



HAL
open science

Influence de la mélatonine sur la taille de l'infarctus myocardique lors d'un épisode d'ischémie-reperfusion

Marc Boris

► **To cite this version:**

Marc Boris. Influence de la mélatonine sur la taille de l'infarctus myocardique lors d'un épisode d'ischémie-reperfusion. Sciences pharmaceutiques. 1999. dumas-01283908

HAL Id: dumas-01283908

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01283908v1>

Submitted on 7 Mar 2016

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

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

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

2^e exemplaire



UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER
FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année: 1999

N° d'ordre: 7015

**INFLUENCE DE LA MÉLATONINE SUR LA
TAILLE DE L'INFARCTUS MYOCARDIQUE LORS
D'UN ÉPISODE D'ISCHÉMIE-REPERFUSION**

THÈSE

PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN PHARMACIE

DIPLÔME D'ÉTAT

Marc BORIS

Né le 29 septembre 1972 à Grenoble



THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 19 MAI 1999 A 18 HEURES
DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE:

Monsieur le Professeur **Pierre DEMENGE**, Président du jury

Madame **Diane GODIN-RIBUOT**, Maître de conférence, Directeur de thèse

Monsieur **Christophe RIBUOT**, Maître de conférence

Monsieur **Patrice FAURE**, Maître de conférence, Praticien hospitalier

Mademoiselle **Catherine MAZENOT**, Docteur en Pharmacie

UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER
FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année: 1999

N° d'ordre:

**INFLUENCE DE LA MÉLATONINE SUR LA
TAILLE DE L'INFARCTUS MYOCARDIQUE LORS
D'UN ÉPISODE D'ISCHÉMIE-REPERFUSION**

THÈSE

PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN PHARMACIE

DIPLOME D'ÉTAT

Marc BORIS

Né le 29 septembre 1972 à Grenoble

THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 19 AVRIL 1999 A 18 HEURES
DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE:

Monsieur le Professeur **Pierre DEMENGE**, Président du jury

Madame **Diane GODIN-RIBUOT**, Maître de conférence, Directeur de thèse

Monsieur **Christophe RIBUOT**, Maître de conférence

Monsieur **Patrice FAURE**, Maître de conférence, Praticien hospitalier

Mademoiselle **Catherine MAZENOT**, Docteur en Pharmacie

Merci à mes parents et mes grands-parents, pour leur soutien affectif, moral et financier pendant toutes ces années.

Merci à Natacha, mon alliée de tous les jours.

Merci à mes amis proches qui ont toujours été à mes côtés, dans les meilleurs et les pires moments.

Merci à Monsieur le Professeur DEMENGE pour m'avoir accueilli dans son laboratoire durant mes études de Pharmacie et de m'avoir ainsi permis d'approcher le milieu de la recherche.

Merci à Madame GODIN-RIBUOT, pour m'avoir dirigé et encouragé à la réalisation de ce travail.

Merci à monsieur RIBUOT, pour son aide appréciable lors de mes études.

Merci à Monsieur Faure pour m'avoir accueilli dans le laboratoire de biochimie et collaboré à la réalisation de ce travail.

Merci à Mademoiselle Catherine MAZENOT pour sa disponibilité et son aide précieuse.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté

M. le Professeur P. DEMENGE

Vice Doyen

M. le Professeur J. CALOP

PROFESSEURE DE PHARMACIE

ALARY	Josette	Chimie Analytique
BAKRI	Abdelaziz	Pharmacie Galénique
BENOIT-GUYOD	Jean-Louis	Chimie Toxicologie et Eco-toxicologie
CALOP	Jean	Pharmacie Clinique et Bio-technique
CUSSAC	Max	Chimie thérapeutique
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Générale
DEMENGE	Pierre	Physiologie/Pharmacologie
DROUET	Emmanuel	Microbiologie-Immunologie
FAVIER	Alain	Biochimie
GOULON	Chantal	Physique-Pharmacie
GRILLOT	Renée	Parasitologie
LECLERC	Gérard	Chimie Organique
MARIOTTE	Anne-Marie	Pharmacognosie
ROCHAT	Jacques	Hygiène environnement Droit et Economie Pharmaceutiques
ROUSSEL	Anne-Marie	Biochimie
SEIGLE-MURANDI	Françoise	Botanique et Cryptogamie
STEIMAN	Régine	Biologie Cellulaire
WOUESSIDJEWÉ	Denis	Pharmacie Galénique

Sommaire

• SOMMAIRE

<u>Liste des abréviations</u>	2
<u>Table des matières</u>	3
<u>Introduction</u>	8
<u>Etude bibliographique</u>	11
<u>Travail expérimental</u>	69
<u>Conclusion</u>	80
<u>Annexes</u>	81
<u>Bibliographie</u>	87

• LISTE DES ABREVIATIONS

A: Adrénaline
AMFK: N¹-acetyl-N²-formyl-5-methoxykynuramine
AMK: N¹-acetyl-5-methoxykynuramine
DMPO: 5,5-diméthylpyrroline-N-oxide
DO: Densité optique
e⁻: électron
ERO: Espèces réactives de l'oxygène
FC: Fréquence cardiaque
G-SH: Glutathion réduit
G-SS-G: Glutathion oxydé
H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène
HIOMT: 5-Hydroxyindole-O-méthyl transférase
HX: Hypoxanthine
λ: Longueur d'onde
MT: Mélatonine
NA: Noradrénaline
NAT: N-Acétyl transférase
O₂^{•-}: Anion superoxyde
OH[•]: Radical hydroxyle
P³²: Phosphore 32
PVG: Pression ventriculaire gauche
RLO: Radicaux libres de l'oxygène
RMN: Résonance magnétique nucléaire
RPE: Résonance paramagnétique électronique
SOD: Superoxyde dismutase
SNC: Système nerveux central
TBA: Acide thiobarbiturique
TTC: Chlorure de triphényle tétrazolium
XO: Xanthine oxydase

• TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

8

PREMIERE PARTIE: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I: Ischémie-reperfusion myocardique

<u>1. L'ischémie myocardique</u>	12
1.1. Définition	13
1.2. Rappels anatomiques	13
1.3. Effets métaboliques	15
1.3.1. Origine des effets métaboliques	15
1.3.2. Le déficit énergétique	15
1.3.3. L'accumulation des produits du catabolisme	17
1.4. Conséquences de l'ischémie	17
1.4.1. Importance de l'ischémie	17
1.4.2. Conséquences fonctionnelles	18
1.4.3. Conséquences cellulaires et tissulaires	18
1.4.4. Conséquences électrophysiologiques	19
<u>2. La reperfusion</u>	21
2.1. Thérapeutique de l'ischémie myocardique	21
2.2. Les lésions à la reperfusion	21
<u>3. Les modèles d'ischémie myocardique</u>	22
3.1. Introduction	22
3.2. Les modèles " <i>in vitro</i> "	23
3.2.1. Introduction	23
3.2.2. La technique de Langendorff	23
3.2.3. La technique du cœur travaillant	26
3.2.4. Les techniques de superfusion de muscles papillaires ou de fragments ventriculaires	26
3.2.5. Les techniques sur culture de cellules	26
3.3. Les modèles " <i>in vivo</i> "	26
3.4. Les paramètres mesurés	27

CHAPITRE II: Les radicaux libres de l'oxygène (RLO)

<u>1. Les radicaux libres de l'oxygène</u>	29
1.1. Définition des RLO	30
1.2. Mécanisme de production des RLO	31
1.3. Les systèmes de défenses naturelles	32
1.3.1. Les systèmes enzymatiques	32
1.3.2. Les systèmes non enzymatiques	32
1.4. Ischémie-reperfusion et RLO	33
<u>2. Actions des RLO</u>	35
2.1. Actions des RLO sur les lipides	35
2.2. Actions des RLO sur les métabolites intervenant dans le potentiel red-ox cellulaire	36
2.3. Actions des RLO sur les protéines	36
2.3.1. Modification des acides aminés composant la protéine	37
2.3.2. Agrégation et fragmentation de la protéine	37
2.3.3. Modification de la structure secondaire et tertiaire des protéines	37
2.3.4. Modification des groupements thiols protéiques	37
<u>3. Détection de la surproduction des RLO</u>	39
<u>4. Thérapeutique anti-radicalaire lors de la séquence d'ischémie-reperfusion</u>	40
4.1. Systèmes cellulaires potentiellement générateurs d'espèces radicalaires au cours de la séquence d'ischémie-reperfusion	40
4.1.1. Système de la xanthine oxydase (XO)	40
4.1.2. Processus inflammatoires	41
4.1.3. Autres sources de RLO	42
4.2. Les interventions anti-radicalaires	42
4.3. Application de la thérapeutique anti-radicalaire aux différentes phases de l'ischémie	43
4.3.1. Phase réversible	43
4.3.2. Arythmies de reperfusion	44
4.3.3. Phase irréversible	44
4.4. Conclusion	45

CHAPITRE III: La mélatonine

<u>1. Historique</u>	47
1.1. De la glande pinéale à la neurohormone mélatonine	47
1.2. La mélatonine, une neurohormone aux fonctions pléiotropes	47
<u>2. Biochimie de la mélatonine</u>	49
2.1. Biosynthèse	49
2.2. Sécrétion	51
2.3. Distribution	51
2.4. Catabolisme	51
<u>3. Physiologie de la mélatonine</u>	52
3.1. Rythme de sécrétion	52
3.2. Régulation de la sécrétion	52
3.2.1. Au niveau de la glande pinéale	52
3.2.2. Au niveau de la rétine	53
3.2.3. Au niveau central	53
<u>4. Rôle de la glande pinéale et de la mélatonine</u>	54
4.1. Relation glande pinéale - fonction endocrine	54
4.1.1. Fonction gonadique	54
4.1.2. Fonction cortico-surrénalienne	54
4.1.3. Fonction thyroïdienne	54
4.1.4. Fonction pancréatique	54
4.2. Relation glande pinéale - système nerveux central	55
4.2.1. Epilepsie	55
4.2.2. Sommeil	55
4.2.3. Action locomotrice	55
4.2.4. Action neurochimique	55
4.3. Mode d'action de la mélatonine sur le système nerveux central	56
4.3.1. Mélatonine et barrière hémato-encéphalique	56
4.3.2. Les récepteurs de la mélatonine	56
4.3.3. Mode d'action au niveau moléculaire	57
4.4. Conclusion	57
<u>5. Mise en évidence du pouvoir antioxydant de la mélatonine</u>	58
5.1. Etudes " <i>in vitro</i> " utilisant un système générateur de radicaux libres	58
5.2. Etudes " <i>in vitro</i> " utilisant du matériel biologique	60
5.3. Etude " <i>in vivo</i> "	62
5.4. Oxydation non enzymatique de la mélatonine	66
5.5. Conclusion	67

DEUXIEME PARTIE: TRAVAIL EXPERIMENTAL

Influence de la mélatonine sur la taille de l'infarctus myocardique lors d'un épisode d'ischémie-reperfusion

<u>1. But de l'étude expérimentale réalisée</u>	70
<u>2. Matériel et méthodes</u>	71
2.1. Matériel biologique	71
2.2. Pré-traitement à la mélatonine	71
2.3. Préparation chirurgicale, montage et paramètres enregistrés	71
2.4. Protocole expérimental	72
2.5. Analyses et mesures	73
2.5.1. Evaluation de la zone à risque	73
2.5.2. Paramètres mesurés	74
2.5.3. Mesure des paramètres biochimiques	74
2.6. Analyse statistique	74
<u>3. Résultats</u>	75
3.1. Libération des catécholamines dans l'effluent coronaire	75
3.1.1. Dosage de l'adrénaline	75
3.1.2. Dosage de la noradrénaline	76
3.2. Mesure de la taille de l'infarctus	77
3.2.1. Mesure de la taille de la zone à risque	77
3.2.2. Mesure de la taille de l'infarctus	77
<u>4. Discussion</u>	78
<u>5. Conclusion</u>	80

ANNEXES

Annexe I: Stabilité et conservation d'une solution de mélatonine à -80°C

<u>1. Introduction</u>	82
<u>2. Matériel et méthodes</u>	82
2.1. Caractères physico-chimiques des matières premières	82
2.1.1. La mélatonine	82
2.1.2. Le tween 80	83
2.2. Méthodologie	83
2.2.1. Principe	83
2.2.2. Détermination des concentrations nécessaires à une absorption linéaire	83
2.2.3. Détermination de la longueur d'onde d'absorption du tween 80	84
2.2.4. Approximation des effets de la congélation	84
2.2.5. Conservation de la solution à -80°C	84
<u>3. Résultats</u>	84
3.1. Détermination des concentrations nécessaires à une absorption linéaire	84
3.2. Détermination de la longueur d'onde d'absorption du tween 80	84
3.3. Approximation des effets de la congélation	85
3.4. Conservation de la solution à -80°C au cours du temps	85
<u>4. Conclusion</u>	85

Annexe II: Réalisation de la solution modifiée de Krebs-Henseleit

<u>1. Introduction</u>	86
<u>2. Matériel et méthodes</u>	86

<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	87
----------------------	----

Introduction

Introduction

Quel que soit le territoire qu'elle affecte, l'ischémie est conventionnellement définie comme une inadéquation entre les apports en sang artériel et les besoins cellulaires en sang oxygéné. A ce titre, elle intéresse les cliniciens surtout lorsqu'elle concerne un tissu dont la fonction est essentiellement "oxygène-dépendante". C'est le cas de différents organes dont la "réponse" au déséquilibre ischémique est conditionnée dans sa gravité par la sévérité et par la durée de l'ischémie. Par rapport à l'hypoxie qui est le résultat d'une simple réduction de la pression partielle en oxygène dans le sang, l'ischémie est un processus beaucoup plus complexe puisqu'il associe à la réduction de l'apport en oxygène et en substrats, une accumulation de déchets du catabolisme cellulaire tels que les protons, le CO₂ ou des lactates qui, lorsque leur concentration cellulaire s'élève, exercent par eux-mêmes des effets cytotoxiques.

Dans un tissu comme le myocarde, dont le métabolisme requiert un apport important et permanent d'oxygène, le maintien de conditions d'ischémie sévère entraîne rapidement des altérations des différentes fonctions cellulaires avec toutes les conséquences fonctionnelles liées à la réduction de la capacité d'éjection systolique ou au développement de troubles du rythme, qui peuvent aboutir à la mort cellulaire (infarctus du myocarde) et mettre en jeu la survie même du sujet. La prévention des effets de l'ischémie, en particulier au niveau cardiaque, est donc devenue un véritable challenge et de nombreux auteurs ont proposé de ralentir ou de limiter les altérations cellulaires induites par l'ischémie myocardique par diverses interventions pharmacologiques ou métaboliques. Cependant, malgré les nombreux résultats favorables obtenus sur divers modèles animaux, il reste important de souligner que la protection pharmacologique ou métabolique du tissu cardiaque ischémique ne peut être envisagée que pour retarder le début d'altérations cellulaires irréversibles, une reperfusion efficace du tissu ischémique étant seule capable de rendre à celui-ci, de façon durable, des potentialités fonctionnelles acceptables. Si la reperfusion du myocarde ischémique doit donc nécessairement intervenir le plus précocement possible après le début du processus d'ischémie, il a été démontré qu'elle pouvait, dans certains cas, entraîner, par elle-même et de façon paradoxale, des effets néfastes se traduisant par l'accélération du processus de nécrose ou par l'apparition de troubles graves du rythme (fibrillation ventriculaire). Ce phénomène, qui a été initialement décrit par HEARSE et coll. (1973) sous le nom "d'oxygen paradox", semble lié à la réoxygénation brutale du myocarde hypoxique et il a été récemment suggéré qu'une partie des altérations cellulaires résultant de la réoxygénation ou de la reperfusion, puisse être due à une surproduction brutale et non contrôlée d'espèces hautement réactives dérivées de la molécule d'oxygène, les radicaux libres oxygénés.

L'étude de ces derniers a permis de mettre en évidence l'existence de composés au pouvoir antioxydant présentant la capacité de piéger les radicaux libres. Dans ce cadre, la mélatonine, (N-acétyl-5-méthoxytryptamine) hormone pinéale de mammifère, un aminoindole issu du métabolisme de la sérotonine (5-hydroxytryptamine) a été récemment présentée dans différentes études "*in vitro*" comme étant un potentiel piègeur du très toxique radical hydroxyle OH° . De plus, des mesures indirectes de son activité antioxydante chez les animaux indiquent des effets similaires "*in vivo*" (Reiter et coll., 1996)

Compte tenu de ces informations, il nous a paru intéressant d'évaluer les capacités antioxydantes de la mélatonine lors d'un stress oxydatif induit par un épisode d'ischémie-reperfusion myocardique à travers la mesure de la taille de l'infarctus afin de mettre en évidence son rôle cardioprotecteur.

Pour ce faire, ce document rapporte le travail expérimental réalisé dans le cadre de la 5^{ème} année hospitalo-universitaire de mes études pharmaceutiques au sein du laboratoire P.C.E.B.M. (Pharmacologie Cardiovasculaire Expérimentale - Biomolécules) et du laboratoire Biochimie C de l'université Joseph Fourier de Grenoble. Il se compose de deux parties.

La première, bibliographique, comprend trois chapitres afin de synthétiser les connaissances que j'ai dû acquérir pour réaliser cette étude.

La deuxième, expérimentale, rapporte le travail réalisé. Une étude préliminaire de stabilité et de conservation d'une solution de mélatonine à -80°C est décrite en annexe.

Première partie

I.

ISCHÉMIE-REPERFUSION
MYOCARDIQUE

I. ISCHÉMIE-REPERFUSION MYOCARDIQUE

1. L'ischémie myocardique

1.1. Définition

Une définition simple et concise de l'ischémie myocardique est difficile à donner. Néanmoins, la plus simple, et peut-être la mieux acceptée, est:

"L'ischémie cardiaque correspond à un déséquilibre entre l'apport d'oxygène et de nutriments et les besoins myocardiques".

En d'autres termes, l'ischémie cardiaque apparaît lorsque le débit sanguin coronaire est diminué par une occlusion partielle ou totale et que ce débit devient inadéquat pour répondre à la demande cardiaque.

Cette inadéquation aura un certain nombre de conséquences physiologiques, biochimiques, mécaniques, électriques, morphologiques et peut-être génétiques.

1.2. Rappels anatomiques

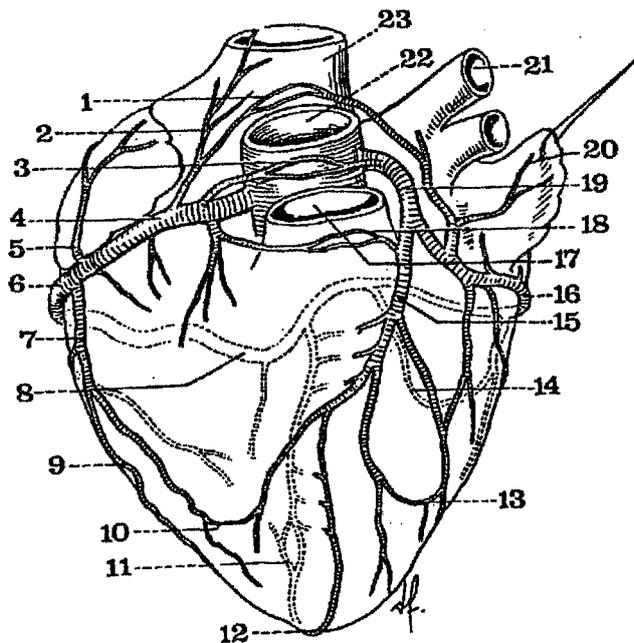
Le cœur est irrigué par un réseau artériel qui lui est propre et qui décrit une couronne autour de sa base d'où son nom de réseau coronaire. Au départ de l'aorte naissent deux artères: les coronaires droite et gauche, démarrant chacune au niveau de son propre ostium situé derrière les cuspides de la valvule semi-lunaire (Fig 1).

- la coronaire gauche longe sur une courte distance le côté gauche du cœur, puis se divise en deux branches: l'artère interventriculaire antérieure et l'artère circonflexe.
- l'artère interventriculaire antérieure descend le long de la face antérieure du septum interventriculaire vers l'apex du cœur et ses ramifications irriguent les deux ventricules, mais aussi le faisceau de His.
- l'artère circonflexe suit le sillon auriculo-ventriculaire jusqu'au côté gauche du cœur puis se ramifie sur la face postérieure pour desservir l'oreillette et le ventricule gauches.
- l'artère coronaire droite longe le côté droit du cœur en suivant le sillon auriculo-ventriculaire droit, contourne le cœur jusqu'à sa face postérieure. Ses ramifications irriguent l'oreillette et le ventricule droit mais aussi les nœuds sinusal et auriculo-ventriculaire. Sur la face postérieure du cœur, sa principale ramification appelée artère interventriculaire postérieure, descend vers l'apex et fournit aux deux ventricules de petites ramifications.

Le sang passe des artères coronaires à un réseau important de capillaires puis atteint les veines cardiaques qui longent les artères. La fusion des veines coronaires forme un conduit élargi qui est situé sur la face postérieure dans le sillon auriculo-ventriculaire: le sinus coronaire.

Il y a deux caractéristiques de la circulation coronaire qui sont importantes à considérer lorsque l'on veut étudier ou provoquer une ischémie cardiaque par ligature d'une artère coronaire:

- les anastomoses coronaires sont des artères qui relient entre elles deux branches d'un même réseau comme deux branches de deux réseaux différents (Fig 1). Ces anastomoses sont plus ou moins développées selon les individus et les espèces, voire même selon la race au sein d'une même espèce. Chez l'individu jeune peu sportif, ces branches sont peu développées et apparaissent avec l'âge, l'entraînement physique ou les épisodes de souffrance cardiaque. Pour ce qui est des espèces animales, le rat est pratiquement dépourvu d'anastomoses alors que le chien de race Beagle en est très largement pourvu.
- les veines de Thébésius sont des veines de faible diamètre qui débouchent directement dans les cavités cardiaques, principalement du côté droit. Dans certains cas, une perfusion rétrograde a été évoquée (chez le lapin).



Légende:

- 1: Anastomoses inter-atriales
- 2: Artère atriale droite antérieure
- 3: Anastomoses pré-aortiques
- 4: Artère coronaire droite (portion d'origine)
- 5: Artère atriale du bord droit
- 6: Artère coronaire droite (portion intermédiaire)
- 7: Artère du bord droit du cœur
- 8: Artère coronaire droite (portion postérieure)
- 9: Artère marginale droite
- 10: Anastomose vermiculaire droite
- 11: Anastomoses apicales
- 12: Artère apexienne
- 13: Anastomose intra-coronarienne
- 14: Anastomose ventriculaire gauche
- 15: Artère interventriculaire antérieure
- 16: Artère circonflexe
- 17: Artère pulmonaire
- 18: Anastomoses infundibulaires
- 19: Artère coronaire gauche
- 20: Artère atriale gauche antérieure
- 21: Veine pulmonaire supérieure gauche
- 22: Aorte ascendante
- 23: Veine pulmonaire supérieure droite

Figure 1: "Les principales anastomoses coronariennes".

1.3. Les effets métaboliques

1.3.1. Origines des effets métaboliques

L'ischémie myocardique est définie comme étant un déficit de la perfusion sanguine du myocarde, entraînant un déséquilibre entre les apports et les besoins en oxygène. L'ischémie est donc responsable du passage d'un métabolisme aérobie à un métabolisme anaérobie. De plus, il y a aussi une diminution du drainage du sang au niveau de la zone ischémique. Du point de vue clinique, l'ischémie myocardique correspond à une insuffisance coronaire: angor, angine de poitrine ou infarctus.

La modification du métabolisme myocardique au cours de l'ischémie est donc due à deux mécanismes principaux (Fig 2):

- un déficit en substrat énergétique,
- un défaut d'élimination (ou accumulation) des produits finaux (OPIE, 1991).

1.3.2. Le déficit énergétique

Le déficit cellulaire en oxygène provoque une diminution du fonctionnement mitochondrial et donc une chute des métabolites énergétiques (ATP ou phosphocréatine) disponibles dans le cytoplasme. Celle-ci est responsable, dans un premier temps, d'une stimulation de la production anaérobie d'ATP, par glycogénolyse et glycolyse, qui reste néanmoins insuffisante pour fournir l'énergie nécessaire au myocarde. Il en résulte une diminution de la contractilité et des perturbations de l'homéostasie ionique par inhibition des canaux ATP-dépendants.

- La concentration intracellulaire en calcium est augmentée:
 - par inhibition de la recapture par le réticulum endoplasmique,
 - par l'action de l'AMPc, en quantité accrue, sur les canaux calciques.

L'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire est responsable de la contracture ischémique (contraction des fibres musculaires) et de lésions membranaires par stimulation de phospholipases calcium-dépendantes.

- Le potassium s'accumule dans l'espace extracellulaire:
 - par inhibition du fonctionnement du canal potassique ATP-dépendant,
 - par activation du co-transport potassium-lactate (dû à une accumulation de lactates issus de la glycolyse),
 - par activation du co-transport potassium-phosphate (dû à une accumulation de phosphates inorganiques issus de la dégradation de l'ATP).

- Le sodium entre dans les cellules:

- par échange avec les protons ou le calcium en excès dans la cellule,
- par inhibition de la pompe sodium-potassium, causée par un défaut en ATP. Il en résulte une entrée d'eau dans les cellules d'où un œdème dans la zone ischémique.

L'oxydation des acides gras (substrat énergétique principal du cœur à l'état physiologique) est un processus exclusivement aérobie. Elle est inhibée par le défaut d'ATP à l'ischémie. Il en résulte une accumulation de métabolites lipidiques (acides gras libres, acylCoA...) ayant des propriétés détergentes et arythmogènes sur les membranes.

