: relation with extent of injury and effect of reperfusion. *Circulation*. 1987;75(5):1083-90.
204. **de Lorgeril et al.** Influence of leukopenia on collateral flow, reperfusion flow, reflow ventricular fibrillation, and infarct size in dogs. *Am Heart J*. 1989;117(3):523-32.
205. **James et al.** Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2000;71(1):343S-348S.
206. **Henderson et al.** Mediators of rheumatoid arthritis. *Br. Med. Bull*. 1987;43:415–28.
207. **Calder et al.** Fatty acids and lymphocytes functions. *British Journal of Nutrition* 2002;87: S31-S48. Cambridge University Press.
208. **Khanapure et al.** Eicosanoids in inflammation: biosynthesis, pharmacology, and therapeutic frontiers. *Curr. Top. Med. Chem*. 2007;7(3):311-40.
209. **Kapoor & Huang.** Gamma linolenic acid: an antiinflammatory omega-6 fatty acid. *Curr. Pharm. Biotechnol*. 2006;7(6):531-4.
210. **Siddiqui et al.** Omega 3-fatty acids: health benefits and cellular mechanisms of action. *Mini. Rev. Med. Chem*. 2004;4:859–71.
211. **Robinson & Cobb.** Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr. Opin. Cell Biol*. 1997;9:180–6.
212. **Ip & Davis.** Signal transduction by c-Jun N-terminal kinase (JNK): from inflammation to development, *Curr. Opin. Cell Biol*. 1998;10:205–19.

213. **Bogoyevitch et al.** Stimulation of the stress-activated mitogen-activated protein kinase subfamilies in perfused heart: p38/RK mitogen-activated protein kinases and c-Jun N-terminal kinases are activated by ischemia/reperfusion. *Circ. Res.* **1996** ;79:162–73.
214. **Knight & Buxton.** Stimulation of c-Jun kinase and mitogen activated protein kinase by ischemia and reperfusion in the perfused rat heart, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**;218:83–8.
215. **Shizukuda & Buttrick.** Protein kinase C- $\zeta$  modulates thromboxane A<sub>2</sub>-mediated apoptosis in adult ventricular myocytes via Akt *Am J Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2002**;282: H320-H327.
216. **Akbar et al.** Docosahexaenoic acid: A positive modulator of Akt signaling in neuronal survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2005**;102(36):12997.
217. **UN.** Beneficial effect(s) of n-3 fatty acids in cardiovascular diseases: but, why and how? *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids.* **2000**;63(6):351-62.
218. **Wann et al.** Vulnerability for apoptosis in the limbic system after myocardial infarction in rats: a possible model for human postinfarct major depression. *J Psychiatry Neurosci.* **2007**;32(1):1-6.
219. **Loirand & Douillon.** Voies de signalisation contrôlant la contraction et la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires. Dans GRRC. *Biologie et pathologie du coeur et des vaisseaux.* Medecine-Sciences, Flammmation, **2002**, Paris.
220. **Calder.** n-3 polyunsaturated fatty acids and cytokine production in health and disease. *Ann. Nutr. Metab.* **1997**;41(4):203-34.
221. **Tashiro et al.** n-3 versus n-6 polyunsaturated fatty acids in critical illness. *Nutrition.* **1998**;14(6):551-53.
222. **Denkins et al.** Role of omega-3 polyunsaturated fatty acids on cyclooxygenase-2 metabolism in brain-metastatic melanoma. *J. Lipid Res.* **2005** Jun;46(6):1278-84.
223. **Oskarsson 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):1280-5.
224. **Jen et al.** Differential effects of fatty acids and exercise on body weight regulation and metabolism in female Wistar rats. *Exp Biol Med (Maywood).* **2003**;228(7):843-9.