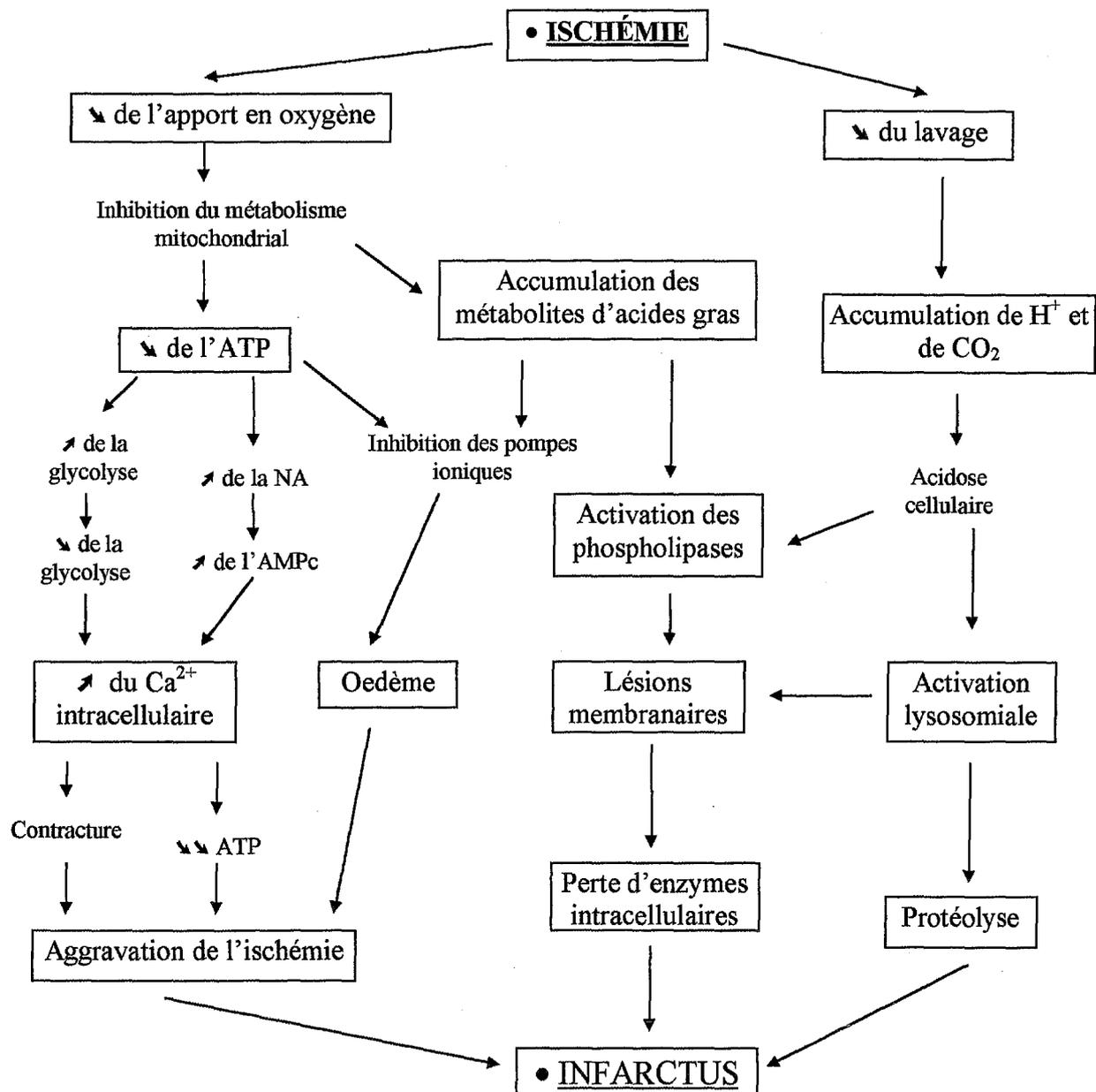


Figure 2: "Cascade métabolique de l'ischémie à l'infarctus" (d'après Opie, 1991).

1.3.3. L'accumulation des produits du catabolisme

Lors de l'ischémie, le courant sanguin interrompu ne permet plus le lavage du tissu ischémique par le sang veineux qui, en temps normal, élimine tous les métabolites inutiles à la cellule. Il y a accumulation de certains métabolites comme les lactates et le NADH issus de la glycolyse. Ceux-ci exercent un rétrocontrôle négatif sur cette voie métabolique. Une fois la glycolyse freinée, plus aucune production d'ATP n'est possible.

L'accumulation du CO₂ et des protons est responsable d'une acidose métabolique. Si celle-ci s'intensifie, elle peut atteindre les valeurs d'activation des lysosomes et provoquer des destructions tissulaires irréversibles.

Les produits de dégradation de l'ATP (ADP, AMP, adénosine, phosphates inorganiques, hypoxanthine et xanthine) s'accumulent également dans la zone ischémique. L'adénosine induit une vasodilatation en aval du thrombus ou de la ligature responsable de l'ischémie (Fig 2).

1.4. Conséquences de l'ischémie

1.4.1. Importance de l'ischémie

Les conséquences sont très variables selon l'importance de l'ischémie, elle-même fonction de caractéristiques telles la durée et le degré d'ischémie.

• La durée d'ischémie myocardique

Une courte durée d'ischémie n'aura que peu de conséquences néfastes et pourra au contraire présenter un bénéfice tel qu'illustré par le phénomène de préconditionnement ischémique. Une autre adaptation possible à une ischémie aiguë est le phénomène du myocarde hibernant "*hibernating myocardium*" qui correspond à une réduction de la fonction contractile dans une situation de diminution du débit sanguin. Lors de la restauration du débit sanguin, la fonction contractile redevient normale. La sidération myocardique "*myocardial stunning*" correspond à une situation où la fonction myocardique est altérée de façon importante mais réversible alors que le débit est normal. Ceci est rencontré à la suite d'une ischémie de courte durée suivie de reperfusion.

A l'opposé, si l'ischémie est maintenue pendant un temps suffisamment long les conséquences seront irréversibles.

• Le degré d'ischémie myocardique

Le cœur étant un tissu dont la fonction est essentiellement "oxygène-dépendante" comme le rappelle son exceptionnel coefficient d'extraction du sang, à savoir près de 95%, il est évident que le degré d'ischémie myocardique est étroitement lié à la consommation en oxygène via différents facteurs comme la fréquence cardiaque, la pression artérielle ou la force de contraction.

Une ischémie totale entraîne de rapides modifications physiologiques, biochimiques, mécaniques, électriques et morphologiques. Il en va de même avec une ischémie à débit grandement réduit où, malgré une faible accumulation de métabolites, ces modifications peuvent apparaître.

Le niveau d'ischémie qui va déterminer la taille de la zone à risque (région du myocarde normalement vascularisée par l'artère occluse) est également important à considérer car, selon qu'il s'agira d'une ischémie globale ou régionale, les répercussions électrophysiologiques ne seront pas les mêmes. Les troubles du rythme liés à l'ischémie seront observés plus particulièrement en cas d'ischémie régionale. A cela il faut rajouter le fait que le pourcentage de réduction du flux sanguin dans la zone ischémique est un facteur directement en relation avec l'importance de la circulation collatérale (débit sanguin myocardique persistant dans la zone à risque en provenance de la zone non ischémique).

1.4.2. Conséquences fonctionnelles

Dans les premières secondes d'ischémie, une diminution importante et brutale de la fonction contractile est observée. Elle est due au déficit en ATP (nécessaire à la contraction par fixation à la tête de myosine) et à la compétition entre les ions calcium et les protons pour la fixation sur les sites de liaison spécifiques de la troponine C.

1.4.3. Conséquences cellulaires et tissulaires

Dans un premier temps, les dommages cellulaires restent réversibles. Si la reperfusion coronaire est assurée, le myocarde retrouve son intégrité. Par contre, si l'ischémie se prolonge, les lésions deviennent irréversibles. Il y a mort cellulaire et nécrose. C'est l'infarctus. Le passage à des lésions irréversibles est la conséquence de l'aggravation des perturbations métaboliques comme la baisse de l'ATP (au-delà d'un taux critique qui reste encore à déterminer), l'augmentation du calcium intracellulaire, les lésions membranaires, l'œdème, l'activation des lysosomes...

La survenue d'un infarctus peut être reflétée biologiquement par la libération d'enzymes intracellulaires. En effet, si elles sont retrouvées dans le sang périphérique c'est qu'il y a eu lésion membranaire. Le marqueur le plus utilisé est l'isoenzyme MB de la créatine kinase présent principalement au niveau intracellulaire des myocytes.

Le sous-endocarde est la zone la plus sensible à l'ischémie. En effet, il est plus éloigné de la source de sang coronaire qui irrigue d'abord l'épicarde, créant ainsi un gradient métabolique défavorable aux zones profondes. Il est également soumis à une pression intramurale plus importante ce qui diminue sa perfusion. S'il y a nécrose, elle s'étend du sous-endocarde au sous-épicarde. Ce phénomène est appelé "wave-front phenomenon".

1.4.4. Conséquences électrophysiologiques

• Sur l'ECG

La fuite du potassium vers l'espace extracellulaire observée à l'ischémie est responsable d'une diminution de la polarisation (légère dépoliarisation). En diastole, il en résulte un courant électrique de la zone ischémique vers la zone non ischémique. Une dépression du segment QT s'observe sur l'ECG (Fig 3). A l'inverse, en systole, la zone ischémique est moins dépoliarisée. Un courant va de la zone non ischémique vers la zone ischémique d'où une élévation du segment ST de l'ECG.

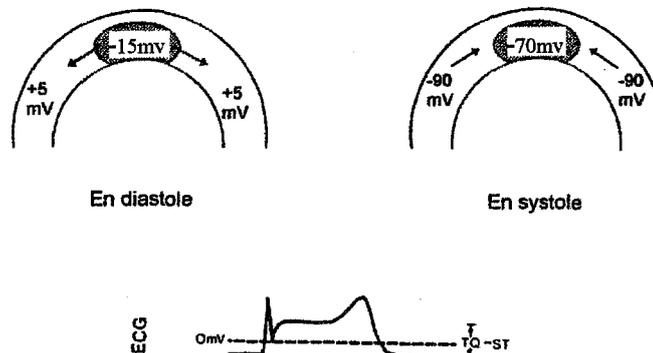


Figure 3: "Modification des courants électriques myocardiques en systole et en diastole au cours de l'ischémie". (d'après Opie, 1991)

• Sur les potentiels d'action

Lors de l'ischémie, les potentiels d'action sont modifiés. Leur amplitude est réduite ainsi que leur durée. Ceci peut être expliqué par la sortie accrue de potassium hors de la cellule (Fig 4).

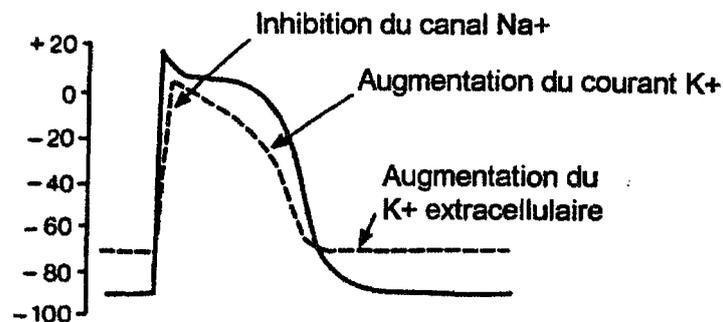


Figure 4: "Modification du potentiel d'action lors d'une ischémie". (d'après Opie, 1991).

• Arythmies

Trois mécanismes peuvent être à l'origine de l'apparition d'arythmies.

- L'augmentation de l'automatisme ventriculaire qui correspond au développement de nouveaux sites de dépolarisation (foyers ectopiques) dans le tissu de conduction (fibres de Purkinje). Cette dépolarisation spontanée est accélérée par la diminution du potassium intracellulaire et par la stimulation sympathique à l'ischémie. Il y a dépolarisation ventriculaire en dehors de toute décharge du nœud sinusal: C'est une extrasystole ventriculaire. Si plus de deux extrasystoles se suivent, on parle de tachycardie ventriculaire. Si plusieurs foyers ectopiques déchargent en même temps, le rythme est fortement perturbé, les contractions cessent: c'est une fibrillation ventriculaire.
- Les circuits de réentrée. Si une hétérogénéité électrique dans le myocarde crée un ralentissement de la conduction (cas d'un foyer d'ischémie), l'impulsion électrique qui la traverse arrive dans le tissu sain après la période réfractaire et engendre une nouvelle dépolarisation. Ce mécanisme est responsable de tachycardies et de fibrillations ventriculaires.
- Les post-dépolarisations ou développement d'activité automatique dans les myocytes. Par augmentation de la concentration intracellulaire en calcium et activation de l'échange calcium-sodium, il y a induction d'une dépolarisation spontanée. Ce phénomène peut-être à l'origine de tachycardie ventriculaire.

2. La reperfusion

2.1. Thérapeutique de l'ischémie myocardique

La reperfusion coronaire est la seule méthode permettant de limiter les conséquences de l'ischémie et de réduire la taille de l'infarctus. A condition d'être entreprise suffisamment tôt, elle permet la récupération complète du myocarde tant qu'il n'y a pas eu de lésions cellulaires irréversibles. Avec le développement:

- de la thrombolyse (lyse enzymatique du thrombus responsable de l'ischémie),
- de l'angioplastie (dilatation mécanique de l'artère coronaire occlue) et
- de la chirurgie des pontages coronariens,

une reperfusion est actuellement cliniquement possible.

2.2. Les lésions à la reperfusion

Si la reperfusion semble être, à l'heure actuelle, le seul moyen de sauver un myocarde ischémique, de très nombreuses équipes ont pu montrer, ces dernières années, que celle-ci pouvait également avoir un effet néfaste (Rochette et Maupoil, 1993). Au moment de la reperfusion, il y a accélération du processus nécrotique commencé pendant l'ischémie. Ainsi, des effets délétères sont observés sur:

- le rythme cardiaque,
- la circulation coronaire,
- la fonction contractile
- et les lésions cellulaires qui s'aggravent.

• Deux types de lésions sont à distinguer

- Les unes sont observées à la reperfusion mais sont la conséquence directe de l'ischémie précédente. Elles sont révélées par la reperfusion, car le courant sanguin rétabli lave alors la zone ischémique de toutes les substances accumulées pendant l'occlusion. C'est le cas par exemple des catécholamines qui sont responsables d'arythmies à la reperfusion.
- Les autres lésions sont propres à la reperfusion, d'où le terme de "reperfusion injury". Plusieurs phénomènes semblent en être responsables:
 - la surcharge en calcium, commencée à l'ischémie, qui s'aggrave à la reperfusion,
 - la non-reperfusion (ou "no reflow") de certains territoires, due à des hémorragies consécutives à des lésions vasculaires ou à l'adhérence de polynucléaires à l'endothélium vasculaire,
 - la réentrée brutale d'oxygène dans la zone ischémique, favorable à la production de radicaux libres de l'oxygène, toxiques pour les cellules.

3. Les modèles d'ischémie myocardique

3.1. Introduction

Bien évidemment le but des modèles d'étude de l'ischémie myocardique est de reproduire le plus fidèlement possible les situations rencontrées en clinique. Ces modèles sont importants à la fois pour explorer la physiopathologie de l'ischémie cardiaque et pour essayer de mettre en œuvre de nouvelles approches thérapeutiques.

Il est clair que les études conduites "*in vitro*" sur des organes isolés ou sur cultures de cellules, où les conditions ischémiques sont mimées par l'hypoxie, l'utilisation d'inhibiteurs métaboliques ou de solutions acides riches en lactate et en potassium ne peuvent reproduire fidèlement la totalité des phénomènes rencontrés en clinique.

L'ischémie en clinique est, de plus, rarement totale (contrairement à ce qui est pratiqué dans bon nombre de modèles expérimentaux) et survient peu chez des individus jeunes et en bonne santé, mais plutôt dans des situations cliniques comme le diabète, l'hypertension ou l'hypertrophie cardiaque qui contribuent à (et compliquent) la maladie ischémique.

En clinique humaine, l'ischémie apparaît la plupart du temps lentement. C'est le cas du thrombus coronaire qui s'installe et occlue le vaisseau petit à petit. Ce caractère est difficile à mimer de façon expérimentale ou l'installation est plus facilement brutale (et mime la situation clinique qui correspond au spasme coronaire).

Cette notion d'installation brutale est cependant importante à considérer car les conséquences de l'ischémie, notamment électrophysiologiques, sont très différentes selon qu'elles apparaissent spontanément ou non (Goldstein et coll., 1994).

Plusieurs espèces animales ont été utilisées à cet effet: souris, rat, cochon d'Inde, lapin, chat, furet, chien, chat, porc, mouton, singe... et ont révélé des différences considérables interspèces pour ce qui est de leur vulnérabilité vis-à-vis de l'ischémie. La présence ou non d'anastomoses perméables est probablement un des facteurs responsables de ces différences (Maxwell et coll., 1987).

Des différences dans les propriétés électrophysiologiques des cœurs de ces divers animaux peuvent également être évoquées.

Pour ce qui est plus particulièrement de l'étude de l'infarctus myocardique (une des conséquences majeures de l'ischémie de longue durée), les modèles utilisant de petits animaux sont de plus en plus préférés pour la facilité d'hébergement sur de longues périodes, la possibilité de faire des séries expérimentales avec un grand nombre d'animaux à moindre coût.

• Classiquement nous distinguerons les modèles "*in vivo*" des modèles "*in vitro*":

- "*In vivo*", pour des raisons éthiques, l'ischémie sera produite la plupart du temps sur des animaux anesthésiés. Toutefois, les agents anesthésiques utilisés peuvent interférer par eux-mêmes avec l'ischémie.
- "*In vitro*", pour des raisons pratiques, le cœur ou le fragment de cœur sera perfusé la plupart du temps par des solutions de perfusion tamponnées (Krebs-Henseleit, Ringer, etc.) et non pas par du sang.

3.2. Les modèles "in vitro"

3.2.1. Introduction

Il est possible de travailler "in vitro" sur des cœurs entiers, prélevés à l'animal après injection intrapéritonéale (ip) d'un anesthésique comme le Desnodal®. Puis le cœur est prélevé et placé sur un montage de perfusion. Deux techniques existent: la perfusion selon la technique de Langendorff, dite par voie rétrograde, et celle selon la technique de Neely, dite du cœur travaillant.

Le choix de l'espèce animale est important pour une raison pratique: la quantité de liquide de perfusion consommée par le cœur, directement liée à la taille de ce dernier.

La solution de tampon de perfusion utilisée est la plupart du temps un Krebs modifié en fonction du type d'étude réalisée (pratiquement chaque laboratoire possède sa propre recette). Ce tampon de perfusion renferme du glucose et des ions en mélange (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- ...), il est filtré, oxygéné par barbotage d'un mélange à 95% d' O_2 et 5% de CO_2 , tamponné à pH 7.4 et maintenu à une température de 37°C.

3.2.2. La technique de Langendorff

Cette technique déjà ancienne (Langendorff, 1895) est encore largement utilisée pour des études physiologiques et pharmacologiques et permet de maintenir en survie "ex vivo" des cœurs de petits mammifères pendant plusieurs heures.

Immédiatement après le prélèvement, le cœur est suspendu par l'aorte [a] à une canule de perfusion métallique (canule aortique) à travers laquelle arrive le liquide de perfusion oxygéné et thermostaté à 37°C (Fig 5). Dans ces conditions, les valvules sigmoïdes [vs] se trouvent fermées sous la pression du liquide de perfusion, et le réseau coronaire [ac] est perfusé de façon continue. Le réseau coronaire déverse ses effluents dans le sinus coronaire [sc], à l'intérieur de l'oreillette droite [OD]. On réalise une petite incision de l'artère pulmonaire [ap] de façon à favoriser l'écoulement du liquide de perfusion vers l'extérieur de l'organe.

Sur un tel dispositif, les cavités cardiaques ne sont pas remplies, le cœur n'effectue donc aucun travail mécanique externe mesurable.

• Il existe deux modes de perfusion par voie aortique

- Le premier consiste à imposer la pression de perfusion en laissant les résistances vasculaires coronaires déterminer le débit de perfusion. Ce dispositif est dit: "à pression constante".
- Le second consiste à imposer le débit de perfusion à l'aide d'une pompe péristaltique. Dans ces conditions, les résistances vasculaires coronaires déterminent la pression de la perfusion. Un tel dispositif est dit: "à débit constant".

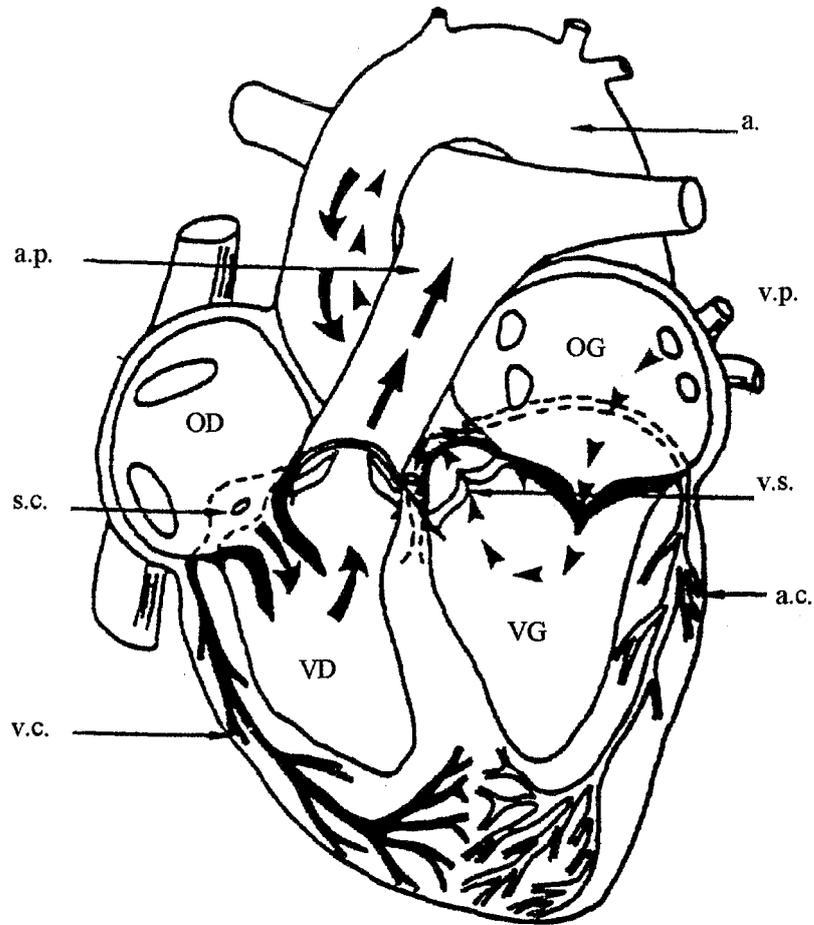


Figure 5: "Cœur isolé perfusé".

Les longues flèches correspondent à la perfusion aortique de Langendorff, 1895.
 Les petites correspondent à la perfusion atriale gauche de Neely, 1967.

Les légendes sont données dans le texte.

Les perfusions par voie aortique présentent l'avantage d'être simples à mettre en œuvre et de permettre le maintien de performances stables sur de longues durées de perfusion.

La plupart du temps cette technique est appliquée à des cœurs de rat, de cochon d'Inde ou de lapin. Plus rarement des cœurs de taille plus importante sont étudiés par cette technique comme ceux de chien ou de porc. Enfin plus récemment, devant l'apport scientifique grandissant apporté par les souris transgéniques, des chercheurs ont utilisé la technique de Langendorff sur cœur de souris (Marber et coll., 1995; Michael et coll., 1995_a).

Dans cette technique, le liquide de perfusion arrive par l'aorte, rencontre la valve aortique fermée et part dans les coronaires pour ressortir au niveau du sinus coronaire et s'écouler librement ce qui permet la mesure du débit coronaire. On peut enregistrer également l'activité électrique cardiaque et en dériver sa fréquence à l'aide de deux électrodes (une fixée sur la canule de perfusion si celle-ci est en métal, et l'autre fixée à l'apex). La pression développée par le ventricule gauche est également enregistrable en y introduisant par la valve mitrale un cathéter muni ou non d'un ballonnet en latex relié à un capteur de pression (Fig 6).

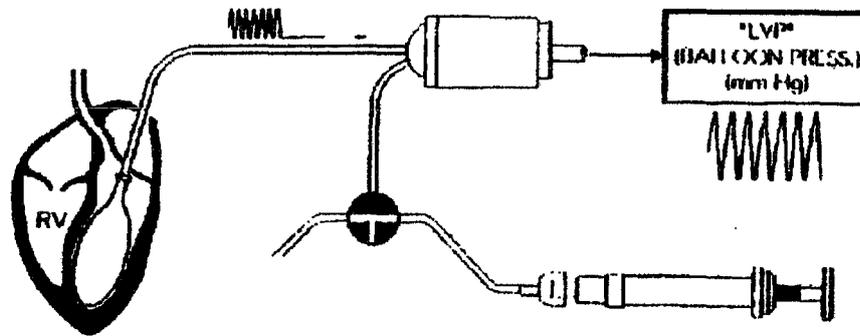


Figure 6: "Mesure de la pression intra-ventriculaire gauche par la technique du ballonnet".

De façon plus spécifique, il est également possible d'implanter des micro-électrodes de verre pour mesurer des potentiels d'action intracellulaires ou de mettre en contact avec l'épicarde une sonde capable de mesurer des potentiels d'action monophasiques. Il est possible d'effectuer des études à fréquence cardiaque spontanée ou encore en stimulant le cœur à fréquence choisie. D'un point de vue biochimique il sera également possible d'effectuer des dosages dans l'effluent coronaire (pO_2 , pCO_2 , pH, lactates, CK, noradrénaline, substances réagissant avec l'acide thio-barbiturique...) ou encore de placer le cœur ainsi perfusé à l'intérieur d'un appareil de RMN afin de faire de la RMN du phosphore et d'appréhender le métabolisme myocardique via les teneurs tissulaires en ATP, ADP, AMP et phospho-créatine ou de la RMN du proton pour s'intéresser plus particulièrement aux modifications de pH.

Il est alors possible de créer soit une ischémie globale (du cœur entier) totale ou non (par arrêt complet ou par simple diminution du débit de perfusion), soit une ischémie régionale (par occlusion de l'artère coronaire gauche). Il faudra être vigilant à bien contrôler la température du cœur pendant l'ischémie (en plaçant le cœur dans une enceinte thermostatée par exemple), puisque c'est le liquide de perfusion qui est responsable du maintien de ce paramètre. L'hypoxie seule peut aussi être étudiée en remplaçant l' O_2 par de l'azote.

Des techniques plus difficilement reproductibles et de ce fait moins employées ont également été développées comme la micro-embolisation (injection de microsphères de $80\mu m$ de diamètre). Plus récemment, une technique basée sur la réaction photochimique entre le rose de Bengale et la lumière ($540nm$) a été utilisée pour réaliser une occlusion thrombotique d'une artère coronaire chez le rat (Hirata et coll., 1995). Cette technique validée par l'observation des thrombus sur coupe transversale de cœur de rat, peut être utilisée aussi bien "*in vivo*" qu'"*in vitro*".

L'utilisation d'une canule de perfusion particulière permet de perfuser différemment la coronaire droite et la coronaire gauche (Rees et Curtis, 1995).

En fonction de la durée et du degré de l'ischémie, ce modèle permettra d'étudier aussi bien les troubles du rythme, la limitation de la taille de l'infarctus ou la fonction ventriculaire.

Une modification simple apportée au circuit permet de perfuser le cœur avec du sang lorsque nécessaire sans pour autant être amené à remplir de sang tout le montage (Mc Donagh et Reynolds, 1994).

3.2.3. La technique du cœur travaillant

La première description connue de cette technique est à porter à l'actif de Newell Martin en 1883 (Opie, 1992). Dans sa forme moderne cette technique a été décrite par Neely et ses collaborateurs en 1967. L'oreillette gauche est canulée de façon à perfuser le cœur selon une pression fixée au préalable (précharge). L'aorte est également canulée et une colonne d'eau est imposée au ventricule gauche (post-charge). Par cette technique il est donc possible de mesurer en plus du débit coronaire un débit aortique et donc un débit cardiaque. Les valeurs de la pré- et de la post-charge peuvent être modifiées en fonction de l'étude. La fréquence cardiaque pourra être mesurée comme précédemment. Par contre, la mesure de la pression intraventriculaire ne sera pas possible comme dans le cas du Langendorff.

3.2.4. Les techniques de superfusion de muscles papillaires ou de fragments ventriculaires

Dans certaines études, notamment électrophysiologiques, il est utile de travailler sur des muscles papillaires ou des fragments ventriculaires isolés et de les soumettre à des protocoles de stimulation électrophysiologiques en mimant ou non l'ischémie par modification de la composition et de la nature du liquide de superfusion. L'immersion dans de l'huile de paraffine a également été employée pour mimer l'ischémie et utiliser des techniques de voltage clamp (De Hemptinne et coll., 1982). Cependant, un des inconvénients majeurs de ce type de méthode est que le tissu n'est pas perfusé de façon correcte (seules les couches de cellules les plus superficielles sont relativement bien oxygénées). Pour cette raison, des techniques ont été développées basées sur l'utilisation de fragments de ventricule ou d'oreillette perfusés après canulation de l'artère coronaire afférente.

3.2.5. Les techniques sur culture de cellules

Après isolation et mise en culture ou simple maintien en survie des cardiomyocytes de différentes espèces animales, il est possible là encore d'étudier telle ou telle conséquence de l'ischémie (Kimura et coll., 1990).

Ces modèles sont limités par le fait que le cœur renferme bien d'autres types cellulaires que les cardiomyocytes (les cellules endothéliales vasculaires sont sans doute à prendre en compte). Par contre, ils permettent l'utilisation de cardiomyocytes auriculaires ou ventriculaires humains prélevés par simple biopsie cardiaque (Ikomidis et coll., 1994).

3.3. Les modèles "in vivo"

Une des techniques expérimentales les plus utilisées "in vivo" est la ligature coronaire. Cette méthode a été décrite pour la première fois chez le rat (Selye et coll., 1960). Elle est pratiquée également chez le lapin, le chat, le chien et le porc dans un grand nombre d'études expérimentales. De plus, cette technique a été décrite récemment chez la souris (Michael et coll., 1995₆).

Classiquement, l'animal est anesthésié et ventilé artificiellement. La coronaire gauche, ou une de ses branches, est occlue pour un temps donné. Cette occlusion peut être ou non suivie d'une reperfusion.

Par cette technique, il est possible d'étudier l'une ou l'autre des conséquences de l'ischémie aiguë ou encore l'infarctus.

Chez le rat, au contraire de l'homme et des mammifères de grande taille (porc, chien...) les artères coronaires ne sont localisées à l'épicarde qu'à leur origine. L'occlusion se fera de ce fait selon un repère anatomique, sans visualiser le vaisseau à occlure. La reproductibilité de la technique peut en être amoindrie et pourra peut être expliquer, au moins en partie, les disparités rapportées dans cette espèce dans la taille des infarctus créés.

Il faudra classer les animaux en 3 groupes selon ce critère: petit infarctus (4-30% de la circonférence endocardique du ventricule gauche), infarctus modéré (31-45%) et infarctus de grande taille (47-59%) (Pfeffer et coll., 1979).

L'utilisation d'occluseurs pneumatiques, de bagues renfermant des améroïdes (substances capables de gonfler en se chargeant d'eau), de spirales de cuivre, de cathéters munis de ballonnet sont autant de méthodes qui ont été développées afin de permettre une occlusion partielle, d'installation lente ou encore applicable en clinique, mais elles restent peu utilisées.

3.4. Les paramètres mesurés

Parmi les indicateurs de l'ischémie cardiaque, un des plus précoces est l'élévation du segment ST de l'électrocardiogramme. Cependant ce paramètre n'est pas toujours facile à mesurer. L'ECG du rat est notamment difficile à acquérir et à interpréter (de même que "*in vitro*"). De plus ce paramètre ne permet pas de quantifier le phénomène ischémique.

Si la durée d'ischémie est suffisante (et/ou de reperfusion) il est également possible de mesurer la taille de l'infarctus, soit par des techniques histologiques, soit par des techniques histoenzymatiques basées notamment sur l'utilisation des sels de tétrazolium (Nitro Blue Tetrazolium, ou Triphenyl Tetrazolium Chloride) (Nachlas et coll., 1957).

Enfin, des techniques biochimiques sont également disponibles incluant le dosage de marqueurs enzymatiques (aspartate aminotransférase, créatine kinase et ses isoenzymes et isoformes, lactate deshydrogénase et ses isoenzymes) ou des marqueurs non-enzymatiques (myoglobine, troponine T et I).

Compte tenu du fait qu'il est impossible de reproduire fidèlement d'un cœur à l'autre le même volume de zone à risque (variabilité interindividuelle des anastomoses) la plupart des investigateurs ont cherché à normaliser la taille d'infarctus en fonction de la zone à risque.

Cette zone à risque se mesure également par des techniques de coloration.

Il existe une corrélation significative entre la taille de la zone à risque et celle de l'infarctus. Cependant chez le lapin, contrairement au rat, le volume de la zone à risque doit dépasser un certain seuil avant que l'infarctus ne se développe. La raison pour laquelle chez le lapin une zone à risque de petite taille n'évolue pas vers la nécrose est mal connue. Comme chez le rat, les anastomoses coronaires sont virtuellement absentes. Il semble qu'un flux rétrograde au travers des veines de Thébésius, une diffusion d'O₂ directement au travers du tissu ou encore un débit par le système lymphatique puissent jouer un rôle.

Chez le lapin, l'infarctus débute dans la portion médiane et progresse conjointement vers l'épicaarde et l'endocarde. A l'opposé, chez le chien, l'infarctus débute dans la zone sous endocardique. La mesure du débit sanguin régional au niveau des différentes zones peut permettre d'expliquer des différences. Cette mesure se fera à l'aide de microsphères radioactives (Domenech et coll., 1969) ou plus récemment grâce aux microsphères colorées (Hale et coll., 1988), fluorescentes (Glenny et coll., 1993), ou encore excitables par la fluorescence (Morita et coll., 1990).

II.

Les radicaux libres de l'oxygène

CHAPITRE II: Les radicaux libres de l'oxygène

1. Les radicaux libres de l'oxygène (RLO)

L'oxygène, bien que nécessaire à la vie en milieu aérobie, possède des propriétés toxiques pour les organismes vivants. C'est ce que l'on appelle le "paradoxe de l'oxygène" mis en évidence par l'étude des radicaux libres. Cette propriété spéciale de l'oxygène est due à sa structure électronique:

- à l'état atomique, l'oxygène a un électron non apparié sur la couche externe.
- à l'état moléculaire, l'oxygène a deux électrons non appariés sur la couche externe.

L'oxygène atomique est un radical libre, la molécule d'oxygène est un biradical.

1.1. Définition des RLO

"Les radicaux libres sont des espèces chimiques possédant sur leur couche périphérique la plus externe un électron non apparié, ce qui confère à ces molécules une très grande réactivité".

De ce fait, ces espèces vont très facilement réagir avec les molécules du milieu environnant en leur arrachant un électron pour l'apparier avec leur électron célibataire ou bien leur céder ce dernier afin de former une espèce chimiquement moins réactive et donc plus stable selon la règle de l'octet. Les radicaux libres sont donc formés par coupure homolytique d'une liaison de covalence, par gain ou par perte d'électron (Cheesemann et Slater, 1993). Ceci implique également que la molécule du milieu environnant, voisine et initialement stable puisque possédaient un nombre pair d'électrons, se retrouve au terme de la réaction automatiquement porteuse d'un électron célibataire et va donc se comporter à son tour comme un radical libre laissant apparaître la possibilité de réaction en chaîne. D'un point de vue électrique, une espèce radicalaire peut être globalement chargée positivement, négativement ou même être neutre en fonction de sa nature.

• Les radicaux libres de l'oxygène sont:

- l'anion superoxyde $O_2^{\circ-}$
- le radical hydroxyl OH°
- le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , bien que n'étant pas un radical, peut y être associé car c'est un intermédiaire métabolique des radicaux libres. Il fait donc partie des espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui englobe les RLO.

1.2. Mécanisme de production des RLO

Les RLO peuvent être produits de façon intentionnelle ou accidentelle. Dans le premier cas, ils sont utiles à la cellule, (phagocytose, site d'action d'enzymatique). Dans le second, ils peuvent être délétères pour celle-ci et participer à certains processus pathologiques (Flaherty, 1991).

Réduction physiologique de l'oxygène

Physiologiquement, dans un organisme aérobie, la réduction de l'oxygène moléculaire soit l'incorporation de quatre électrons sur la molécule de dioxygène pour former une molécule d'eau, s'effectue par deux voies distinctes.

- Dans la première, une réduction tétravalente, prédomine largement (95% du total). Elle met en jeu la chaîne de transport d'électron localisée sur la membrane mitochondriale interne. Elle conduit directement à la formation d'eau, sans production d'intermédiaires radicalaires. C'est un processus relativement sûr, utilisé physiologiquement pour la production d'énergie.
- Dans la seconde, une réduction par étapes monoélectroniques (univalentes), génère à chaque étape un intermédiaire radicalaire (Fig 7).

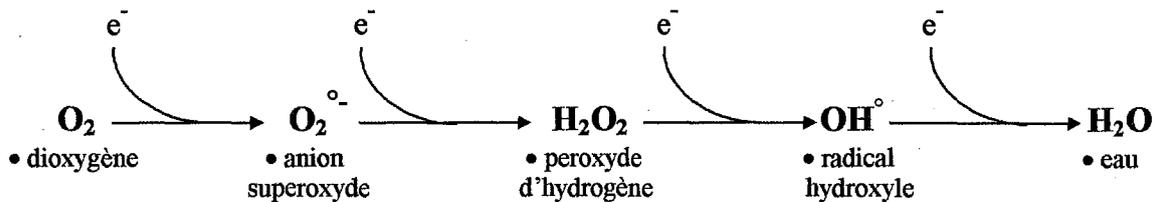


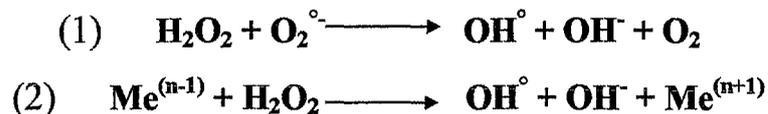
Figure 7: "Réduction par étapes monoélectroniques (univalentes)".

La première étape de cette deuxième voie conduit à la formation d'un anion superoxyde radicalaire qui peut être, dans des conditions physiologiques normales, transformé en peroxyde d'hydrogène spontanément ou sous l'action catalytique des superoxydes dismutases (SOD).

S'il n'est pas éliminé par voie enzymatique, le peroxyde d'hydrogène se décompose spontanément en eau.



Toutefois, cette réaction extrêmement lente est très limitée dans les milieux biologiques du fait de la présence de métaux de transition (Me) qui catalysent la production du radical hydroxyle OH^\bullet , beaucoup plus réactif que l'anion superoxyde, donc beaucoup plus toxique. Le peroxyde d'hydrogène peut ainsi être impliqué dans les réactions de Haber et Weiss résumées par la réaction globale (1) et la réaction de Fenton (2).



La réaction (1) est largement catalysée par des métaux de transition, principalement le fer ferreux (Fe^{2+}). La réaction (2) indique quant à elle, que la production de radicaux hydroxyles peut avoir lieu en l'absence d'anions superoxydes, par simple décomposition du peroxyde d'hydrogène, en présence d'un métal de transition.

L'oxydation mitochondriale produit physiologiquement des anions superoxydes comme sous-produits de la chaîne respiratoire. A l'état normal, ceux-ci sont dégradés par les systèmes de protection cellulaires. Ils ne deviennent toxiques que s'ils sont produits en trop grande quantité ou si les systèmes de production sont saturés.

1.3. Les systèmes de défenses naturelles

Tout organisme aérobie est soumis à l'effet des radicaux libres, très dommageable pour les cellules. Il est donc nécessaire qu'il possède un système de défense. En temps normal, ce système protège l'organisme en éliminant les radicaux libres formés ou en empêchant leur synthèse. Les lésions radicalaires ne sont observées que lorsque les systèmes sont saturés, c'est-à-dire quand la production de radicaux libres est accrue ou lorsque les défenses sont diminuées.

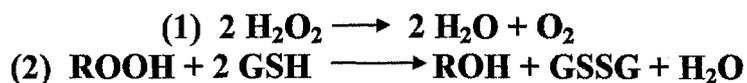
1.3.1. Les systèmes enzymatiques

Dans la cellule, il existe un certain nombre de systèmes enzymatiques spécialisés dans la défense contre les espèces radicalaires (Fig 8).

- Les superoxydes dismutases: l'activité catalytique de l'enzyme qui nécessite un métal de transition consiste en une dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène qui est non radicalaire et donc peu réactif.



- Les catalases et les peroxydases: dans les conditions physiologiques normales, le peroxyde d'hydrogène formé peut être éliminé par des voies enzymatiques faisant intervenir les catalases (1) ou les peroxydases utilisant comme cofacteur le glutathion (2).



1.3.2. Les systèmes non enzymatiques

De nombreux composants endogènes ou exogènes peuvent être considérés comme des antioxydants dans la mesure où ils réagissent avec les radicaux libres de l'oxygène pour former un radical stable et ainsi arrêter la chaîne radicalaire. Les piègeurs de radicaux libres les plus étudiés sont: l'acide ascorbique ou vitamine C, capteur de radicaux libres, l' α -tocophérol ou vitamine E (chainbreaking antioxydant), le β_3 carotène et les composés contenant des groupements sulfhydriles. Les chélateurs de métaux de transition sont aussi considérés comme des antioxydants dans la mesure où ces métaux participent à la formation ou à la transformation des radicaux libres.

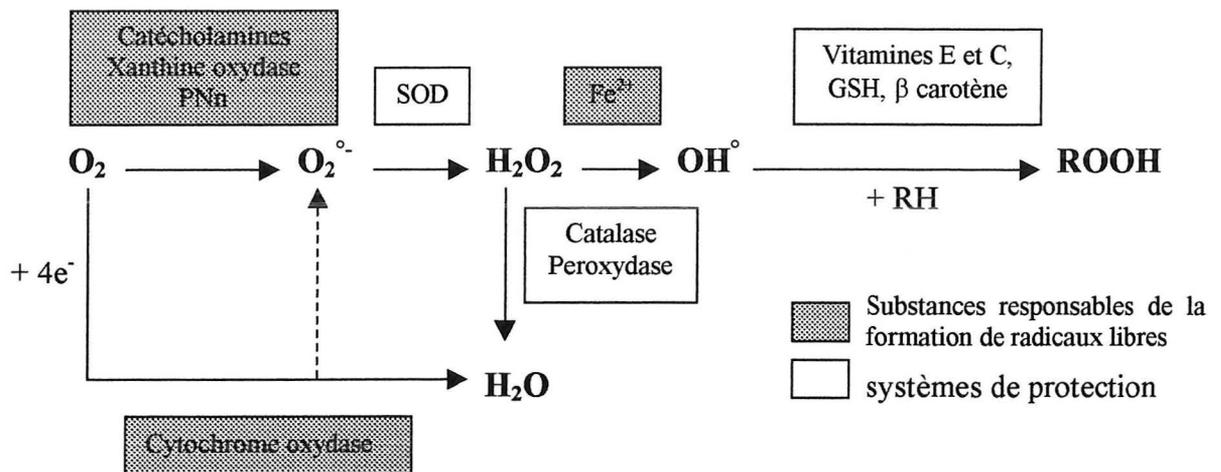


Figure 8: "Mécanisme de production et d'élimination des radicaux libres de l'oxygène".

1.4. Ischémie-reperfusion et RLO

Au cours de certaines situations physiopathologiques comme l'ischémie ou l'hypoxie, les systèmes de défense semblent être progressivement altérés rendant la cellule d'autant plus vulnérable si la réoxygénation permet de relancer la production de RLO.

Ainsi, la réoxygénation (ou reperfusion) d'un organe hypoxique (ou ischémique) semble entraîner une production explosive de RLO. Selon que la molécule d'oxygène se charge d'un, de deux ou de trois électrons, sont formés l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le radical hydroxyle (OH^{\bullet}), ce dernier étant le plus cytotoxique.

- La xanthine oxydase joue un rôle important dans la production des radicaux libres au cours du processus d'ischémie-reperfusion. En effet, pendant l'ischémie, la xanthine déshydrogénase est transformée, de façon irréversible, en xanthine oxydase par un mécanisme de protéolyse calcium-dépendant. Au cours de l'ischémie, il y a également accumulation d'adénosine, provenant de la dégradation de l'ATP en ADP puis en AMP. Cette adénosine est à son tour dégradée en hypoxanthine puis en xanthine. A la reperfusion, l'action de la xanthine oxydase sur la xanthine en présence d'oxygène est responsable de la formation du radical superoxyde.
- Les globules blancs produisent physiologiquement des radicaux libres pour la phagocytose. Lors de l'ischémie-reperfusion, les polynucléaires activés, et accumulés dans la zone ischémique sont responsables d'une synthèse accrue de radicaux libres "in situ". Ces polynucléaires induisent également la libération d'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires. Par oxydations enzymatiques successives, les leucotriènes et les prostaglandines sont synthétisés ainsi que des radicaux libres comme sous-produits.
- L'anion superoxyde est un sous-produit de l'oxydation des catécholamines. En effet, les piègeurs de radicaux libres ont été montrés cardioprotecteurs lors d'une ischémie-reperfusion seulement si les stocks de catécholamines sont intacts (l'administration de SOD, superoxyde dismutase, est sans effet sur les cœurs préalablement réserpines). Rump et Klaus (1994) montrent que l'administration de noradrénaline exogène à la reperfusion augmente la taille de l'infarctus même en présence d' α - et de β -bloquants chargés d'inhiber les effets fonctionnels de la noradrénaline. Cet effet délétère est entièrement antagonisé par l'administration de SOD, donc bien dû à la production d'anion superoxyde.

Ainsi ces radicaux ont une origine intracellulaire (mitochondries principalement et, dans certains tissus la réaction est catalysée par la xanthine oxydase), membranaire (métabolisme de l'acide arachidonique) et extracellulaire (leucocytes). Une "activation" de ces différentes sources intervient pendant l'ischémie, mais la production massive des dérivés oxygénés instables n'est déclenchée que par la reperfusion (réoxygénation). La cytotoxicité des RLO peut alors s'exprimer non seulement par le fait de cette hyperproduction temporaire, mais également parce que les systèmes de protection naturelle ont été diminués par l'ischémie, que se soient les piègeurs enzymatiques (superoxyde dismutase, catalase, peroxydase) ou les antioxydants (glutathion réduit et vitamine E principalement) qui forment la base de cette protection.

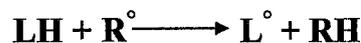
2. Action des RLO

Le principal effet métabolique de l'attaque radicalaire est une modification du potentiel redox de la cellule par consommation de NADH et NADPH. Les radicaux libres peuvent également se lier de façon covalente aux biomolécules, formant un complexe stable qui perturbe fortement les fonctions moléculaires physiologiques (notamment si la liaison se fait sur le site actif d'un récepteur ou sur une enzyme). Des études, tant "*in vitro*" que "*in vivo*", ont montré que les radicaux libres étaient susceptibles d'entraîner des modifications chimiques et donc d'altérer tous les types de biomolécules: protéines, lipides, glucides et acides nucléiques.

2.1. Action des RLO sur les lipides

L'une des conséquences principales de la surproduction temporaire et non contrôlée de RLO est l'initiation de phénomènes de peroxydation des lipides membranaires qui constituent "*in vivo*" la cible élective des radicaux libres. L'oxydation de ces lipides membranaires par les radicaux libres donne naissance à des composés très instables qui, à leur tour, oxydent les lipides voisins, ce qui aboutit non seulement à une diminution de la fluidité membranaire, mais également à un déséquilibre fonctionnel des protéines membranaires, en particulier des protéines à fonction vectorielle (canaux ioniques) ou des récepteurs.

Ainsi, la peroxydation lipidique peut être initiée par l'interaction d'un radical (R° par exemple) avec un acide gras (LH) pour former un radical (L°), qui peut alors réagir rapidement avec l'oxygène pour former un radical peroxyde (LOO°).



Ce radical peroxyde peut, à son tour, attaquer un acide gras voisin pour former un hydroperoxyde (LOOH) et un nouveau radical (L°).



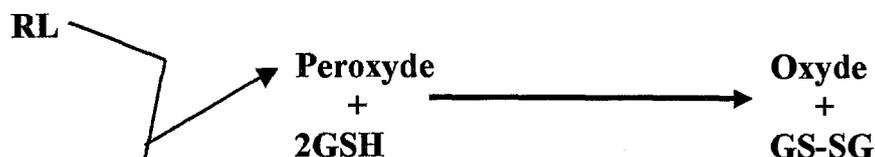
Cette réaction continue à se propager jusqu'à la formation d'un produit non radicalaire (tel que LOOL ou LL) grâce à la rencontre de deux entités radicalaires, ou encore la formation d'un radical stable (en s'associant par exemple à l' α -tocophérol) (Tappel, 1973). De cette réaction en chaîne, résultent donc des modifications qui vont largement altérer les fonctions membranaires.

Il est à noter que ces mécanismes impliquant une attaque radicalaire au cours de la reperfusion post-ischémique ont été rapportés aussi bien sur des cellules (cellules endothéliales par exemple) que sur des organes isolés, suggérant qu'ils peuvent très vraisemblablement se produire "*in vivo*", en particulier dans le tissu cardiaque (Burton et coll., 1984; Ytrehus et coll., 1986).

2.2. Action des RLO sur les métabolites intervenant dans le potentiel RED-OX cellulaire

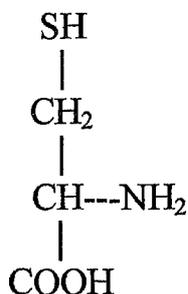
Il s'agit principalement du glutathion et de la cystéine, regroupés sous le terme de "thiols non protéiques" car leur fonction liée à leur groupement actif est semblable.

Le glutathion, tripeptide composé de glutamate, cystéine et glycine est le plus abondant des composés contenant un groupement thiol non protéique (Bray et Taylor, 1993). Son rôle de substrat de la glutathion peroxydase lui confère des propriétés de détoxification des xénobiotiques, de défense contre les radicaux libres et de maintien du potentiel red-ox cellulaire.



La diminution du taux cellulaire en glutathion est associée, dans de nombreuses pathologies, à un risque élevé de stress oxydant.

La cystéine est le facteur limitant de la synthèse du glutathion. C'est l'acide aminé porteur du groupement thiol impliqué dans le maintien du potentiel red-ox cellulaire (le groupement thiol n'étant pas engagé dans la liaison protéique, ses propriétés subsistent dans le peptide).



Cet acide aminé est un donneur d'électron susceptible de former des liaisons de covalence et des chélates. Il peut également perdre l'hydrogène du groupement thiol pour former un pont disulfure. Cette propriété correspond à son rôle protecteur vis-à-vis des espèces radicalaires.

2.3. Action des RLO sur les protéines

Les protéines, bien que moins sensibles que d'autres biomolécules, sont néanmoins sujettes à l'attaque des radicaux libres. Il en résulte des modifications structurales (modification de la structure primaire, secondaire ou tertiaire) et des modifications de leur activité, particulièrement si l'oxydation a lieu sur un site actif de la protéine.

2.3.1. Modification des acides aminés composant la protéine

Bien que tous les acides aminés soient susceptibles d'être attaqués par les radicaux libres, certains d'entre eux sont beaucoup plus sensibles. C'est le cas du tryptophane, de la tyrosine, de la cystéine et de l'histidine. La cystéine peut, dans une protéine, perdre l'hydrogène de son groupement thiol, induisant la formation de ponts disulfure inter ou intrachaine peptidique ou la liaison à d'autres molécules. Le tryptophane et les autres acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) peuvent voir leur cycle aromatique détruit. La tyrosine peut, sous l'effet des radicaux libres, créer des bityrosines par la formation d'un radical tyrosyl qui réagit avec d'autres tyrosines pour donner un composé biphénolique stable (Davies et coll., 1986_b; Faure et Lafond, 1995).

Toutes ces modifications entraînent un changement de la charge électrique globale de la protéine.

2.3.2. Agrégation et fragmentation de la protéine

Après attaque radicalaire, les protéines dont la structure primaire a été modifiée, peuvent:

- former des agrégats (par liaison disulfure, attraction hydrophobe ou ionique),
- être fragmentées par action directe des radicaux libres sur la protéine ou par protéolyse enzymatique. Les modifications les plus courantes des acides aminés dues aux radicaux libres semblent, en effet, être des signaux universels de protéolyse. Les protéines sont ainsi rapidement reconnues et dégradées par des enzymes protéolytiques intracellulaires (Davies, 1986_a).

2.3.3. Modifications de la structure secondaire et tertiaire des protéines

Elles sont dues à l'altération de la structure primaire. Il en résulte une moindre solubilité car le changement de conformation met en évidence des sites hydrophobes à la surface de la protéine.

2.3.4. Modifications des groupements thiols protéiques

Si les groupements thiols non protéiques (glutathion, cystéine) peuvent être oxydés par les espèces radicalaires, il en est de même pour les thiols protéiques. Les conséquences de ces modifications seront d'autant plus importantes que les thiols jouent un rôle primordial dans les protéines (maintien de la structure secondaire et de la liaison entre les sous-unités, catalyseurs du site actif d'enzyme, sites de liaison du substrat...).

Contrairement aux thiols non protéiques, les thiols protéiques réagissent lentement à l'exposition aux radicaux libres. Ils sont plus ou moins rapidement oxydés en fonction de leur accessibilité aux réactifs. Les différents degrés d'oxydation des groupements thiols sont: disulfure (-S-S-), acide sulfénique (-SOH), acide sulfonique (-SO₂H), acide sulfinique (SO₃H) (Tab I).

Etat redox			
0	R-SH		Thiols
	↓ +2 ^{e-}	RS-SR	Pont disulfure
+2	R-SOH		Acide sulfénique
	↓ +2 ^{e-}		
+4	R-SO ₂ H		Acide sulfinique
	↓ +2 ^{e-}		
+6	R-SO ₃ H		Acide sulfonique

Tableau I: "Les différents états rédox des groupements Thiols".

Certains groupements thiols protéiques pourraient avoir pour rôle d'être oxydés de façon prioritaire, en cas de stress oxydant, afin de protéger les groupements indispensables au fonctionnement cellulaire.

L'albumine, protéine la plus abondante du plasma, possède un groupement thiol libre qui peut, par oxydation, se combiner à une héli-cystéine ou à un glutathion. En temps normal, seul un tiers des molécules d'albumine est oxydé. Ce rapport pourrait augmenter de façon importante au cours d'un stress oxydant.

3. Détection de la surproduction des RLO

L'un des paradoxes en matière de radicaux libres est que leur implication dans la pathogénèse de l'ischémie n'a pu, jusqu'à présent, être déduite que de façon indirecte à partir de l'action protectrice de leurs piègeurs. Il est en effet très difficile de mettre directement en évidence ces radicaux en raison de l'extraordinaire brièveté des réactions auxquelles ils participent (leur demi-vie est de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-6} seconde).

Sur le plan expérimental, la conjugaison de deux techniques permet une approche plus directe des phénomènes radicalaires et suscite, de ce fait, un grand intérêt: la résonance paramagnétique électronique (RPE) et l'utilisation de "piégeurs de spin". La RPE permet de détecter, par spectroscopie, le radical libre à partir du moment magnétique exercé par son électron célibataire. Quant au piègeur de spin, il a comme principe de faire réagir le radical instable avec un piègeur (spin-trap) pour former une espèce paramagnétique beaucoup plus stable (spin adduct) et donc plus aisément observable en spectroscopie RPE.



R° : radical
 ST : spin-trap, piègeur
 $ST^{\circ}-R$: spin adduct, produit d'addition radicalaire

Toutefois ces deux techniques, pour intéressantes qu'elles soient, posent encore de nombreux problèmes méthodologiques et ne sont de toute façon aujourd'hui applicables à des organes isolés. Elles n'ont donc pour l'instant aucune application clinique.

L'évaluation clinique des interventions anti-radicalaires doit donc nécessairement s'appuyer encore sur des critères indirects. En pratique, il s'agit en général de doser les produits de la peroxydation lipidique. Dans cet esprit, la mesure du malonedialdéhyde (produit terminal de la dégradation des lipides membranaires) a été la plus utilisée, mais la spécificité de ce marqueur est en réalité assez faible. Le dosage des di-ènes conjugués (produits intermédiaires de la dégradation des lipides membranaires polyinsaturés) est plus fiable que celui du malonedialdéhyde, mais la nécessité de prélèvements tissulaires et la relative complexité de la méthodologie, ont, jusqu'à présent, limité l'utilisation de cette technique en pratique clinique courante.

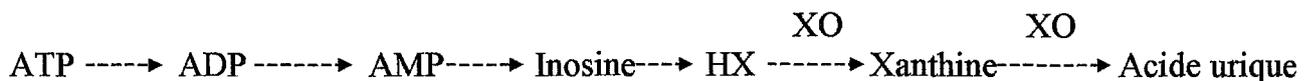
4. Thérapeutique anti-radicalaire lors de la séquence d'ischémie-reperfusion

Ce chapitre comporte trois parties. Dans la première, sont présentés quelques systèmes cellulaires potentiellement générateurs d'espèces radicalaires au cours de la séquence ischémie-reperfusion. Dans la deuxième, sont évoqués les différentes interventions anti-radicalaires, tandis que la troisième envisage une thérapie adaptée aux différentes complications liées au caractère évolutif de l'ischémie.

4.1. Systèmes cellulaires potentiellement générateurs d'espèces radicalaires au cours de la séquence ischémie-reperfusion

4.1.1. Système de la xanthine oxydase (XO)

Dans les cellules animales, l'hypoxanthine (HX), produit de dégradation de l'ATP est oxydée en xanthine qui, à son tour, est oxydée en acide urique. Ces deux réactions sont catalysées par la xanthine oxydase.



Dans le cœur de rat, la XO se présente sous trois formes qui peuvent coexister dans des proportions variables.

- le type D, largement majoritaire dans le cœur sain (environ 85% de l'activité totale de l'enzyme) est une déshydrogénase stricte utilisant exclusivement le NAD^+ comme accepteur d'électrons.
- le type D/O, transfère les électrons sur l'oxygène en l'absence de NAD^+ , mais possède une affinité plus forte pour le NAD^+ que pour l'oxygène.
- le type O, enfin, transfère préférentiellement ses électrons sur l'oxygène moléculaire en formant des anions superoxydes $\text{O}_2^{\cdot -}$.

Il semble aujourd'hui admis que les situations physiopathologiques d'hypoxie ou d'ischémie soient capables d'induire une conversion de la xanthine oxydase de type D en type O sachant qu'au cours de la phase d'ischémie, la XO de type O est peu active du fait de la faible pression partielle en oxygène dans les tissus. Son substrat, l'hypoxanthine s'accumule alors dans la cellule.

Lors de la reperfusion, la réadmission de l'oxygène permet d'amorcer la réaction, ce qui entraîne la production d'anions superoxydes (Fig 9).

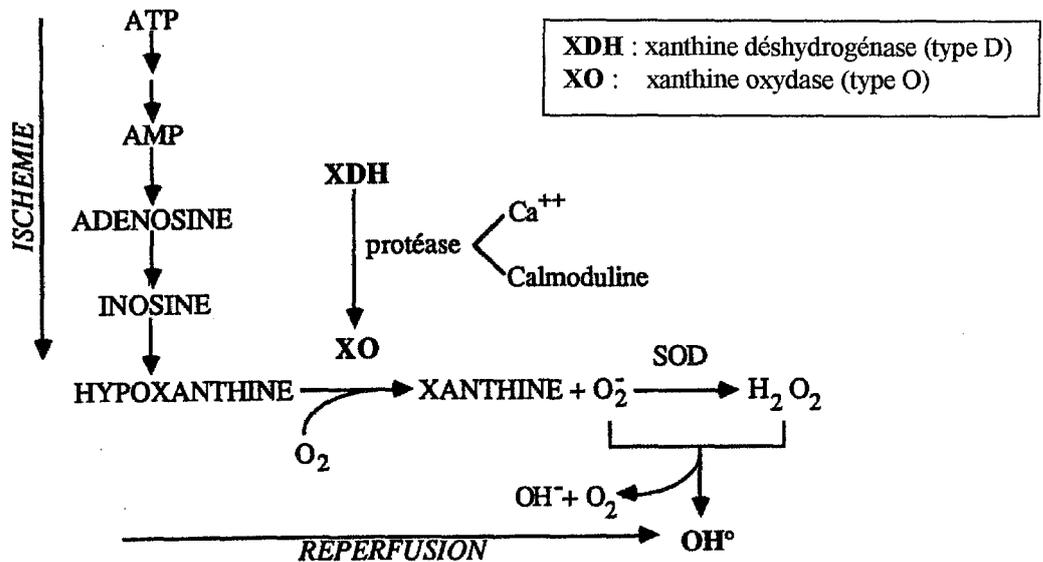


Figure 9: "Mécanisme proposé pour la production d'anions superoxydes par la voie de la xanthine oxydase au cours de l'ischémie et de la reperfusion".

4.1.2. Processus inflammatoires

De nombreuses études expérimentales soulignent aujourd'hui le rôle des leucocytes et en particulier des polynucléaires neutrophiles en tant que source extracellulaire importante de radicaux libres (Lucchesi et coll., 1984). On sait en effet qu'il se produit, dans les zones ischémiques, une accumulation de neutrophiles. Leur "activation" se traduit par:

- la libération d'enzymes protéolytiques contenues dans les granules de ces cellules,
- une libération de l'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires et sa conversion par des lipooxygénases en substances chimiotactiques qui amplifient l'afflux des polynucléaires,
- et une production de radicaux libres, en particulier d'anion superoxyde et de peroxyde d'hydrogène. Comme l'anion superoxyde entraîne par l'intermédiaire d'une réaction de réduction (passage de la forme ferrique à la forme ferreuse) une mobilisation du fer à partir de la ferritine, qui en est la forme de stockage intracellulaire, se trouvent ainsi réunis à la fois les substrats et le catalyseur requis pour assurer la production du radical hydroxyle, et potentiellement d'autres dérivés oxygénés (acide hypochloreux, oxygène singulet) tout aussi cytotoxiques.

Ces radicaux libres d'origine leucocytaire pourraient de surcroît, par rétro-action positive, potentialiser la réponse inflammatoire dans la mesure où ils provoqueraient la sécrétion, à partir de l'acide arachidonique (voie de la lipooxygénase), de substances chimiotactiques contribuant à majorer le recrutement "in situ" de polynucléaires activés (Fig 10).

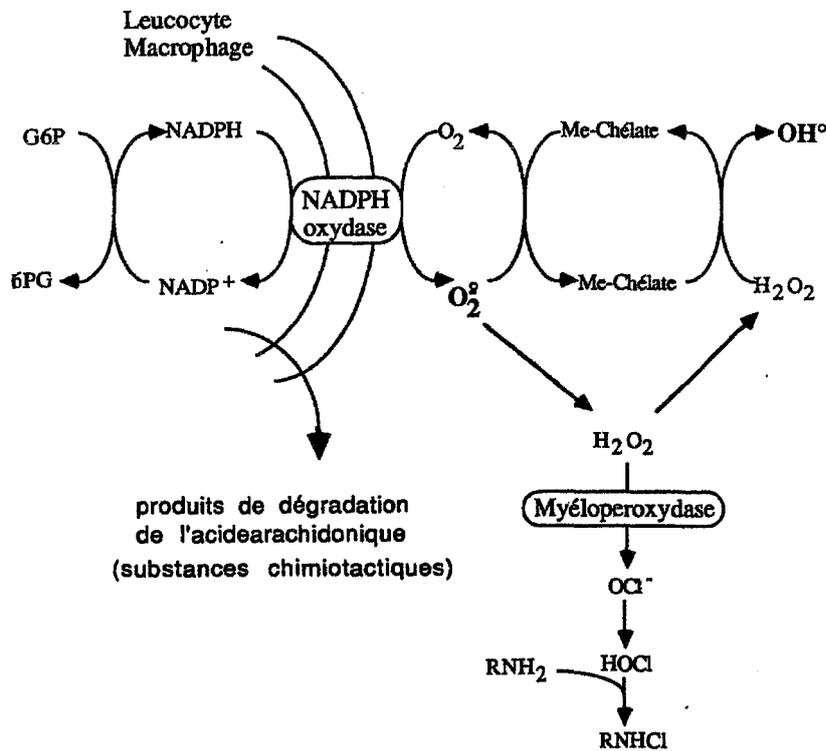


Figure 10: "Représentation schématique des différentes voies de production d'espèces cytotoxiques à partir des cellules inflammatoires".

4.1.3. Autres sources des RLO

Différents autres mécanismes stimulés au cours de l'ischémie et/ou la réoxygénation sont également susceptibles de produire des espèces radicalaires. On peut citer le système de transfert des électrons, l'oxydation de petites molécules telles que les catécholamines ou les thiols. L'acide arachidonique libéré au cours de l'ischémie et qui suit une voie d'oxydation qui libère des électrons et fournit des endoperoxydes et des leucotriènes, eux-mêmes donneurs d'électrons, etc. ...

4.2. Les interventions anti-radicalaires

On peut envisager d'intervenir de 4 façons différentes:

- subvenir à la défaillance des systèmes de défenses naturelles consécutive à l'ischémie en administrant de la SOD, de la catalase ou une association des deux.
- inhiber les systèmes générateurs d'espèces radicalaires tels que la xanthine oxydase et la réponse inflammatoire.
- piéger les radicaux libres générés en utilisant des piègeurs, la résultante finale étant un composé stable.
- chélater le fer qui est le médiateur indispensable de la réaction de Fenton, responsable de la production du radical hydroxyle.

4.3. Application de la thérapeutique anti-radicalaire aux différentes phases de l'ischémie

L'ischémie myocardique est un phénomène évolutif, qui entraîne des altérations d'ordre métabolique, mais également d'ordre fonctionnel, vasculaire, morphologique et électrophysiologique. Il est classiquement admis que ces altérations peuvent, dans un premier temps, si l'ischémie n'a pas été trop durable et/ou trop sévère, être réversibles, le tissu récupérant alors ses caractéristiques initiales après une reperfusion adéquate. Cependant, si les conditions d'ischémie sont maintenues, elles vont entraîner un état d'irréversibilité aboutissant à la mort cellulaire.

Dans ce qui suit, nous allons aborder la thérapeutique anti-radicalaire et envisager son application au myocarde ischémique ayant atteint un degré d'altération réversible ou irréversible.

4.3.1. Phase réversible

La reperfusion précoce du myocarde ischémique apparaît actuellement comme étant le seul moyen de restaurer durablement une fonction contractile satisfaisante. Néanmoins, cette récupération s'avère le plus souvent très lente (4 jours à la suite d'une ischémie myocardique régionale de 15 minutes chez le chien). Cette dépression fonctionnelle post-ischémique qui se produit en l'absence de toute nécrose, a été décrite sous le nom de "stunned myocardium".

En 1988, Bolli a suggéré que les radicaux libres de l'oxygène pouvaient contribuer à la dysfonction contractile post-ischémique. Depuis lors, de nombreux auteurs se sont intéressés à l'application de thérapeutiques anti-radicalaires à ce phénomène. Différentes interventions ont été étudiées :

- SOD (Jurmann et coll., 1988).
- SOD + catalase (Myers et coll., 1985; Gross et coll., 1986; Przyklenk et Kloner., 1986).
- chélateurs du Fe: desféral (Bolli et coll., 1987_a; Farber et coll., 1987; Reddy et coll., 1988).
- piègeurs de radicaux libres: N-2- Mercaptopropoxyglycine (MPG) (Myers et coll., 1988)
diméthylthiourée (Bolli et coll., 1987_a).
- inhibiteurs de la XO: allopurinol (Charlat et coll., 1987).
extrait de Gingko biloba (Guillon et coll., 1986).
- inhibiteurs de la réponse inflammatoire.

La plupart de ces interventions ont permis d'atténuer le phénomène de "stunning". Toutefois, le rôle néfaste des neutrophiles durant ce phénomène reste controversé. Différents auteurs ont d'ailleurs démontré l'absence d'une accumulation significative de neutrophiles après reperfusion précoce de cellules ischémisées réversiblement atteintes (Go et coll., 1988; Richart et coll., 1988_a).

4.3.2 Arythmies de reperfusion

Même dans le cas où la reperfusion du myocarde ischémique est réalisée de façon très précoce, elle conduit parfois au développement de troubles graves du rythme cardiaque (Yamada et coll., 1990). L'un des mécanismes cellulaires de ces troubles est très probablement l'exacerbation de la production cellulaire de radicaux libres de l'oxygène sous l'effet de la réadmission brutale de l'oxygène. Il en résulte des phénomènes de peroxydation des lipides et des protéines membranaires aboutissant à un désordre structural, responsable de l'inactivation de certaines pompes ioniques membranaires, amenant à des perturbations électrophysiologiques locales, elles-mêmes, génératrices d'arythmies ventriculaires (Boucher et de Leiris, 1990).

Différents agents anti-radicalaires ont permis de réduire l'intensité et la fréquence de ces arythmies parmi lesquels:

- l'allopurinol (Manning et coll., 1984).
- le PBN (N-tert-butyl-a-phenylnitron) qui est un agent piègeur de spin (Hearse et Tosaki, 1987).
- la SOD et la catalase (Woodward et Zakaria, 1985; Berner et coll., 1986).
- le desféral et différents piègeurs des radicaux libres tels que le mannitol, le glutathion et la méthionine (Bernier et coll., 1986).

Sur ce point, il convient également de noter que divers systèmes générateurs de radicaux libres sont, au contraire, capables d'augmenter l'incidence et la sévérité de ces arythmies de reperfusion (Bernier et coll., 1986).

4.3.3. Phase irréversible

Lorsque l'ischémie est très sévère et/ou de durée trop longue, les lésions cellulaires deviennent alors irréversibles et le tissu évolue naturellement vers la nécrose.

Différents auteurs se sont intéressés à l'étude des effets des radicaux libres sur la taille de l'infarctus et différentes interventions anti-radicalaires ont été proposées chez le chien :

- inhibition de la XO par l'allopurinol (Werns et coll., 1986; Richard et coll., 1988_b).
- SOD et catalase (Werns et coll., 1985; Przylenk et Kloner, 1989).
- piégeage des radicaux libres par MPG (Mitsos et coll., 1986).
- chélation du fer par le desféral (Lesnefsky et coll., 1988; Reddy et Przylenk, 1988).
- inactivation ou déplétion des neutrophiles (Go et coll., 1988).

Les résultats obtenus sont controversés et deux éléments doivent être pris en considération :

- la variabilité du réseau collatéral d'un sujet d'expérience à l'autre,
- la variabilité de la durée de reperfusion d'une expérience à l'autre, ce qui laisse conclure, par erreur, à une véritable sauvegarde cellulaire et donc à une limitation de la taille de l'infarctus lorsqu'il ne s'agit en réalité que d'un retard dans l'apparition de la mort cellulaire.

Il est très probable qu'au cours d'un processus d'ischémie sévère où des altérations cellulaires irréversibles interviennent, les radicaux libres éventuellement produits à la reperfusion exercent alors leurs effets toxiques sur les myocytes déjà irréversiblement endommagés par d'autres conséquences de l'ischémie et en particulier par les perturbations de l'homéostasie calcique. Dans ces conditions, les radicaux libres peuvent, tout au plus, accélérer la dégradation de cellules déjà mortes, mais n'exercent vraisemblablement pas d'action délétère propre.

4.4. CONCLUSION

Il existe actuellement de nombreux travaux qui mettent en évidence l'existence d'une surproduction de radicaux libres dans le tissu myocardique au cours de la séquence ischémie-reperfusion et qui démontrent que ces espèces radicalaires sont capables d'altérer, à des degrés divers, les cellules cardiaques et endothéliales.

Dans des conditions de lésion ischémique réversible, la plupart des études démontrent que les radicaux libres contribuent à aggraver ou à prolonger la période de dysfonction contractile observée après reperfusion. En revanche, lorsque la reperfusion intervient plus tardivement, les radicaux libres oxygénés ne semblent pas jouer un rôle majeur, les altérations cellulaires étant déjà irréversibles. La thérapeutique anti-radicalaire ne permet donc pas une limitation de la taille de la nécrose résultant de l'ischémie myocardique permanente, mais elle peut vraisemblablement améliorer la récupération post-ischémique lorsqu'une reperfusion bien conduite intervient de façon précoce.

III.

La mélatonine

CHAPITRE III: la mélatonine

1. Historique

1.1. De la glande pinéale à la neurohormone mélatonine

La découverte de la glande pinéale remonte à plus de 2000 ans. Cette glande, de par sa situation anatomique, a toujours suscité la curiosité et donc de nombreux travaux de recherche. Le déroulement de son étude peut se résumer à trois phases (Vitte, 1987). Depuis sa découverte par Hérophilus en 300 avant J.C., jusqu'au milieu du 18^{ème} siècle, la glande pinéale ne fut décrite que par sa morphologie. Puis, à partir du milieu du 19^{ème} siècle, l'innervation de la glande pinéale et son rôle endocrine furent mis en évidence. L'observation de troubles de la puberté consécutifs à une tumeur épiphysaire suggérait le rôle de la glande pinéale sur les systèmes de la reproduction. Enfin, depuis 1950, grâce au développement des moyens d'investigations analytiques et pharmacologiques, la glande pinéale a pu être identifiée à une glande endocrine capable, sous l'influence de stimuli précis, de libérer une hormone ou plus précisément une neurohormone: la mélatonine (MT).

Ainsi, bien que le rôle éclaircissant d'extrait pinéalien sur la peau d'amphibiens ait été démontré par Mc Cord et Allen en 1917, ce n'est qu'après l'isolement, la caractérisation chimique (Lerner et coll., 1958) et physiologique (Wurtman et coll., 1959) de la MT, que la glande pinéale a été considérée comme une glande neuroendocrine (Delaunay, 1987) Par ailleurs, la MT, principale substance de la glande pinéale a les mêmes effets endocriniens que les extraits épiphysaires et répond aux critères définissant une hormone comme étant:

"une substance produite par un organe et qui, après avoir été transportée par le sang, peut agir sur un organe éloigné en modifiant sa fonction".

1.2. La mélatonine, une neurohormone aux fonctions pléiotropes

La MT présente des fonctions très diverses et variées qui en font une substance naturelle digne d'un grand intérêt. Juste après sa découverte, la première fonction qui lui fut attribuée était reliée à un rôle de régulation dans l'axe neuroendocrinien et plus précisément affecté au niveau du système de reproduction. Aussi, si le rôle de la glande pinéale et de la MT sur la reproduction animale a été le plus étudié (Reiter, 1980), un certain nombre de travaux effectués aussi bien chez l'animal que chez l'homme, laissent penser qu'elles peuvent interagir avec des structures du système nerveux central (SNC), pour percevoir, différencier et intégrer des informations sur l'environnement comme la photopériode, la température (Haldar-Mirsa et Prevet, 1983) ou remplir une fonction chronobiologique clairement établie dans la régulation des cycles veille-sommeil (Garfinkel et coll., 1995). Le rôle de la MT en tant que neuromédiateur a même été suggéré (Bubenik et coll., 1976). Cependant, à en juger par la grande diversité des modifications observées sur des cellules suite à une pinéalectomie (qui supprime la principale source endogène de production de MT) ou

l'administration exogène de l'indole, il est évident que les activités de la MT ne se cantonnent pas uniquement au niveau du système hypothalamo-pituitaire-gonadal mais le surpassent grandement. Depuis le début des années 90, il fut mis en évidence que la MT était un piègeur de radicaux libres très efficace et établi de manière générale qu'elle constituait un antioxydant à part entière (Reiter, 1995). Puis il fut également proposé que via son caractère amphiphile (puisque possédant un caractère hydrophile et très lipophile) la MT avait non seulement des effets sur toutes les cellules mais aussi potentiellement sur tous les compartiments subcellulaires. C'est pourquoi les actions intracellulaires de la MT (dont certaines sont indépendantes de toute interaction avec des récepteurs alors que d'autres sont médiées par des récepteurs nucléaires) ont suscité l'attention de nombreuses recherches ces derniers temps.

2. Biochimie de la mélatonine

2.1. Biosynthèse

Chez les mammifères, la biosynthèse de la MT et des dérivés indoliques dans les pinéaloctes (cellules endocrines de la glande pinéale) s'effectue principalement durant la période nocturne et débute par la capture du tryptophane libre plasmatique par un mécanisme actif (Reiter, 1991_a). Dans un premier temps, le tryptophane va être hydroxylé en 5-hydroxytryptophane par la tryptophane hydroxylase puis décarboxylé en sérotonine via la L-amino acide décarboxylase (Fig 10). A ce niveau, la concentration en sérotonine dans la glande pinéale est très élevée puisqu'elle est 50 à 100 fois supérieure à la quantité retrouvée dans les autres organes. De plus, cette monoamine est le point de départ des voies d'anabolisme des dérivés indoliques (Fig 11). Ainsi, alors que la sérotonine subit une désamination oxydative dans les autres organes, elle suit une voie métabolique différente dans la glande pinéale. Dans cette dernière, la sérotonine est N-acétylée par la N-acétyltransférase (NAT) en N-acétylsérotonine pour être finalement catalysée en MT par la 5-hydroxyindole-O-méthyltransférase (HIOMT) (Axelrod, 1974).

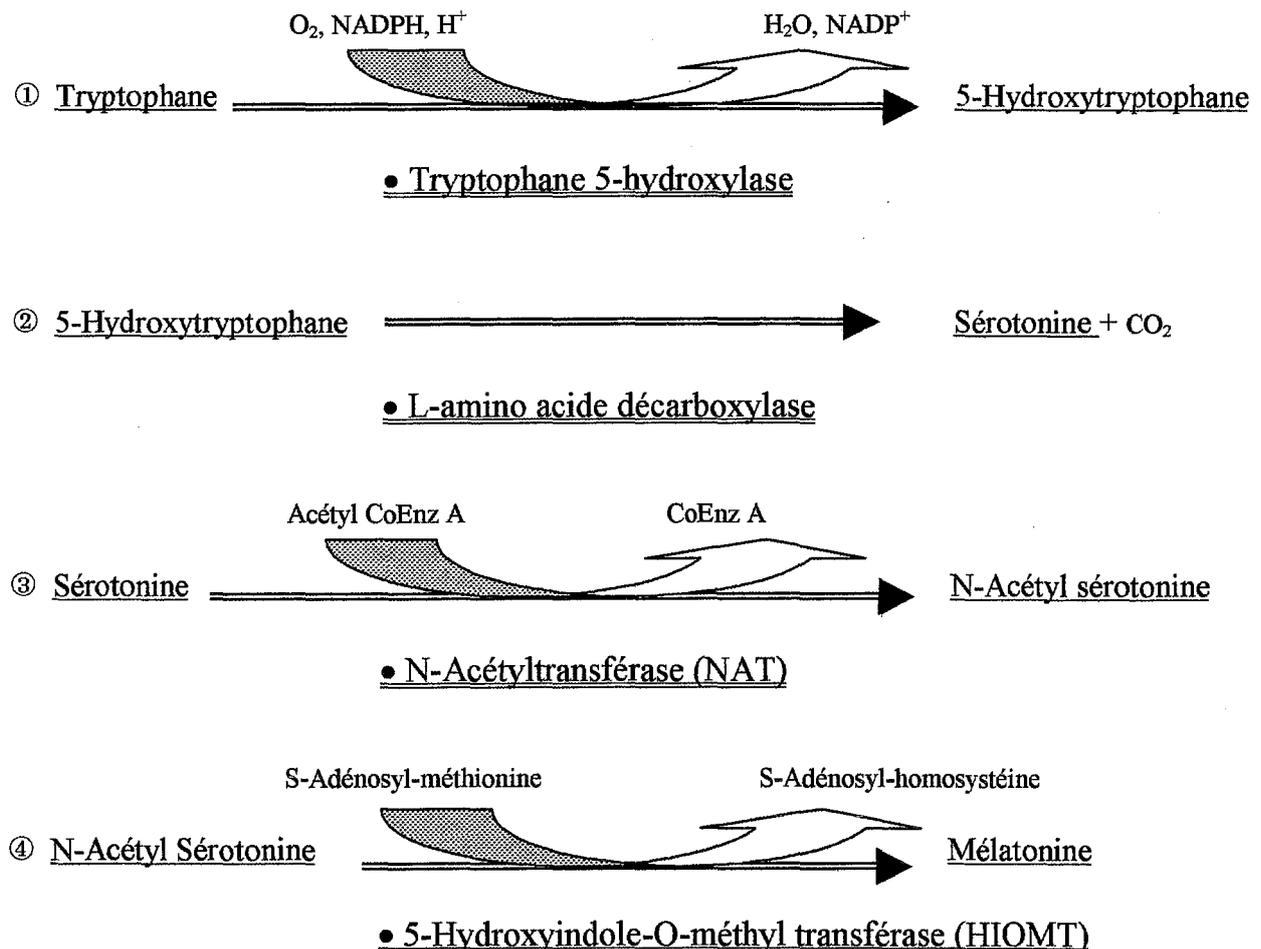


Figure 10: "Biosynthèse de la mélatonine à partir du tryptophane dans la glande pinéale".

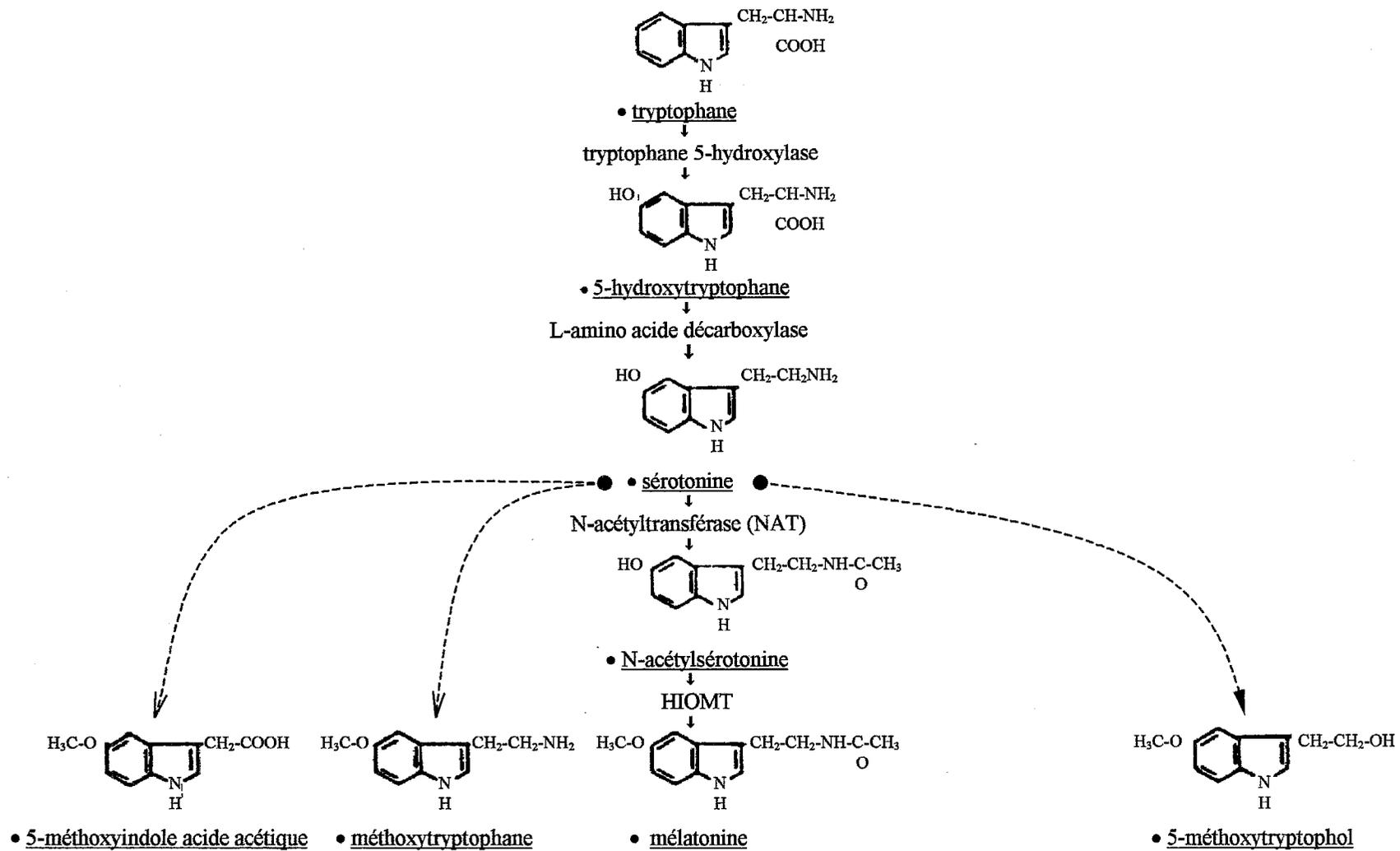


Figure 11: "Métabolisme du tryptophane dans la glande pinéale".

En plus d'être converti en mélatonine, le tryptophane via la sérotonine est métabolisé de façon enzymatique en divers autres indoles.

HIOMT: 5-hydroxyindole-O-méthyl transférase

2.2. Sécrétion

Une fois produite dans le pinéaloocyte, la MT est sécrétée très vite dans la circulation sanguine. Le faible taux de stockage de cette hormone retrouvé dans l'organe de production est inhabituel pour une glande exocrine. Ceci s'explique à la fois parce que la formation de vésicules de stockage serait illogique compte tenu de son cycle de production nyctéméral et parce que la MT ne semble pas avoir un mécanisme de sécrétion spécifique. En effet, la neurohormone est douée d'une grande solubilité lipidique ainsi que d'une relative solubilité aqueuse (Schida et coll., 1994). Ce caractère amphiphile lui permet de franchir très facilement les barrières cellulaires. Ainsi, depuis les pinéaloocytes jusqu'à la lumière des capillaires perfusant la glande pinéale, le cheminement à travers les cellules endothéliales se fait uniquement par simple diffusion (Klein et coll., 1981).

2.3. Distribution

L'utilisation de MT marquée par un isotope radioactif a permis d'étudier sa distribution. La MT circulante est liée aux protéines plasmatiques et principalement à l'albumine (61%) par l'intermédiaire de sites de liaison à grande capacité mais de faible affinité (Cardinali et coll., 1972). Après une injection systémique, la MT est rapidement métabolisée par le foie (Kopin et coll., 1961) et peut-être par les poumons (Gibbs, 1985). La demi-vie d'élimination de la MT varie selon les auteurs et les protocoles expérimentaux qu'ils utilisent. Cependant, on peut estimer la demi-vie de la phase de distribution de la MT entre 3 et 6 minutes.

2.4. Catabolisme

Au niveau hépatique, la MT subit un métabolisme intense. 92 à 97% de la MT circulante est métabolisée par le foie après un premier passage (Pardridge et Mietus, 1980). La MT est hydroxylée en 6-hydroxymélatonine (6-HMT) puis éliminée dans les urines sous forme libre (1%), sous formes sulfo-conjuguée (70-80%) et glucurono-conjuguée (5%) (Kopin et coll., 1961). La mesure du taux de 6-HMT dans les urines est un bon reflet du taux de MT plasmatique lui-même bon indicateur de l'activité épiphysaire. C'est pourquoi la mesure de ces deux paramètres est fréquemment réalisée dans les protocoles expérimentaux.

3. Physiologie

3.1. Rythme de sécrétion de la mélatonine

Le taux de MT plasmatique est un bon reflet de l'activité épiphysaire ce qui en fait un paramètre de mesure très fréquemment utilisé dans différentes études. La mesure des taux indoliques sanguins présente un rythme circadien qui peut s'expliquer par le cycle nyctéméral parallèle de production et de sécrétion de la MT par la glande pinéale la nuit. Ainsi, le taux de MT chez toutes les espèces de mammifères est nul ou très faible le jour et augmente la nuit pour atteindre une valeur maximale entre 0 et 4h (Klein, 1979_a) à moins qu'une anomalie génétique particulière affecte les enzymes responsables de la conversion de la sérotonine en MT (Goto et coll., 1989). En plus d'un rythme circadien, il a été observé, chez l'homme, un rythme annuel bimodal avec une amplitude minimale au printemps et en automne (Arendt et coll., 1979).

En plus de la glande pinéale, plusieurs autres tissus produisent la MT. Ainsi, la rétine ou le tractus gastro-intestinal sont capable de transformer la sérotonine en MT (Pevet et Coll., 1980). Ceci a pu être mis en évidence par la production de MT chez des animaux pinéalectomisés soumis à un régime très riche en tryptophane (Heüther et coll., 1992; Yaga et coll., 1993). Cependant dans des conditions physiologiques normales, la quantité de MT produite au niveau de ces tissus reste très faible comparée à celle synthétisée par la glande pinéale et ne possède pas de rôle significatif sur la mesure des taux indoliques sanguins (Menedez-Pelaez et coll., 1987).

3.2. Régulation de la sécrétion de mélatonine

3.2.1. Au niveau de la glande pinéale

La glande pinéale est le principal lieu de synthèse de la MT. Aussi une pinéalectomie chez l'animal (Lewy et coll., 1980) comme chez l'homme abolit le taux nocturne de MT (Kenneaway et coll., 1979). Au niveau de la glande pinéale, la sécrétion de la mélatonine est sous un double contrôle: neuronal et humoral.

Contrôle neuronal

La quantité de MT produite dans la glande pinéale est contrôlée par l'activité enzymatique de la NAT. Selon plusieurs études, l'activité de cette enzyme augmente de 2 à 100 fois plus dans la glande pinéale durant la nuit (Rudeen et coll., 1975; Klein et coll., 1979_b). Son activation est induite par une augmentation d'AMPc jouant le rôle de second messenger (Reiter, 1991_a). La production de ce dernier dépend de l'activation de récepteurs β localisés dans la membrane cellulaire du pinéalocyte (Pangerl et coll., 1990). Le ligand de ce type de récepteur est la noradrénaline, neurotransmetteur catécholaminergique libéré par les neurones sympathiques postganglionnaires liés à cette glande (Reiter, 1996).

Contrôle humoral

La libération de noradrénaline dans la synapse sympatho-pinéalocytaire induit la sécrétion de prostaglandine E₂ dont le rôle est de moduler la transmission du message chimique en agissant sur le système adénylate-cyclase-AMP-cyclique post-synaptique de façon à moduler la libération de la MT (Ritta et Cardinali, 1980; Cardinali et Ritta, 1983).

3.2.2. Au niveau de la rétine

L'obscurité totale expérimentale chez l'animal (Goldman et Darrow, 1983), ou suite à une cécité totale et ancienne chez l'homme (Smith et coll., 1981) perturbe les biorythmes. Une exposition constante à la lumière inhibe la synthèse de la MT (Goldman et darrow, 1983). Par ailleurs un bref flash lumineux durant la nuit inhibe immédiatement l'activité de la N-acétyl-transférase épiphysaire. Une brusque inversion de phase lumineuse expérimentale (Lynch et coll., 1978) ou imposée par un décalage horaire (Fèvre-Montagne et coll., 1978) perturbe également les biorythmes, qui se rephasent en une dizaine de jours. Expérimentalement chez le rat, il est démontré que l'heure du pic nocturne de la MT dépend de la durée de la période d'adaptation (HO et coll., 1984).

3.2.3. Au niveau central

La persistance du rythme circadien de la MT en cas de cécité récente chez l'homme ou l'obscurité totale durant toute la journée chez l'animal de laboratoire suggère que ce biorythme est contrôlé par d'autres paramètres environnementaux tel que le bruit ou les odeurs. Par ailleurs, il a été démontré l'existence de voies nerveuses extrasympathiques entre le SNC et la glande pinéale, et l'influence de facteurs sensoriels non visuels (bruits, odeurs, stress) sur l'activité épiphysaire. De plus, le noyau suprachiasmatique de l'hypothalamus, considéré comme le "pacemaker" central de l'activité circadienne, pourrait intégrer les informations sensorielles (visuelles et autres) et ainsi moduler la fonction épiphysaire (More et Klein, 1974).

4. Rôles de la glande pinéale et de la mélatonine

Un certain nombre de molécules, autres que la MT, (5-méthoxytryptophol, peptides, etc.) ont été mises en évidence dans la glande pinéale. Tant que leur rôle physiologique n'est pas prouvé, il est admis que la glande pinéale exerce son activité par l'intermédiaire de la MT. Donc, l'administration de MT simule l'action de la glande pinéale et à l'opposé, la pinéalectomie équivaut à la suppression du rythme de sécrétion de la MT.

A partir de l'abondante littérature relative à la fonction épiphysaire, il est établi que la glande pinéale participe au contrôle des fonctions endocriniennes (gonadique, cortico-surrénalienne, thyroïdienne, pancréatique) et des fonctions centrales (sommeil, activité locomotrice, émotion, rythmes biologiques).

4.1. Relation glande pinéale - fonctions endocriniennes

4.1.1. Fonction gonadique

La glande pinéale, par son rôle transcripteur de la photopériode, régule les cycles annuels de la reproduction en influençant la maturation de l'activité des gonades par l'intermédiaire de la MT (Reiter, 1980). Celle-ci pourrait agir soit directement sur les gonades (Alonso et coll., 1978) par l'intermédiaire de récepteurs (Cohen et coll., 1978), soit au niveau hypothalamique (Léonardelli et coll., 1978).

4.1.2. Fonction cortico-surrénalienne

L'effet anticorticotrope de la MT observé chez l'animal, (Johnson, 1982) et l'association des troubles des rythmes de cortisol et de la MT observée chez l'homme dans les syndromes dépressifs (Beck-Friis et coll., 1985) et de Cushing (Wetterberg, 1983) suggèrent une liaison privilégiée entre la glande pinéale et l'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien.

4.1.3. Fonction thyroïdienne

Bien que de nombreuses études aient donné des résultats contradictoires, il semble que la glande pinéale contrôle partiellement la fonction thyroïdienne par une action inhibitrice au niveau de l'hypothalamus (Niles et coll., 1979_a; Bramer et coll., 1979).

4.1.4. Fonction pancréatique

"*In vitro*" il a été démontré que la MT peut inhiber la sécrétion d'insuline par les îlots pancréatiques de Langerhans (Bailey et coll., 1974). Ces auteurs suggèrent que la MT puisse agir sur les mécanismes monoaminergiques de régulation de la sécrétion insulinaire.

4.2. Relation glande pinéale - système nerveux central

4.2.1. Epilepsie

Les études de l'effet stabilisateur de l'excitabilité neuronale de la glande pinéale et par conséquent son rôle possible dans l'épilepsie ont donné lieu à des résultats discordants. L'utilisation des principaux tests pharmacologiques de screening des molécules antiépileptiques prouve l'activité anticonvulsivante de la MT. Cependant Sugden (1983) suggère que cette activité n'est pas spécifique à la MT. D'autre part, la pinéalectomie chez le rat n'entraîne que de rares décharges de pointes-ondes, les premiers jours suivant l'intervention, sans manifestations cliniques (Mouret et coll., 1974).

4.2.2. Sommeil

L'effet hypnotique-sédatif de la MT a été démontré aussi bien chez l'animal (Sugden, 1983) que chez l'homme (Cramer et coll., 1974, 1976). Par ailleurs, il apparaît que la glande pinéale joue un rôle important dans l'organisation nyctémérale et circadienne du sommeil paradoxal, ainsi que dans son couplage avec le sommeil lent (Mouret et coll., 1974).

4.2.3. Activité locomotrice

L'activité locomotrice circadienne, augmentée après pinéalectomie (Karpanen et coll., 1973; Hata et Kita, 1978) est synchronisée par la MT (Redman et coll., 1983). Cette action est médiée par le noyau suprachiasmique (Cassone et coll., 1986). Le comportement exploratoire est amplifié par l'administration de mélatonine suggérant un effet anxiolytique de la MT (Golus et King, 1977).

4.2.4. Action neurochimique

La pinéalectomie et l'administration de MT affecte certains processus neurochimiques.

Effet sur le taux cérébral des neuromédiateurs

Le "turn over" de la sérotonine est augmenté dans l'hypothalamus après l'administration de MT (Cassone et Coll., 1983). Les taux de catécholamines intracérébrales ne sont pas modifiés (Anton-Tay, 1968). La pinéalectomie supprime le rythme circadien de l'acide 5-hydroxy-3-indolacétique sans affecter celui de la sérotonine (Cassone et coll., 1983).

Effet sur la capture et la libération des neuromédiateurs

Des résultats discordants ont été obtenus selon que les études ont été effectuées "*in vitro*" (Cardinali et coll., 1975_a) ou "*in vivo*" (Cardinali, 1975_a). Cependant il apparaît que l'administration de MT augmente le "turn-over" de la sérotonine.

Par ailleurs, des travaux ont montré que la MT inhibe la libération de dopamine par l'hypothalamus par un mécanisme calcium dépendant (Zisapel et coll., 1982; Zisapel et Laudon, 1983).

Effet sur les microtubules et le transport axonal

La MT présente un effet inhibiteur de la biosynthèse des microtubules et sur le transport axonal. (Cardinali et Freire, 1975_b)

Effet sur la synthèse protéique

Une suppression de la fonction épiphysaire (pinéalectomie, ou lumière constante) ou une stimulation de celle-ci (obscurité constante) stimule la synthèse protéique hypothalamique (Cardinali et coll., 1974).

4.3. Modes d'action de la mélatonine sur le système nerveux central

4.3.1. Mélatonine et barrière hémato-encéphalique

Injectée par voie intraveineuse, la MT traverse la barrière hémato-encéphalique par un mécanisme de transport insaturable (Pardridge et Mietus, 1980). Ce passage serait médié par des lipides et ne serait pas influencé par la fixation de la MT aux protéines plasmatiques. La MT se distribue dans le tissu cérébral directement à partir du sang ou indirectement après passage dans le liquide céphalo-rachidien. Elle peut agir par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques et/ou en interférant dans le fonctionnement d'autres systèmes (neuromédiateurs, synthèse protéique etc.).

4.3.2. Les récepteurs de la mélatonine

Des sites de liaisons membranaires à haute affinité ont été isolés dans l'hypothalamus médio-basal, les cortex occipital et cérébelleux (Cardinali et Coll., 1979), la glande pinéale (Vacas et Cardinali, 1980). Des sites de fixation cytosoliques ont également été mis en évidence au niveau de l'hypothalamus, de l'hippocampe et du striatum (Niles et Coll., 1979_b). Cependant, ces résultats sont controversés car ils n'ont pu être retrouvés du fait de problèmes de stabilité du traceur utilisé. L'utilisation d'un traceur marqué à l'iode 125 pourrait permettre l'étude des récepteurs cérébraux de la mélatonine et de leur distribution (Laudon et Zisapel 1986).

Certaines études ont pu mettre en évidence l'existence de récepteur spécifiques localisés au niveau nucléaire (Acuna-Castroviejo et Coll., 1994). Bien que de récentes études aient suggéré que la majorité des fonctions intracellulaires de la MT était probablement indépendante de la fixation de l'hormone à un récepteur (Benitz-King et Coll., 1993; Reiter et Coll., 1993), on ne peut exclure que les récepteurs nucléaires puissent participer aux effets protecteurs de la MT.

4.3.3. Mode d'action au niveau moléculaire

La glande pinéale pourrait jouer son rôle neuromodulateur et synchronisateur par l'intermédiaire de la MT qui modulerait la transmission nerveuse sérotoninergique (Cardinali et coll., 1975_a), dopamiergique (Zisapel et Laudon, 1983), GABAergique (Castroviego et coll., 1986; Lowenstein et coll., 1980), la synthèse et le transport axonal des protéines (Cardinali et coll., 1974; Cardinali et Freire, 1975_b).

Par ailleurs, une hypothèse a été émise selon laquelle l'activité épiphysaire pourrait s'autoréguler grâce à la MT et affecter le fonctionnement d'autres organes par l'intermédiaire d'autres hormones telle que les peptides (Vriend, 1983).

4.4. Conclusion

Le rôle de la glande pinéale, médié par sa principale hormone, la MT, est encore obscure. Si le contrôle de la sécrétion épiphysaire de MT par les structures nerveuses supérieures est partiellement connu, les cibles centrales et périphériques de la MT et par conséquent son rôle physiologique, sont encore hypothétiques. Cependant, il paraît admis que la glande pinéale est un synchroniseur des activités rythmiques comme peuvent l'illustrer certaines pathologies humaines.

Depuis le début des années 90, il fut mis en évidence que la MT était un piègeur de radicaux libres très efficace et établi de manière générale qu'elle constituait un antioxydant à part entière.

5. Mise en évidence du pouvoir antioxydant de la mélatonine

La MT a été récemment présentée dans différentes études "*in vitro*" comme étant un potentiel piègeur du très toxique radical hydroxyle OH° (Reiter et coll., 1996). De plus, des mesures indirectes de son activité antioxydante chez les animaux indiquent des effets similaires "*in vivo*". Le thème de cette partie est de résumer les données relatives à la découverte de cette nouvelle fonction antioxydante associée à certains indoles.

5.1. Études "*in vitro*" utilisant un système générateur de radicaux libres

L'une des premières études "*in vitro*" s'intéressant au pouvoir antioxydant de la MT montra que cette dernière présentait un effet antioxydant dose-dépendant vis-à-vis d'un système exposé à la lumière utilisant un générateur de radicaux libres (H_2O_2) et une substance chémoluminescente, le luminol (Ianas et coll., 1991). Le milieu réactionnel contenant une gamme croissante de MT était exposé à la lumière. Le luminol plus ou moins oxydé en fonction de la dose de MT permettait de faire une mesure indirecte du pouvoir antioxydant.

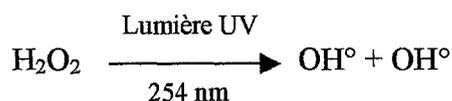
Dans un second temps, le même montage fut utilisé avec du tryptophane (Ianas et coll., 1991). Cet acide aminé essentiel était connu pour sa capacité à accepter les radicaux libres. Les résultats de cette deuxième expérience montrèrent une action antioxydante similaire à celle de la MT. Cette observation permettait de laisser penser que les propriétés antioxydantes des deux molécules testées résidaient dans la structure commune du noyau indolique.

Une étape supplémentaire fut franchie lors de la vérification du pouvoir antioxydant de la MT vis-à-vis du très réactif et toxique radical hydroxyle OH° (Tan et Coll., 1993_a). En effet, comparée à la précédente étude, celle-ci s'intéressait à un radical unique et défini. Ceci fut possible par l'association de deux techniques de pointe qui permettaient de résoudre deux problèmes rencontrés jusqu'alors dans l'étude des radicaux libres:

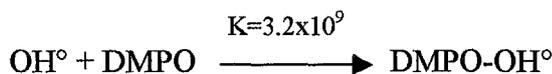
- la très courte durée de vie des radicaux libres,
- la sélectivité du radical étudié parmi tous les radicaux libres susceptibles d'exister dans la chaîne radicalaire.

La résonance paramagnétique électronique ou RPE permet la mise en évidence des molécules paramagnétiques tels que les radicaux libres, mais la haute réactivité de ceux-ci et donc leur faible durée de vie les rendent difficilement détectables. La technique du piégeage de radicaux libres (spin-trapping) apparaît par son principe une méthode de choix répondant à ce problème. En effet, les radicaux libres sont captés par d'autres molécules (spin-trap) et transformés en espèces paramagnétiques beaucoup plus stables et donc facilement détectables. De plus, le spin-trap étant spécifique du radical étudié, la qualité de la mesure indirecte s'en trouve grandement améliorée lors de leur séparation du milieu par HPLC (Chromatographie Liquide Haute Performance). (Cf: Chapitre II: 3. Détection de la surproduction des RLO).

Le model utilisé pour produire le radical hydroxyle était la simple photolyse du peroxyde d'hydrogène H₂O₂.



Le spin-trap utilisé était du 5,5-diméthylpyrroline-N-oxide ou (DMPO).



L'adduit ainsi formé (DMPO-OH[°]) était séparé et identifié par HPLC équipé d'un détecteur électrochimique. Une analyse finale était réalisée par RPE (Fig 12).

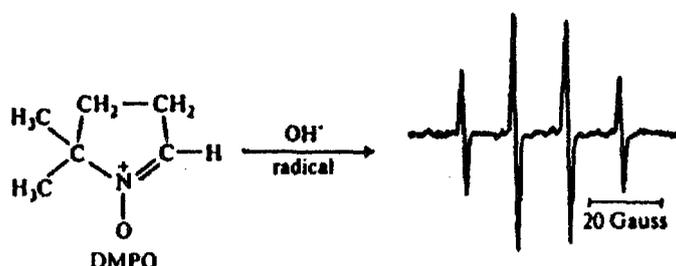


Fig 12: L'agent de spin-trapping, 5,5-diméthylpyrroline-N-oxide (DMPO) forme un adduit relativement stable avec le radical hydroxyl OH[°]. Cet adduit a un spectre très caractéristique lorsqu'il est analysé par RPE. Dans cette figure, le spectre (1:2:2:1) est caractéristique de l'adduit DMPO-OH[°]. (Extrait de Tan et coll., 1993_a).

L'étude compara les antioxydants le plus puissant connus de l'époque (glutathion et mannitol) à la MT. Le paramètre mesuré étant le nombre d'adduits détectés, les résultats montrèrent que pour un effet antioxydant équivalent à la MT, il fallait 5 fois plus de glutathion et près de 15 fois plus de mannitol (Fig 13).

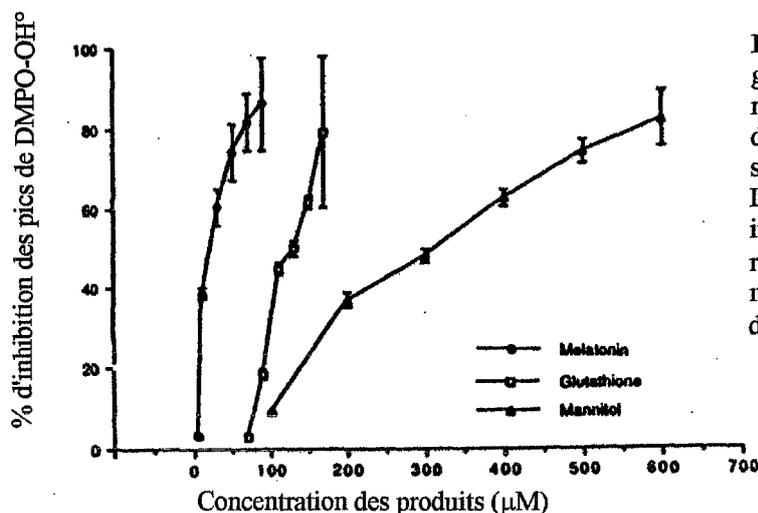


Fig 13: Efficacités relatives de la mélatonine, du glutathion et du mannitol comme piègeur du radical OH[°] mis en évidence par le % d'inhibition de l'adduit DMPO-OH[°] dans un système "in vitro".

Les concentrations auxquelles chaque composé inhibe 50% des OH[°] produits ou IC₅₀ sont respectivement de 21, 123 et 283 µM pour la mélatonine, le glutathion et le mannitol. (Extrait de Tan et coll., 1993_a).

Dans un second temps, profitant d'un modèle et d'une technique de mesure indirecte sensiblement performants, les chercheurs voulurent évaluer le pouvoir antioxydant des précurseurs et métabolites de la MT qui comportaient tous une structure indolique. Les résultats montrèrent que la MT était le composé qui avait le plus grand pouvoir oxydant. Les autres molécules étudiées l'étaient beaucoup

moins et certaines ne présentaient aucun effet (Fig 14). Ceci laissa penser que le pouvoir oxydant de la MT résidait certes dans la structure indolique mais majoritairement grâce au méthyle positionné sur le C₅ du cycle (Fig 15). Les auteurs venaient de mettre en évidence la molécule douée du pouvoir antioxydant non enzymatique "in vitro" le plus efficace connu à ce jour.

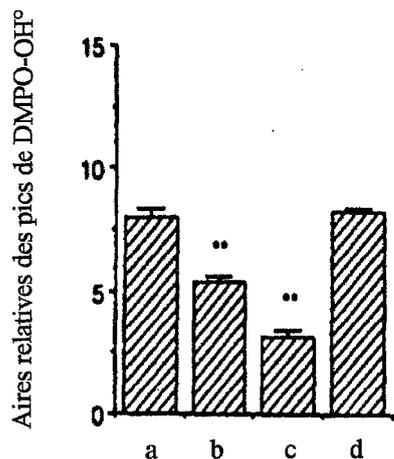


Fig 14: La mélatonine est le composé qui présente le pouvoir antioxydant le plus efficace. (a) contrôle (absence de composé), (b), 5-méthoxytryptamine, (c) Mélatonine, (d) N-acéthylsérotonine. **p<0.001 versus contrôle. (Extrait de Tan et coll., 1993_a).

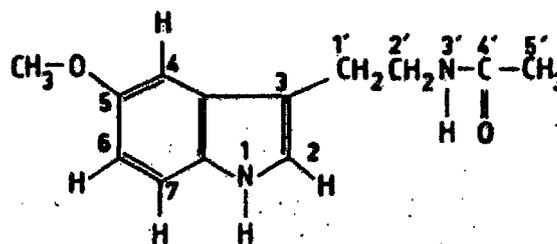


Fig 15: Structure de la MT. Tout changement structural réduit ou annule sa capacité à piéger le radical hydroxyl OH°.

5.2. Études "in vitro" utilisant du matériel biologique

Une étude simple dans son principe mais certainement pas dans sa réalisation (Chen et coll., 1993) montra cette fois-ci sur du matériel biologique, le pouvoir antioxydant de la MT vis-à-vis des espèces réactives de l'oxygène de manière générale. Le principe en était le suivant. Des données de précédentes études montraient que la pompe calcique ATP-dépendante localisée sur des sarcolèmes myocardiques purifiés de rat voyait son activité diminuée voire annulée lors que le sarcolème était incubé dans un milieu riche en radicaux libres (Kaneko et coll., 1989_a, 1989_b). Les auteurs réalisèrent de nouveau cette expérience dans un milieu identique auquel ils ajoutèrent de la MT. Les résultats montrèrent que l'activité enzymatique n'était plus réduite par les ERO et dépendait de la concentration en MT dans le milieu (Fig 16). Les chercheurs expliquèrent ce résultat par le rôle probable de piègeur de radicaux libres de la MT.

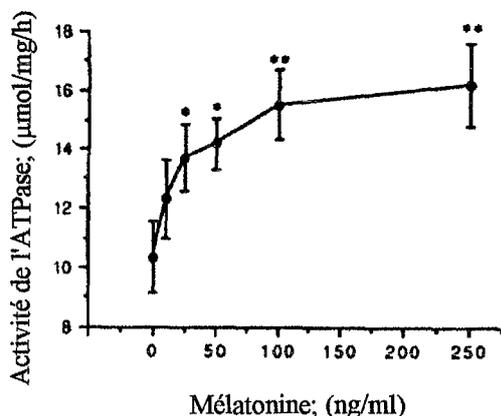


Figure 16: Activité de la [Ca²⁺-Mg²⁺] ATPase cardiaque en fonction de la mélatonine dans un milieu riche en ERO. Les sarcolèmes étaient incubés avec différentes concentrations de mélatonine avant lecture de l'activité. *p<0.05 et **p<0.01 versus contrôle (absence de mélatonine) (Extrait de Chen et coll., 1993).

En ce qui concerne la peroxydation lipidique par les radicaux libres, une étude s'y intéressa en employant de l'acide thiobarbiturique ou TBA (Pierrifiche et coll., 1993). Ce dernier est classiquement utilisé comme oxydant dans l'étude de la peroxydation lipidique (Rios et Santamaria, 1991). Le matériel biologique était quant à lui constitué d'homogénats de cerveau de souris. L'étude compara l'efficacité antioxydante de la MT à son précurseur, le tryptophane et à son principal métabolite, la 6-hydroxymélatonine, obtenu après métabolisation hépatique. Les résultats (Fig 17) montrèrent que la MT avait une fois de plus une activité antioxydante, mais cette dernière était bien plus faible que son précurseur ou son métabolite contrairement à ce que laissait croire l'étude de Tan et coll., (1993_a). Depuis, une étude s'intéressant à la peroxydation lipidique induite par H₂O₂ sur des homogénats de différentes régions du cerveau de rat montra par la mesure de deux des principaux produits de la peroxydation lipidique, à savoir le MDA (malonyldialdéhyde) et le 4-HDA (4-hydroxyalkenals) que la MT préservait son pouvoir protecteur vis-à-vis de l'oxydation de façon similaire sur toutes les régions du cerveau étudiées (Sewerynek et coll., 1995).

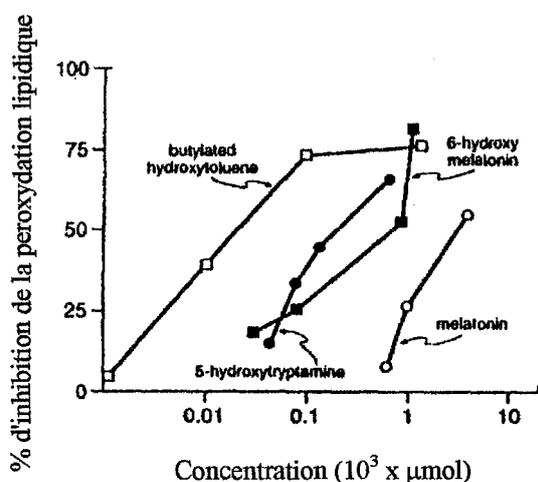


Figure 17: Pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique par le TBA dans des homogénats de cerveau des souris pour chacun des quatre composés étudiés. Sérotonine (5-hydroxytryptamine), 6-hydroxymélatonine et mélatonine qui étaient comparé au butylate d'hydroxytoluène, antioxydant synthétique servant de référence standart. (Extrait de Pierrifiche et coll., 1993).

Enfin, une étude qui s'intéressait au mécanisme d'action de la MT sur des cellules cancéreuses extraites de tumeurs mammaires humaines, a mis en évidence la probable pluralité de mécanismes d'action de la MT pour exercer son pouvoir antioxydant (Blask et Wilson, 1994). Ainsi cette expérience laisse penser que la MT avait une action antioxydante indirecte en favorisant l'expression de l'enzyme qui régulaient la synthèse du glutathion (la γ glutamylcystéine synthétase). La MT ne serait donc pas uniquement un piègeur de radicaux libres mais pourrait faciliter la production d'une seconde molécule connue pour prévenir les dommages intracellulaires des ERO.

5.3. Études "in vivo"

L'une des premières études "in vivo" qui s'intéressa à l'interaction entre la MT et les espèces radicalaires fut réalisée par Chen et coll., (1993). Ceux-ci décidèrent de mesurer l'activité enzymatique de la $[Ca^{2+}-Mg^{2+}]$ ATPase sur des cardiomyocytes de rat pendant 24 heures. Il était établi que dans des conditions de physiologie saine, l'activité de cette enzyme était très élevée pendant toute la période nocturne par rapport à la période diurne. Si les animaux subissaient une pinéalectomie, le rythme d'activité enzymatique nyctéméral disparaissait. Ce résultat impliquait que le rythme circadien de la principale hormone de la glande pinéale, la MT, contrôlait le cycle d'activité de la $[Ca^{2+}-Mg^{2+}]$ ATPase. De plus, la pompe à Ca^{2+} étant sensible à l'état red-ox de la cellule (Kaneko et coll., 1989_a, 1989_b), les auteurs conclurent que la MT pouvait exercer un pouvoir antioxydant aussi bien de manière directe qu'indirecte. Ces résultats précipitèrent les études énumérées précédemment ou ces mêmes auteurs démontraient "in vitro" que l'incubation de sarcolème, préalablement purifié, avec de la MT augmentait l'activité de la pompe à Ca^{2+} ce qui les entraîna à tester le pouvoir de piègeur de la MT vis-à-vis du radical hydroxyle OH^\bullet (Chen et coll., 1993_a; Tan et coll., 1993).

A la suite de ces différentes observations, d'autres expérimentations confirmèrent que la MT limitait les dommages des radicaux libres sur l'organisme. Ainsi, Tan et coll. (1993_b) mirent en évidence cette propriété en traitant deux groupes de rats avec du safrole connu pour ses propriétés carcinogènes. Un des deux groupes recevait en plus une administration de MT, l'autre constituait le groupe témoin. Les agents chimiques carcinogènes comme le safrole induisent la production d'intermédiaires électrophiles à l'origine de dommages cellulaires et notamment macromoléculaires incluant la double chaîne d'ADN (Boberg et Coll., 1983). Dans l'étude en question, les dommages occasionnés par le safrole sur l'ADN, et plus exactement la formation d'adduits étaient quantifiés sur les foies des animaux par l'intermédiaire du phosphore 32 (P^{32}), technique décrite par Reddy et Randrath (1986). Ainsi, 24 heures après l'administration du safrole à 300 mg/kg, les adduits étaient dénombrés sur les foies des deux groupes de rats. Les résultats montrèrent une réduction dose-dépendante des dommages par la MT et ce à près de 95% par rapport au groupe témoin (Fig 18).

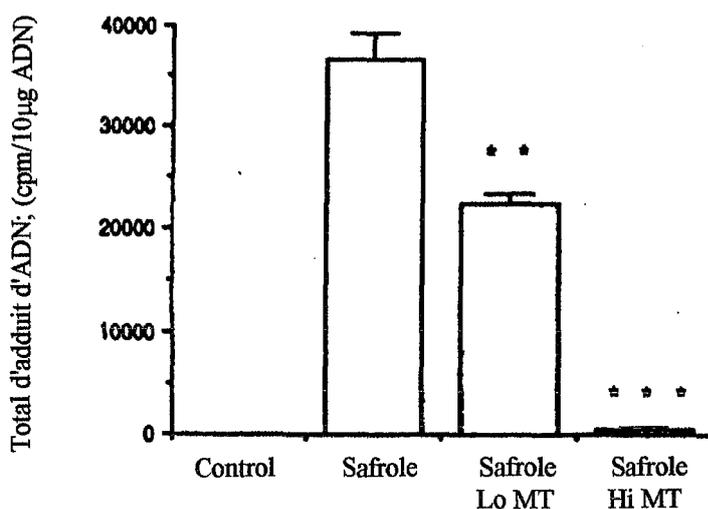


Figure 18: Le total des adduits d'ADN représente les dommages de l'ADN dans le foie des rats traités par le safrole (300 mg/kg) cotraités ou non à la mélatonine. La mélatonine était donnée soit à une faible dose (Lo MT) correspondant à 0,2 mg/kg soit à une dose élevée (Hi MT) correspondant à 0,4 mg/kg. ** $p < 0.001$ et *** $p < 0.001$ versus safrole seul. (Extrait de Tan et coll., 1993_b)

La MT prévient très clairement et à un large degré les dommages nucléaires induit par le saffrole et constitue la molécule endogène la plus efficace connue lorsque l'animal est soumis à un tel agent carcinogène. Compte tenu des doses respectives de MT et de saffrole administrées dans cette étude, la MT présente une action pharmacologique. Sachant que la formation d'adduit est le point de départ de l'initiation du processus carcinogénique, il semble que la MT pourrait jouer un rôle protecteur significatif lors de la phase d'initiation de cancer dû à des agents carcinogènes par l'inhibition de la production de métabolites électrophiles (Reiter et Coll., 1994_a, 1994_b).

Afin d'explorer l'efficacité des concentrations physiologiques de la MT, les mêmes auteurs entamèrent une seconde série d'études dans les-quelles ils utilisaient uniquement la production endogène de l'hormone (Tan et Coll., 1994). Ils décidèrent d'administrer du saffrole à 100 mg/kg à deux groupes de rats. Pour le premier groupe, l'injection était effectuée pendant une période diurne alors que le taux endogène de MT était au plus bas. Pour le deuxième groupe, l'injection était réalisée lors d'une période nocturne lorsque le taux endogène de MT était au plus haut. Huit heures après l'administration de l'agent carcinogène, les tissus hépatiques étaient prélevés et le nombre d'adduit était estimé par du P³². La même technique fut employée sur deux groupes d'animaux ayant subi une pinéalectomie. L'un des groupes recevait une administration de MT exogène alors que l'autre recevait du sérum physiologique. Les résultats montrèrent que le nombre d'adduit reflétant les altérations de l'ADN induit par le saffrole était significativement plus faible pour le groupe traité pendant la période nocturne par rapport à celui traité pendant la période diurne. Les auteurs conclurent que cette différence pouvait trouver son explication dans le cycle nictéméral de production de la MT par la glande pinéale (Fig 19). Ces résultats renforçaient l'idée selon laquelle, la nuit, les taux de MT endogènes étant à leur paroxysme, l'ADN nucléaire était significativement plus protégé des agents carcinogènes toxiques qui entraînent des dommages macromoléculaires via la production de RLO. De plus, la dose de saffrole utilisée dans cette étude est relativement plus importante (100 mg/kg) que celle pouvant être rencontrée dans des conditions normales d'exposition environnementale. Ceci implique que la MT peut jouer un rôle primordial dans la protection de l'ADN nucléaire soumis à un stress oxydatif quotidien et donc présenter une action physiologique.

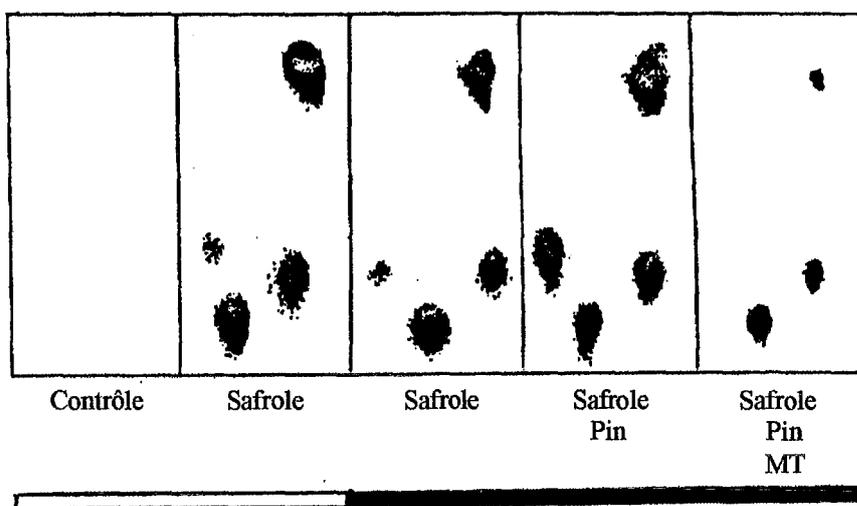


Figure 19: Les adduits d'ADN représentent les dommages subis par l'ADN dans le foies des rats traités par le saffrole soit pendant la période diurne (barre horizontale claire) soit la nuit (barre horizontale noire). Par comparaison des tailles des spots représentant les adduits, il est montré que le saffrole le jour (quand la mélatonine est à son minimum) cause plus de dommage sur l'ADN que lorsque l'agent carcinogène est administré la nuit (quand la mélatonine est à son maximum). La pinéalectomie (Pin) augmente la quantité de dommage subit par l'ADN alors que l'administration conjointe de mélatonine (MT) la diminue. Le groupe contrôle qui est constitué d'animaux ne recevant pas l'agent carcinogène ne présente pas de dommages nucléaires. (Extrait de Tan et coll., 1994).

Bien que la MT puisse réduire de manière évidente les altérations de l'ADN résultant d'un traitement par des agents carcinogènes et ce aussi bien à des taux pharmacologiques que physiologiques, ces résultats ne traduisent que de manière indirecte la capacité antioxydante de cet indole. Comme il a été dit plus haut, les altérations de l'ADN peuvent éventuellement induire la phase d'initiation du cancer. Dans cette optique, les résultats de Tan et coll., (1993, 1994) sont complémentaires de ceux de Malaisse (1982) qui démontra une diminution du développement des tumeurs de la glande mammaire chez des rats soumis à un agent carcinogène quand ces derniers avaient reçu de la MT lors de la phase d'initiation du cancer. Cependant, aucun des résultats résumés ci-dessus n'a pu permettre d'écarter la possibilité qu'un métabolite de la MT, plutôt que la MT elle-même, pouvait exercer la protection antioxydante observée.

Outre la protection de l'ADN nucléaire lors de phénomènes oxydatifs, la MT présente également la propriété de limiter la peroxydation lipidique au niveau des membranes cellulaires. Cette fonction fut mise en évidence par des études utilisant de l'alloxan comme inducteur de peroxydation lipidique, dont les effets étaient inhibés par l'adjonction de MT.

Dans la première de ces études, le monohydrate d'alloxan était administré par voie intraveineuse à raison de 40 mg/kg à des souris de sexe mâle qui avaient préalablement été prétraitées par de la MT à raison de 100 ou 450 mg/kg, et ce par voie intra péritonéale 30 minutes avant l'administration de l'alloxan (Pierrefiche et coll., 1993). L'alloxan est particulièrement toxique vis-à-vis des cellules β pancréatiques responsables de la sécrétion d'insuline. En effet, on observe une destruction des membranes cellulaires suite à l'oxydation par différentes espèces radicalaires produites par l'alloxane comme l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène ou le radical hydroxyle (Heikkila, 1976; Oberley, 1988). Durant les 48 heures qui suivirent l'administration de l'alloxan, les taux de glucose libre dans le sang (soit la glycémie), étaient trois fois plus élevés dans le groupe ayant reçu de l'alloxan par rapport au groupe témoin qui avait reçu une injection de sérum physiologique. Les doses de MT s'étalant de 100 à 450 mg/kg réduisaient le taux de la glycémie de façon dose dépendante (Tab II) avec pour la plus forte des doses un retour à une glycémie comparable à celle du groupe témoin. Ces résultats démontraient que la MT protège la membrane cellulaire de l'oxydation induite par l'alloxan. Des résultats similaires "in vitro" avaient été observés avec d'autres substances connues pour leur capacité à piéger de radicaux libres comme l'acide ascorbique, l' α -tocophérol (vit E) ou le glutathion (Pierrefiche et coll., 1991).

Tableau II: Glycémie 48 heures après l'administration d'alloxan* avec ou sans prétraitement à la mélatonine**. *40 mg/kg iv. **100 à 450 mg/kg ip.

Prétraitement	Traitement	Glucose sanguin (mmol/litre)
Sérum physiologique	Sérum physiologique	10.2 \pm 0.30
Sérum physiologique	Alloxan	34.2 \pm 0.57
Mélatonine (100 mg/kg)	Alloxan	29.0 \pm 1.43
Mélatonine (200 mg/kg)	Alloxan	18.3 \pm 3.34
Mélatonine (300 mg/kg)	Alloxan	15.6 \pm 2.46
Mélatonine (450 mg/kg)	Alloxan	14.6 \pm 1.70

Le prétraitement à la mélatonine réduit la glycémie de façon dose-dépendante. Ceci indique que la mélatonine limite la destruction des cellules β -pancréatiques. (Extrait de Pierrefiche et coll 1993).

Dans la suite de leur étude, les auteurs décidèrent d'estimer en plus du glucose, les taux de glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PD) dans des groupes d'animaux témoin et traité à 450 mg/kg de MT. La MT n'avait aucune action directe sur les taux de glucose mais la présence de cette dernière stimulait significativement l'activité enzymatique de la G6PD au niveau hépatique. Les auteurs émirent l'hypothèse que cette stimulation enzymatique pouvait également contribuer à diminuer les dommages des attaques radicalaires au niveau hépatique.

Chen et coll., (1994) utilisèrent également l'alloxan afin d'induire la production de RLO au niveau des membranes cellulaires, mais ils choisirent un autre critère d'observation afin d'évaluer l'action bénéfique de la MT sur les dommages provoqués. Dans leur étude, les rats recevaient une unique injection d'alloxan à raison de 60 mg/kg et étaient prétraités ou non avec de la MT à raison de: 1, 5 ou 10 mg/kg. Quarante huit heures plus tard, l'activité enzymatique de deux enzymes, la $[Ca^{2+}-Mg^{2+}]$ ATPase et la Mg^{2+} ATPase étaient estimées au niveau des membranes du sarcolème. Une partie des résultats illustrés (Fig 20) montre que la MT protège l'activité enzymatique de la première enzyme de façon dose-dépendante. De plus, comparé au groupe témoin, la MT ne présente pas d'effet basal sur l'activité enzymatique ce qui permet de situer son mode d'action véritablement au niveau du mécanisme de production et de prolifération des espèces réactives. En ce qui concerne l'activité de la deuxième enzyme, les résultats bénéfiques de la MT sont en partie retrouvés mais avec des doses bien plus élevées que pour la première. Cette différence de résultat fut expliquée par les auteurs comme étant une variation de la capacité antioxydante de la MT via l'un de ses métabolites bien que les expérimentateurs n'aient pu comme dans les autres études "in vivo" démontrer l'existence et l'action concomitante de ces derniers.

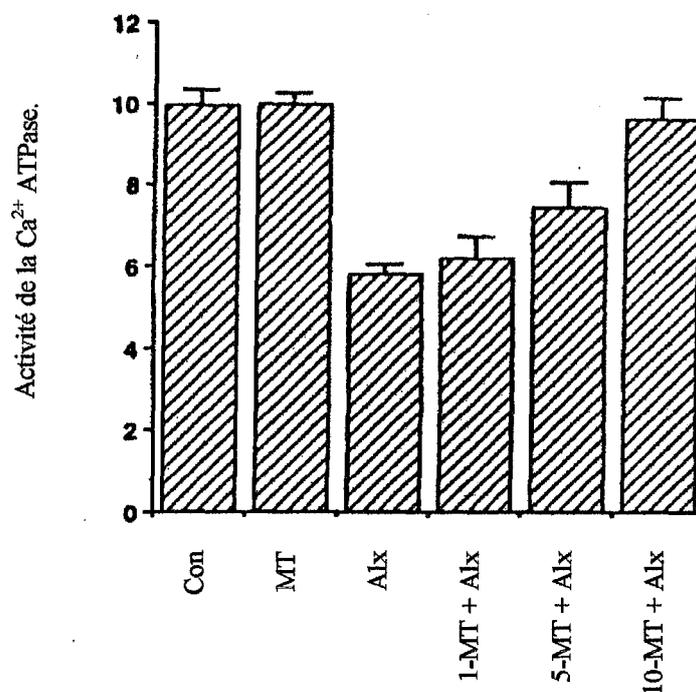


Figure 20: Effet inhibiteur de l'alloxan sur l'activité de la Ca^{2+} ATPase chez le rat et effet réversible dose-dépendant par la mélatonine. La mélatonine était donnée à des doses de 1, 5 ou 10 mg/kg. Comparé au contrôle (sans traitement), la mélatonine par elle-même n'a pas d'effet basal sur l'activité de la Ca^{2+} ATPase. (Extrait de Chen et coll., 1994).

Plusieurs autres résultats suggèrent que la MT diminue le stress oxydatif induit par les RLO. Ainsi Blinkenstaff et coll., (1994) comparèrent différents homologues structuraux de la MT à elle-même en tant qu'agents potentiellement radioprotecteurs. Des huit homologues structuraux testés, l'hexanoïc amide 5 et l'octanoïc amide 6 présentèrent un pouvoir protecteur particulièrement élevé vis-à-vis des irradiations appliquées à des souris. Cette étude prenait comme critère d'observation la survie à 30 jours. Bien que la MT soit administrée 30 minutes avant l'irradiation, à une dose élevée de 250 mg/kg, le pourcentage de survie à 30 jours n'était que de 43% contre près de 95% pour les deux homologues cités plus haut. Les auteurs émirent l'hypothèse que les composés pouvaient avoir interagi de manière spécifique avec un récepteur, leur permettant d'augmenter ainsi leur effet protecteur. Cependant si on prend en compte les résultats des études qui précèdent, mettant en évidence le rôle de piègeur du radical hydroxyle de la MT, sa propriété était également expliquée par le même phénomène d'action et présentait dans certaines études un résultat approchant les 75% de survie (Tan et coll., 1993_a).

En effet, il fut observé que 30 minutes après une administration de MT l'activité de la glutathion peroxydase était doublée au niveau cérébral (Reiter et coll., 1996). Cette enzyme étant capable de métaboliser les hydroperoxydes en général dont le peroxyde précurseur du OH° cette observation était d'autant plus importante que l'enzyme considérée constitue probablement l'une des premières défenses enzymatiques antioxydantes dans le cerveau (Raes et coll., 1987). Précédemment, les mêmes auteurs avaient prédit que la MT compte tenu de son potentiel antioxydant pouvait représenter un facteur important dans le retardement du vieillissement neurologique. Ils avaient également observé que l'administration de MT à des rats, deux semaines après leur naissance prévenait la formation de cataractes, normalement secondaire à l'inhibition de la γ glutamylcystéine synthétase, enzyme contrôlant la production de glutathion (Abe et coll., 1994). La cataracte étant une conséquence directe des dommages occasionnés par les radicaux libres, et le fait qu'elle soit prévenue par une administration de MT suggère fortement que cet indole et une partie de ses analogues présentent des propriétés antioxydantes directes ou non vis-à-vis du développement des ces radicaux libres.

5.4. Oxydation non enzymatique de la mélatonine

Les résultats impliquant le pouvoir potentiel de piègeur du radical OH° de la MT ont entraîné un regain d'intérêt concernant le mécanisme de dégradation non enzymatique de la neurohormone (Tan et coll., 1993_a). Ce regain d'intérêt trouve son origine dans le fait que les produits issus de la dégradation et plus particulièrement le [N¹-acetyl-N²-formyl-5-methoxykynuramine] ou AMFK et le [N¹-acetyl-5-methoxykynuramine] ou AMK présentent des activités biologiques (Hardeland et coll., 1993) et dans le fait que l'oxydation de la MT peut avoir une importance biologique pertinente depuis que l'on sait qu'elle peut l'être à la fois de manière enzymatique par la indoleamine 2,3-dioxygénase ou par certaines substances biologiques non enzymatiques comprenant notamment l'hème ou les protoporphirines. Comme il est dit plus haut, les produits de dégradation sont retrouvés à de fortes concentrations dans la glande de Harder (glande lacrymale accessoire) chez plusieurs espèces de mammifères et contiennent également des taux de MT élevés. Ainsi, la raison de la présence de la MT au niveau de ces glandes est probablement d'absorber l'excès de radicaux générés par les porphyrines.

Certains auteurs ont proposé que la dégradation non enzymatique de la MT par OH° au niveau intracellulaire implique un processus en deux étapes qui aboutirait à la formation de l'AMFK (Tan et coll., 1993_a) sous-produit de la MT retrouvé au niveau urinaire (Vakkuri et coll., 1987). Ainsi, quand la MT est confrontée au radical hydroxyle OH° , cette dernière lui arrache un électron pour

donner naissance au radical cation indoyl (Fig 21) qui réagit à son tour de manière directe sans catalyseur avec l'anion superoxyde afin de former l'AMFK. De cette manière la MT met fin à la réaction en chaîne de propagation des espèces radicalaires et point important, ne participe pas au cycle red-ox comme d'autres piègeurs tel que l' α -tocophérol, l'acide ascorbique ou le glutathion.

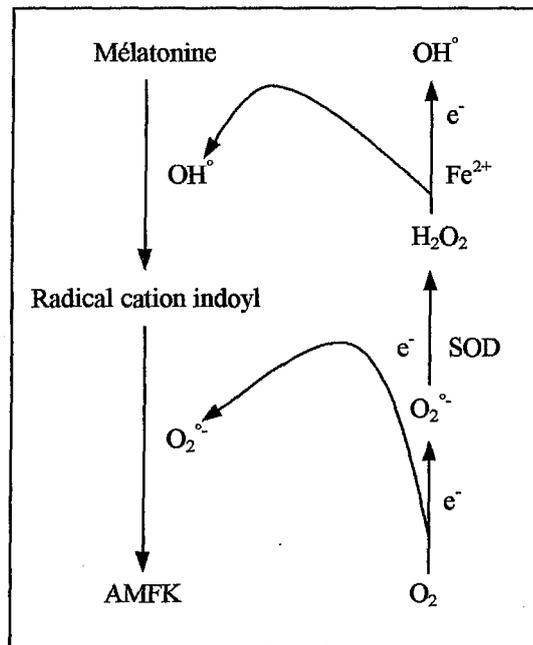


Figure 21: "Voie d'oxydation non enzymatique de la mélatonine".

Après avoir piégé le radical hydroxyle HO[°], la mélatonine est convertie en radical cation indoyl qui piège à son tour l'anion superoxyde afin de produire le métabolite urinaire AMFK.

Considérant l'extraordinaire potentiel pouvoir de piègeur vis-à-vis du OH[°] et du très grand nombre de substances toxiques identifiées plus haut, la MT doit être considérée comme un agent thérapeutique potentiellement très important d'autant plus que d'autres recherches ont révélé que des analogues structuraux possédaient un potentiel pouvoir antioxydant équivalent.

5.5. Conclusion

Que ce soit "*in vitro*" ou "*in vivo*", les études mettant en évidence les capacités antioxydantes de la MT ainsi que son rôle de piègeur des radicaux libres constituent depuis le début des années 1990 une littérature de plus en plus abondante. Néanmoins, la découverte de cette nouvelle fonction est d'un grand intérêt et représente une potentielle utilité thérapeutique. En effet, un grand nombre de pathologies peuvent être en partie la conséquence des dommages cellulaires induits par les radicaux libres. Ainsi, la MT par sa capacité à traverser toutes les barrières morphologiques afin d'entrer dans toutes les cellules est facilement administrable. De plus, avec aucun effet toxique rapporté à l'heure actuelle, la MT semble être un outil pharmacologique efficace dans la lutte contre les dommages tissulaires induits par les RLO.

Deuxième partie

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE:

INFLUENCE DE LA MÉLATONINE SUR LA TAILLE DE L'INFARCTUS MYOCARDIQUE LORS D'UN ÉPISODE D'ISCHÉMIE-REPERFUSION

Influence de la mélatonine sur la taille de l'infarctus myocardique lors d'un épisode d'ischémie-reperfusion

1. But de l'étude expérimentale réalisée

Compte tenu des données dans les chapitres précédents, il nous a paru intéressant d'évaluer les capacités antioxydantes de la mélatonine lors d'un stress oxydatif induit par un épisode d'ischémie-reperfusion myocardique à travers la mesure de la taille de l'infarctus afin de mettre en évidence son rôle cardioprotecteur.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel biologique

Les expériences ont été réalisées sur des rats mâles de souche Wistar (Iffa Credo, France) dont le poids corporel est compris entre 200 et 220g à leur livraison. Les animaux sont stockés à 5 par cage et gardés dans les conditions ambiantes de l'animalerie: cycle de lumière 12/12 (lumière à 7 heures), température 24°C. Les animaux reçoivent une nourriture commerciale et de l'eau à volonté. Les expériences ont été réalisées en période diurne entre 9h et 18 h de décembre à janvier sur les animaux ayant atteint un poids corporel compris entre 270 et 330g.

2.2. Pré-traitement à la mélatonine

Afin d'observer l'éventuel effet bénéfique de la MT lors d'un épisode d'ischémie-reperfusion les animaux reçoivent un prétraitement une demi-heure avant la préparation chirurgicale. Les animaux sont répartis en deux groupes. Le groupe MT subit un pré-traitement à la MT alors que le groupe C (contrôle) subit un prétraitement au sérum physiologique.

Concernant les animaux du groupe MT, ces derniers reçoivent une injection intrapéritonéale de MT à raison de 0,1 ml/100g à partir d'une solution aliquotée (1,5 ml) préalablement décongelée réalisée à partir d'une solution-mère de MT concentrée à 2 mg/ml. La raison d'un tel procédé trouve son origine dans le fait que la faible solubilité de la MT en milieu aqueux rend difficile un mode de conservation à température ambiante (cf Annexe I. Conservation d'une solution de MT à -80°C). Les animaux de ce groupe reçoivent donc 0,2 mg de MT pour 100 g de poids corporel.

Les animaux constituant le groupe contrôle reçoivent quant à eux une injection intrapéritonéale de sérum physiologique à raison de 0.1ml/100g.

2.3. Préparation chirurgicale, montage et paramètres enregistré.

Trente minutes après le préconditionnement, les animaux sont anesthésiés dans une cloche hermétique saturée en vapeurs d'éther. Ce mode d'anesthésie comparé à l'administration intraveineuse d'un anesthésique général présente l'avantage de ne pas avoir d'action pharmacologique sur les fonctions cardiaques et paramètres physiologiques mesurés ultérieurement. Les rats sont ensuite héparinés (Héparine Léo, 1500 UI/kg, IP) afin d'éviter toute formation de caillot sanguin intracoronaire lors du prélèvement. Le cœur est prélevé rapidement par section des gros vaisseaux après incision sous-costale et réclinaison sternale, puis il est immergé dans du liquide de perfusion à 4°C. Cette hypothermie entraîne un arrêt presque immédiat des battements cardiaques.

Le cœur est perfusé par voie aortique rétrograde, à pression constante, selon la technique initialement décrite par Langendorff (1895). Le cœur est relié par l'aorte à l'appareil de perfusion, constitué d'un réservoir de liquide relié à un piège à bulles ainsi qu'à une enceinte thermostatée permettant de maintenir le liquide perfusé à 37°C. La pression de perfusion est fixée à 100 cm d'eau

(soit 75 mmHg). Le milieu de perfusion est une solution modifiée de Krebs-Henseleit dont la composition et la réalisation sont expliquées en annexe (Annexe II).

Ainsi, rapidement afin d'éviter au maximum le stress lié à l'arrêt cardiaque, le cœur est fixé par l'aorte sur la canule de perfusion métallique à l'aide d'un fil chirurgical. Puis les robinets trois voies du montage sont actionnés de façon à perfuser le cœur. Le cœur est placé au centre d'une chambre thermostatée près de laquelle une lampe de forte intensité calorifique est placée afin de maintenir une température ambiante supérieure à celle de la pièce proche de 37°C.

Après une étape de nettoyage (extraction des poumons et des tissus adipeux), le débit coronaire (en ml/min) est mesuré par recueil de l'effluent coronaire. La fréquence cardiaque est dérivée d'un électrogramme bipolaire enregistré à l'aide de deux électrodes mises en contact: l'une avec le cœur au niveau de l'apex, l'autre avec la canule métallique de perfusion. La pression ventriculaire gauche systolique est obtenue par introduction d'un ballonnet en latex (Hugo-Sacks, modèle N°6) dans le ventricule gauche (via l'incision de l'oreillette gauche), relié à un capteur de pression. Le volume du ballonnet rempli d'eau est ajusté afin d'obtenir une pression diastolique comprise entre 5 et 10 mmHg. Un physiographe permet d'enregistrer en continu ces différents paramètres.

La ligature est effectuée à l'origine anatomique de l'artère coronaire gauche, autour d'un cathéter souple permettant de détacher le fil sans léser le myocarde lors de la reperfusion.

2.4. Protocole expérimental

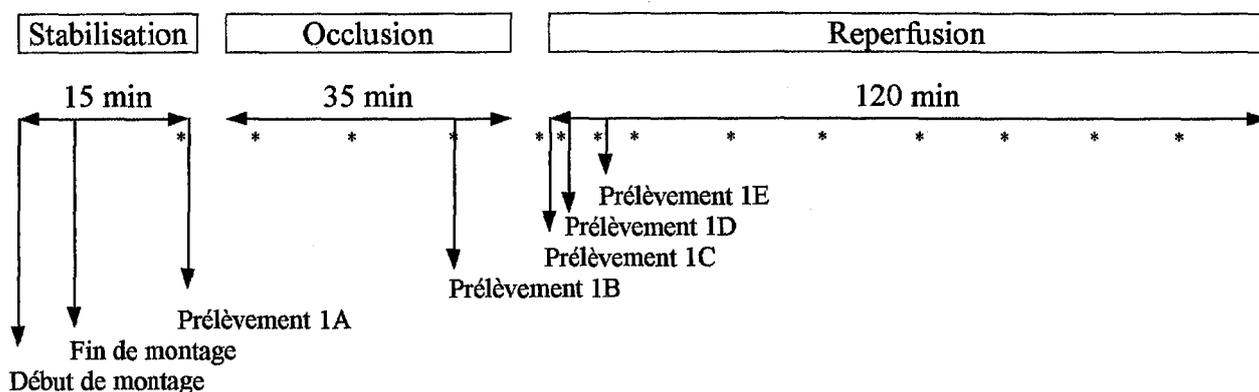


Figure 22: Protocole expérimental.

Une période de stabilisation de 15 minutes commence dès le montage du cœur selon la technique de Langendorff. A la fin de cette dernière, un premier prélèvement (Stab 15) de l'effluent coronaire est réalisé. Le deuxième prélèvement (Occ 30) est réalisé 5 minutes avant la fin de la phase d'occlusion. Les trois derniers prélèvements (R1, R2 et R5) sont réalisés successivement à 1, 2 et 5 minutes de la phase de reperfusion (Fig 22). Pour chaque prélèvement, 5 ml sont recueillis et placés à 80°C afin de doser les catécholamines.

En plus de ces 5 prélèvements, des mesures du débit de perfusion coronaire, de la fréquence cardiaque et une lecture de l'ECG sont réalisées au cours de chacune des trois étapes du protocole à des temps déterminés. Ils sont représentés par le symbole (*) sur la Figure 22.

En fin de reperfusion vient l'étape de coloration rapportée à la section suivante.

2.5. Analyses et mesures

2.5.1. Evaluation de la zone à risque

Il s'agit de mesurer la taille de la zone qui n'a pas été perfusée pendant l'occlusion coronaire. Cette étape est réalisée à la fin du protocole expérimental, c'est à dire à la fin des deux heures de reperfusion. L'artère coronaire gauche est à nouveau occlue. Par l'intermédiaire de la rampe de robinet trois voies, l'arrivée de la solution de perfusion est stoppée. Le cœur est alors perfusé sous une pression manuelle par une solution colorante bleue (Super Imperse Blue; Ciba Geigy) par l'intermédiaire d'une seringue reliée à la rampe de robinet.

Après démontage du cœur par incision de l'aorte à sa base, le myocarde est sommairement rincé dans du sérum physiologique. Une fois séché, le cœur est pesé dans son ensemble avant de séparer le ventricule gauche (paroi libre et septum) pesé à son tour. Le colorant bleu colore tout le territoire qui a été perfusé continuellement pendant l'occlusion. Le ventricule gauche est ensuite congelé une heure à -20°C afin de faciliter sa découpe transversale en tranche avoisinant le millimètre. Les tranches sont ensuite immergées dans une solution de chlorure de triphényle tétrazolium (TTC) dont la composition est résumée au Tableau III.

<u>Tampon phosphate:</u> Solution 1: 100 mM de Na_2HPO_4 , H_2O Solution 2: 100 mM de NaH_2PO_4
<u>Solution de tampon phosphate:</u> 2 parts de solution 1 + 8 parts de solution 2 + TTC à 1% dans la solution finale soit 1g/100ml

Tableau III: Solution de coloration du cœur.

Le TTC colore la zone non perfusée ou zone à risque qui n'a pas été colorée en bleu. Pour que cette coloration se développe, les tranches de ventricule gauche sont incubées 20 minutes à 37°C dans la solution. En effet, le TTC est un colorant vital; dans les cellules vivantes il est réduit en formazan de couleur rouge brique qui précipite par action d'une déshydrogénase en présence de NADH. Les zones infarctées à l'intérieur de la zone à risque (cellules mortes) restent non colorées. Les tranches de ventricule gauche sont alors fixées au moins 48h dans du formol avant d'être analysées.

L'analyse des différentes zones se fait à l'aide d'une caméra couleur reliée à un ordinateur affichant l'image des tranches. Grâce à un logiciel de traitement d'image, les aires des zones de différentes couleurs sont quantifiées en pixels permettant ainsi de quantifier pour chacune des tranches:

- Zone totale = Surface de section de la tranche
- Zone à risque = Zone blanche + rouge
- Zone infarctée = Zone blanche

Compte tenu du fait qu'il est impossible de reproduire fidèlement d'un cœur à l'autre le même volume de zone à risque (importance interindividuelle variable des anastomoses), on normalise la taille d'infarctus en fonction de la zone à risque et on exprimera les résultats en pourcentage infarcté de la zone à risque.

2.5.2. Paramètres mesurés

Le débit coronaire (en ml/min), la fréquence cardiaque (FC en bpm) et la pression ventriculaire gauche systolique (PVG en mmHg) sont mesurés à intervalles de temps réguliers au cours du protocole expérimental. Ces mesures permettent de vérifier:

- La bonne réalisation du montage. Ainsi ne sont retenus dans cette étude que les cœurs présentant un débit coronaire compris entre 8 et 15 ml/min, une FC supérieure à 250 bpm, ainsi qu'une PVG systolique supérieure à 70 mmHg, à la fin de la période de stabilisation.
- Par ailleurs, lors de l'ischémie myocardique, la ligature de l'artère coronaire gauche est considérée comme satisfaisante lorsque le débit coronaire est réduit d'au moins 30%.

2.5.3. Mesure des paramètres biochimiques

Elle est réalisée afin de suivre au cours du protocole les taux d'adrénaline et de noradrénaline libérés au niveau de l'effluent coronaire.

Le dosage de l'adrénaline et de la noradrénaline est réalisé par HPLC (pompe: Chromatofield 501, amortisseur de pulsation: Touzard et Matignon vanne d'injection: Negretti 190) suivant la méthode initialement décrite par Eriksson (1993). Les échantillons sont dans un premier temps, purifiés sur alumine activée; la séparation est réalisée sur colonne phase inverse; la détection est de type coulométrique (ESA 5100A).

2.6. Analyse statistique

L'analyse statistique des concentrations des catécholamines est effectuée par analyse de variance multifactorielle (un facteur temps et un facteur traitement). La comparaison des échantillons deux à deux est réalisée par le test de Newman-Keuls. Dans le cas d'une distribution non normale des données, une analyse de variance non paramétrique (Kruskal-Wallis), suivie de test de Dunn a été employée.

La comparaison des tailles d'infarctus et de zones à risques a été effectuée à l'aide de tests de t ou de Mann-Whitney selon que les données suivaient une distribution normale ou non.

Les effectifs des deux groupes sont les suivants: 5 pour le groupe controle; 7 pour le groupe MT.

Les résultats sont exprimés sous forme: Moyenne \pm erreur standard de la moyenne.

3. Résultats

3.1. Libération des catécholamines dans l'effluent coronaire

Les poids des cœurs et les débits coronaires des groupes C et MT n'étant pas différent de façon statistique (résultats non présentés), les concentrations des catécholamines seront exprimées directement sous la forme de pg/ml.

3.1.1. Dosage de l'adrénaline

	Stab 15	Occ 30	R1	R2	R5
Groupe C (pg/ml)	0	0	59,5 \pm 24,8*	18,9 \pm 8,7	9,3 \pm 5,9
Groupe MT (pg/ml)	2,7 \pm 2,7	2,3 \pm 2,3	87,8 \pm 30,6*	26,6 \pm 8,9	11,2 \pm 6,1

La concentration d'adrénaline (pg/ml) dans l'effluent coronaire présente un pic significatif au moment de la reperfusion qui s'atténue rapidement dans chacun des deux groupes.

Le groupe MT présente un taux de libération d'adrénaline légèrement supérieur à celui du groupe C. Cependant aucune différence significative ne peut être établie entre les deux groupes.

*: $p < 0,05$ vs Occ 30

N.S: différence non-significative

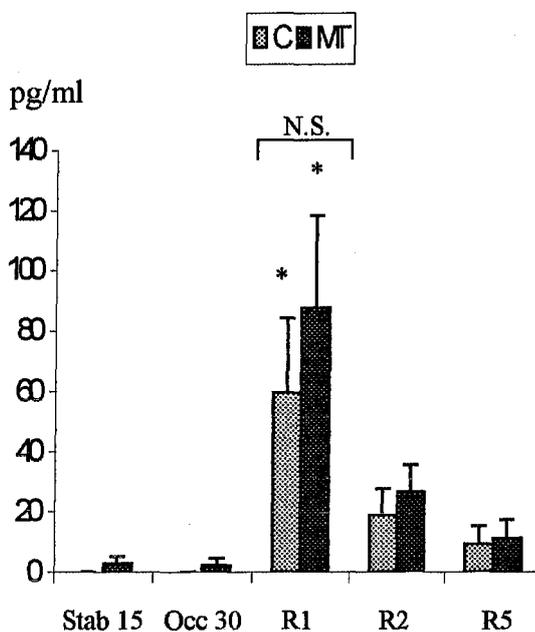


Figure 23:

Concentration de l'effluent coronaire en adrénaline.

3.1.2. Dosage de la noradrénaline

	Stab 15	Occ 30	R1	R2	R3
Groupe C (pg/ml)	4,7 +/- 2,1	60,1 +/- 26,7	326,3 +/- 146,0*	178,5 +/- 79,8	35,5 +/- 15,9
Groupe MT (pg/ml)	8,8 +/- 3,6	35,2 +/- 13,3	488,0 +/- 184,4*	135,4 +/- 55,3	126,2 +/- 47,7

La concentration de noradrénaline (pg/ml) dans l'effluent coronaire présente un pic significatif au moment de la reperfusion qui s'atténue rapidement dans chacun des deux groupes.

Le groupe MT présente un taux de libération de noradrénaline légèrement supérieur à celui du groupe C. Cependant aucune différence significative ne peut être établie entre les deux groupes.

*: $p < 0,05$ vs Occ 30

NS: différence non-significative

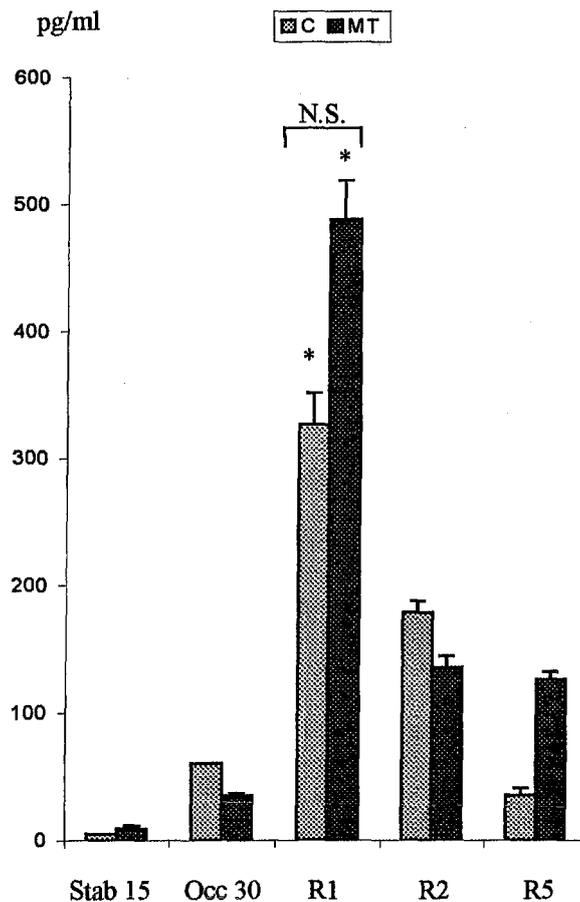


Figure 23:

Concentration de l'effluent coronaire en noradrénaline.

3.2. Mesure de la taille de l'infarctus

3.2.1. Mesure de la taille de la zone à risque

La taille de la zone à risque (ZR) exprimée en % du ventricule gauche (VG) est semblable dans les deux groupes et ne présente pas de différence significative (N.S.).

	ZR / VG
Groupe C (%)	51,1 \pm 7,0
Groupe MT (%)	49,7 \pm 6,2

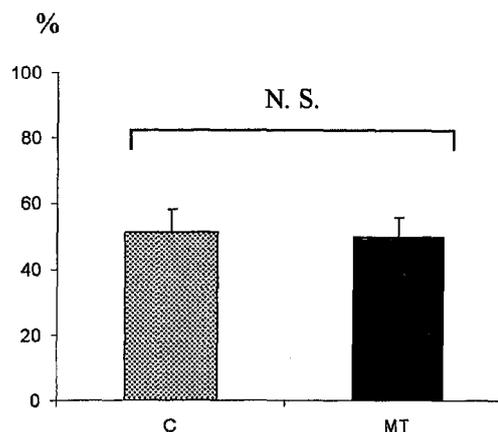


Figure 25: Zone à risque / Ventricule gauche

3.2.2. Mesure de la taille de l'infarctus

La zone infarctée (ZI) exprimée en % de la zone à risque (ZR) est dans le groupe MT significativement plus importante ($p < 0,05$). Cette différence significative persiste quand la taille de l'infarctus est comparée à la masse du ventricule gauche.

	ZI / ZR	ZI / VG
Groupe C (%)	17,8 \pm 7,4	8,4 \pm 3,2
Groupe MT (%)	49,9 \pm 9,5*	24,5 \pm 5,0*

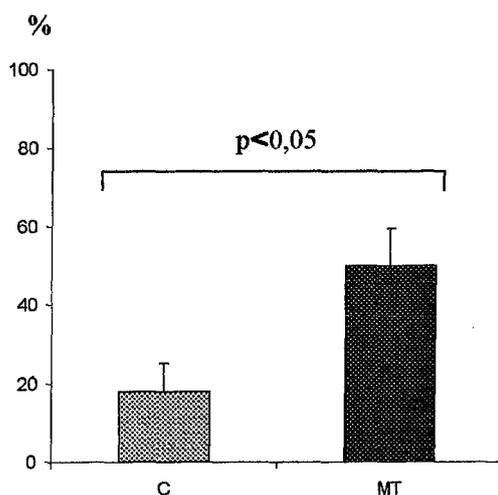


Figure: 26
Zone infarctée / Zone à risque

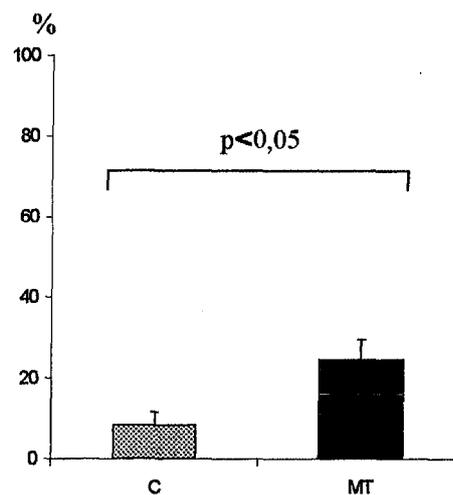


Figure: 27
Zone infarctée / Ventricule gauche

4. Discussion

Le but de cette étude est d'évaluer les capacités antioxydantes de la mélatonine lors d'un stress oxydatif induit par un épisode d'ischémie-reperfusion myocardique à travers la mesure de la taille de l'infarctus afin de mettre en évidence son rôle cardioprotecteur.

La mesure de la taille de l'infarctus n'a pas permis de montrer d'effet protecteur de la mélatonine lors d'un prétraitement à 2mg/kg contre les troubles induits par le phénomène de l'ischémie-reperfusion.

Un certain nombre de données obtenues expliquent ce résultat alors que d'autres méritent d'être discutés et remis en cause. L'étude des effets protecteurs de la mélatonine étant mesurée de façon indirecte, la bonne réalisation du protocole est un facteur important dans la validation des résultats obtenus.

La mesure des catécholamines libérées au niveau de l'effluent coronaire présente un pic au moment de la reperfusion conforme à ce qui est rapporté dans la littérature. Cette accumulation massive de catécholamines au niveau de la fente synaptique trouve son origine dans l'inversion du mécanisme de recapture uptake 1 après 10 minutes d'ischémie. Au moment de la reperfusion, l'effluent coronaire "lave" alors cet excès mis en évidence par le pic mesuré. La mesure de ce pic est donc un des facteurs traduisant la bonne réalisation de l'occlusion et de l'ischémie.

De même, la mesure de la taille de la zone à risque est un facteur indépendant du traitement. Il est directement lié à la bonne réalisation de l'occlusion et les résultats montrent dans chacun des groupes des valeurs semblables qui valident la bonne réalisation de l'étape d'occlusion de l'artère coronaire gauche.

Cependant, même si la bonne réalisation de l'occlusion est nécessaire pour induire l'ischémie, cette dernière peut évoluer de façon différente en fonction de nombreux paramètres et notamment de la température du tissu. En effet, dans le cas d'une température non maîtrisée et plus basse que celle rencontrée physiologiquement, le développement des conséquences néfastes de l'ischémie peut être grandement ralenti par l'inhibition de tous les processus enzymatiques. Ainsi, bien que la taille de la zone à risque soit conforme au modèle utilisé, la taille de la zone infarctée du groupe contrôle devrait être conforme à la littérature (fourchette allant de 35 à 42% de la zone à risque; Joyeux et coll. 1998_a, 1998_b). Or elle apparaît extrêmement basse dans notre étude (18%). Cette faible taille de l'infarctus du groupe C peut s'expliquer par un défaut dans la maîtrise de la technique de réalisation du modèle. Les échantillons du groupe C ont été les premiers à être réalisés (la réalisation aléatoire entre groupe C et MT n'ayant pas été réalisée). Le suivi des conditions thermiques durant les deux heures de reperfusion a été réalisée avec un simple thermomètre électronique placé contre la paroi cardiaque.

L'utilisation d'une sonde intracardiaque aurait permis une mesure plus précise de la température du myocarde au cours de l'expérience. La vérification de la température du bain-marie n'était faite qu'épisodiquement. Ainsi, du fait de la non-maîtrise de la température du tissu et du milieu irrigant ce dernier, on ne peut pas exclure le fait que la

limitation anormale de la zone infarctée du groupe C ait pour origine une température trop basse pendant l'occlusion et la reperfusion. Cette hypothèse peut être à l'origine d'une variation affectant la reproductibilité et la fiabilité des résultats.

Enfin, les résultats du groupe MT montrent qu'avec le temps nous avons développé une meilleure maîtrise du modèle puisque la taille de l'infarctus (49.9 %) est conforme à celles retrouvées par d'autres auteurs (Joyeux et coll. 1998_a, 1998_b). Cependant, cette conformité avec les valeurs obtenues chez des animaux non traités montre une absence d'efficacité de la mélatonine à la dose utilisée.

Ce résultat présente alors un intérêt quand on le compare à ceux qui ont démontré un effet bénéfique de la mélatonine sur d'autres modèles où la dose administrée a été supérieure ou égale à 10mg/kg (Pierrefiche et coll., 1993; Blinkenstaff et coll., 1994; Tan et coll., 1994; Bertuglia et coll., 1996). Il serait donc intéressant de répéter l'expérience à la dose de 10 mg/kg avec une maîtrise des conditions thermiques afin d'évaluer si les effets bénéfiques de la mélatonine apparaissent à une dose supérieure.

THESE SOUTENUE PAR: Marc BORIS

TITRE: INFLUENCE DE LA MÉLATONINE SUR LA TAILLE DE L'INFARCTUS MYOCARDIQUE LORS D'UN ÉPISODE D'ISCHÉMIE-REPERFUSION

5. CONCLUSION

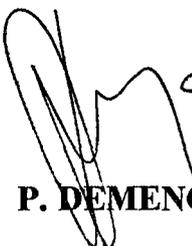
Dans cette thèse, nous avons présenté une revue rapportant l'implication des radicaux libres de l'oxygène dans le processus d'ischémie-reperfusion myocardique et des propriétés anti-radicalaires de la mélatonine.

Au cours d'une étude expérimentale, nous n'avons cependant pas pu mettre en évidence un effet protecteur de la mélatonine à la dose de 2mg/kg sur la taille de l'infarctus myocardique chez le rat.

Des études supplémentaires avec des doses supérieures sont nécessaires afin de déterminer les propriétés cardioprotectrices de la mélatonine.

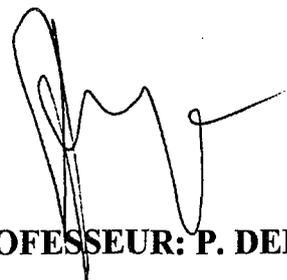
VU ET PERMIS D'IMPRIMER
Grenoble, le 03.05.1999

LE DOYEN



P. DEMENGE

LE PRESIDENT DE THESE


PROFESSEUR: P. DEMENGE

Annexes

Annexe I: Stabilité et conservation d'une solution de mélatonine à -80°C

1. Introduction

Le projet d'étude de l'influence de la MT sur la taille de l'infarctus sur des cœurs isolés de rat prévoit dans son protocole une injection intra-péritonéale d'une solution de MT à raison de 2 mg/kg. Pour des raisons pratiques qui tiennent compte de la concentration de la solution à réaliser, on prépare cette dernière en moyen volume, c'est-à-dire de l'ordre de 20ml concentrée à 2mg/ml (soit 40 mg de MT qsp 20ml H₂O). Cependant, compte tenu de sa faible solubilité et ce, même additionnée de Tween 80 (tensioactif à raison de 200µl/20ml), on se heurte à la reformation des cristaux de MT après conservation d'une telle solution au froid à +4°C.

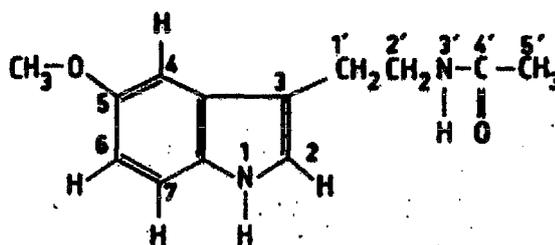
L'un des moyens émis pour résoudre le problème de solubilisation lié à la conservation de la solution est de répartir cette dernière dans des aliquots de 1.5 ml qui seront conservés à -80°C. En effet, lors de leur décongélation la solution contenue dans les aliquots est directement utilisable sans aucun problème de solubilité de MT. Cependant n'ayant aucunes données sur la dégradation éventuelle de la MT à une telle température, le but de cette première expérience est de savoir si les aliquots de 1.5 ml conservés au congélateur à -80°C permettent de garantir la conservation (donc la concentration) de la MT. En d'autres termes, savoir si la congélation à -80°C altère la MT et/ou le Tween en formant des produits de dégradations.

2. Matériels et méthodes

2.1. Caractères physico-chimiques des matières premières

2.1.1. La mélatonine

Formule et dénominations



Dénomination commune internationale (DCI):

Melatonin(e)

Dénomination chimique:

N-Acetyl-5-methoxytryptamine, ou
N-[2-(5-Methoxy-1 H-indol-3-yl)éthyle]acétamide

Caractères physico-chimiques

Formule brute: $C_{13}H_{16}N_2O_2$	→	Soit: C 67.22%
Poids moléculaire ou PM: 232.28		H 6.94%
Point de fusion: 115-118°C		N 12.06%
Pics d'absorption (UV max): 223 et 278nm (ϵ 27550, 6300)		O 13.78%

La MT est présentée sous forme de petits cristaux blancs inodores, conditionnés dans un flacon de verre teinté (protection UV) et conservés à température ambiante sous forme sèche. Le fournisseur est le laboratoire "ACROS" qui garantit à la matière un indice de pureté de 99% (TLC, Thin Layer Chromatography, soit un contrôle réalisé à partir de la technique de chromatographie sur couche mince.

2.1.2. Le Txeen 80

Le tensioactif utilisé sera du Tween 80 également fourni par le laboratoire "ACROS".

2.2. Méthodologie

2.2.1. Principe

Afin d'évaluer l'éventuelle dégradation de la solution de MT, on utilise une méthode spectrophotométrique aux longueurs d'ondes caractéristiques λ des différents produits (λ MT = 223nm, λ Tween = à déterminer). Ainsi, on pourra mettre en évidence l'apparition ou non de nouveaux pics d'absorption qui mettraient en évidence la formation de nouveaux produits issus d'une éventuelle dégradation de la MT ou du TWEEN au cours du temps.

Dans un second temps, on évaluera la conservation de la concentration de la MT au cours du temps en mettant en évidence la conservation de la pente d'une gamme étalon de MT.

Pour réaliser ces expériences, un spectrophotomètre type UVIKON, intégrant un moniteur et relié à une imprimante, permettra le dosage par absorption aux longueurs d'ondes caractéristiques λ des différents composés formant la solution. Compte-tenu des longueurs d'ondes d'absorption $\lambda < 400$ nm, on utilisera des cuves en quartz.

2.2.2. Détermination des concentrations nécessaires à une absorption linéaire

Désirant utiliser une méthode spectrophotométrique, on réalise tout d'abord des tests de concentrations afin de se situer dans la partie linéaire d'absorption des produits c'est-à-dire avoir une absorbance (ou DO, densité optique) comprise entre 0,5 et 1,5 en étant idéalement le plus proche d'une DO égale à 1. Ainsi, à partir d'une solution-mère M_0 à 2 mg/ml contenant: 20 mg de

MT, 200 μ l de tween qsp 20 ml H₂O, on réalise des dilutions M_x jusqu'à ce que le scan d'absorption des λ comprises entre 180 et 340 nm donne une DO comprise entre 0,5 et 1,5 pour le max d'absorption de la MT

2.2.3. Détermination de la λ du Tween 80

On ne cherche pas à connaître la λ exacte du Tween mais simplement savoir si elle interfère avec celle de la MT. Pour ce faire on réalise un SCAN à différentes λ (de 180 à 340 nm) à partir d'une solution T₀ ne contenant pas de MT (20 μ l de tween 80 qsp 20 ml H₂O).

2.2.4. Approximation des effets de la congélation.

A partir de la solution M_x déterminée dans le paragraphe (2.2.2.), une lecture de la DO permettra l'éventuelle mise en évidence de nouveaux pics d'absorptions traduisant l'apparition de produits de dégradations après une période de congélation à -80°C pendant 24heures.

2.2.5. Conservation de la solution à -80°C au cours du temps

Pour vérifier les résultats obtenus en dans le paragraphe (2.2.4.), on réalise une gamme d'étalonnage croissante de MT que l'on mesure à 223nm pour en déterminer la pente. Cette gamme sera conservée à -80°C et l'on renouvelera les mesures à 24 heures, 96 heures, et 240 heures. La comparaison des pentes obtenues permettra de mettre en évidence l'éventuelle conservation de la solution au cours du temps.

3. Résultats

3.1. Détermination des concentrations nécessaires à une absorption linéaire

La dilution M_x gardée pour réaliser les différentes expériences est la dilution M₄: 1/625 de M₀. (Fig: 28)

3.2. Détermination de la λ du Tween 80

La dilution T₄: 1/625 de T₀ n'interfère pas avec le pic d'absorption à 223 nm de la MT (Fig 28).

3.3. Approximation des effets de la congélation

Après 24 h de congélation des solutions M₄ et T₄, on ne met pas en évidence l'apparition de nouveau pic d'absorption pour chacune des solutions (fig 28). Les courbes de scan semblent superposées, il n'y a donc pas de dégradation des produits.

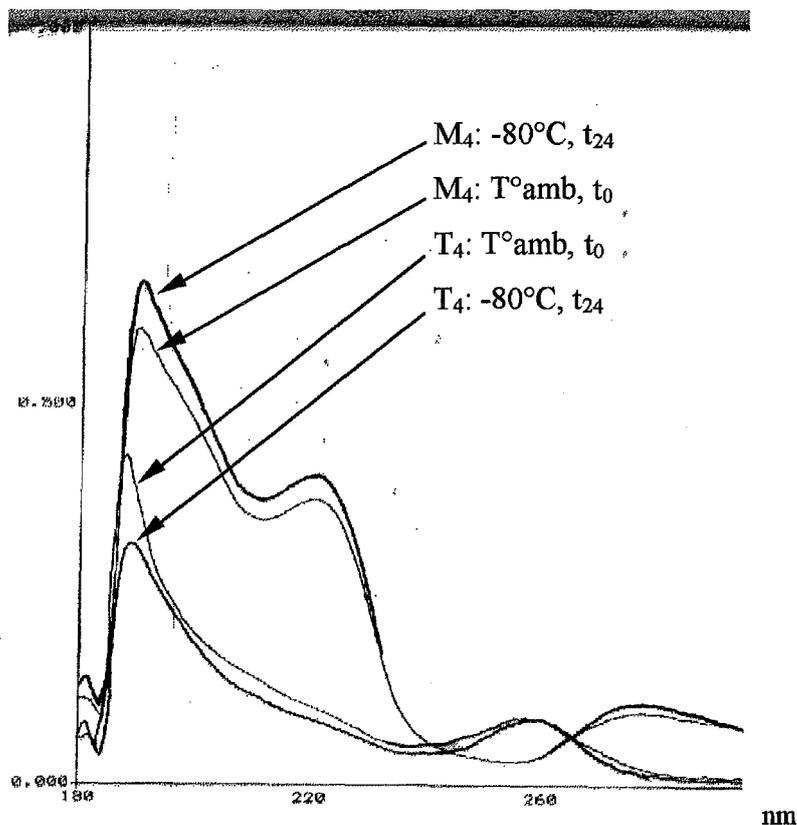


Figure 28: Représentation des différents scans d'absorptions des solutions.

3.4. Conservation de la solution à -80°C au cours du temps

Equation de la droite de la gamme d'étalonnage.

$$\begin{aligned} \text{à } t_0 &: 0.11248X + 6.4 \cdot 10^{-3} \\ \text{à } t_{24} &: 0.10620X + 1.18 \cdot 10^{-2} \\ \text{à } t_{96} &: 0.10688X + 6.2 \cdot 10^{-3} \\ \text{à } t_{240} &: 0.10744X - 2.4 \cdot 10^{-3} \end{aligned}$$

Les pentes restent identiques. La MT n'est donc pas dégradée par une conservation à -80°C.

4.4. Conclusion

La conservation d'une solution de MT à -80°C n'entraîne pas sa dégradation.

Annexe II: Réalisation de la solution modifiée de Krebs-Henseleit

1. Introduction

Bien évidemment le but des modèles d'étude de l'ischémie myocardique est de reproduire le plus fidèlement possible les situations rencontrées en clinique. Il est clair que les études conduites "in vitro" sur des organes isolés dans lesquels, les conditions ischémiques sont mimées par l'hypoxie ou l'utilisation de solution de perfusion ne peuvent reproduire fidèlement la totalité des phénomènes rencontrés en clinique. En effet, au cours de l'ischémie il n'y a pas seulement une diminution de l'apport en oxygène, d'ions, de glucose et de protéines plasmatiques mais il y a aussi une diminution de l'arrivée des éléments figurés sanguins. Ces derniers ou les produits qui en dérivent sont sans doute des acteurs importants du développement de l'ischémie myocardique. De ce fait, il faut différencier les modèles où une diminution de l'apport de sang est créée et ceux où l'ischémie est simulée par diminution de l'apport d'un tampon de perfusion. Le choix de l'espèce animale est important pour une raison pratique: la quantité de liquide de perfusion consommée par le cœur. La solution de tampon de perfusion utilisée est la plupart du temps un Krebs modifié en fonction du type d'étude réalisée (pratiquement chaque laboratoire possède sa propre recette). Ce tampon de perfusion renferme du glucose et des ions en mélange (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- ...), il est filtré, oxygéné par barbotage d'un mélange à 95% d' O_2 et 5% de CO_2 , tamponné à $\text{pH}=7.4$ et maintenu à une température de 37°C .

2. Matériels et méthodes

A partir de solutions-mères (Tab IV) qui peuvent être stockées à $+4^\circ\text{C}$ pendant une quinzaine de jours, on réalise la solution de Krebs (Tab V). En ce qui concerne notre étude, le protocole nécessite la préparation de 4 litres par expérience. Cette solution se conserve au maximum 48 heures.

Produits	[concentration] en g/l
MgSO_4	59.2
KH_2PO_4	32.7
KCL	70.0
NaCl	137.9
NaHCO_3	52.5

Tableau IV:

Quantité solution KREBS en L	1L	2L	3L	4L	5L	6L
NaCl (ml)	50	100	150	200	250	300
NaHCO_3 (ml)	40	80	120	160	200	240
KH_2PO_4 (ml)	5	10	15	20	25	30
MgSO_4 (ml)	5	10	15	20	25	30
KCl (ml)	5	10	15	20	25	30
Glucose (g)	1.98	3.96	5.94	7.92	9.9	11.88
CaCl_2 (g)	0.44	0.88	1.32	1.76	2.20	2.64
EDTA (mg)	10	20	30	40	50	60
Vit C (mg)	10	20	30	40	50	60

Tableau V:

Mode opératoire

Mettre en mélange tous les produits sauf le chlorure de calcium. Agiter et oxygéner pendant 10 minutes (mélange gazeux composé de 95% d' O_2 et de 5% de CO_2). Ajouter alors le chlorure de calcium puis agiter de nouveau tout en oxygénant pendant 5 minutes.

Filtrer la solution à travers un filtre $1.2\mu\text{M}$ sous vide par l'intermédiaire d'une pompe à eau.

Enfin ajuster le pH de façon à ce que: $\text{pH}=7.40$ à 37°C soit $\text{pH} 7.44$ à 20°C .

Bibliographie

Bibliographie

- Abe M., Reiter R.J., Orhii P.H., Hara M., Poeggler B. et Barlow-Walden L.R. (1994).
Inhibitory effect of melatonin on cataract formation in newborn rats: Evidence of an antioxidative role for melatonin. *J. Pineal Res*; 17: 94-100.
- Acuña-Castroviego D., Reiter R.J., Menedez-Pelaez A., Pablos M.I. et Burgos A. (1994).
Characterization of high-affinity melatonin binding sites in purified cell nuclei of rat liver. *J. Pineal Res*; 16: 100-112.
- Alonso R., Prieto L., Hernandez C. et Mas M. (1978).
Antiandrogenic effects of the pineal gland and melatonin in castrated and intact prepubertal male rats. *J. Endocr*; 79: 77-83.
- Anton-Tay F., Chou C., Anton S. et Wurtman R.J. (1968).
Brain serotonin concentration: elevation following intraperitoneal administration of melatonin. *Science*; 162: 277-278.
- Arendt J., Wirz-Justice A., Bradtke J. et Kornemark M. (1979).
Long term studies on immuno-reactive human melatonin. *Ann. Clin. Biochem*; 16 307-312.
- Axelrod J. (1974).
The pineal gland: a neurochemical transducer. *Science*; 174: 1341-1348.
- Bailey C.J., Atkins T.W. et Matty A.J. (1974).
Melatonin inhibition of insulin secretion in the rat and mouse. *Hormone Res*; 5:21-28.
- Beck-Friis J., Ljunggren J.G., Thoren M., Von Rosen D., Kjellman B. et Wetterberg L. (1985).
Melatonin, cortisol and ACTH in patients with major depressive disorder and healthy humans with special reference to the outcome of the dexamethasone suppression test. *Psychoneuroendocrinology*; 10: 21-29.
- Benitz-King G. et Anton-Tay F. (1993).
Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. *Experientia*; 49: 635-641.
- Bernier M., Hearse D.J. et Manning A.S. (1986).
Reperfusion-induced arrhythmias and oxygen free radicals: studies with "anti-free radical" interventions and a free radical generating system in the isolated perfused rat heart. *Circ. Res*; 58: 331-340.
- Bertuglia S., Marchiafava P.L. et Colantuoni A. (1996).
Melatonin prevents ischemia reperfusion injury in hamster cheek pouch microcirculation. *Cardiovasc. Res*; 31: 947-952.
- Blask D.E. et Wilson S.T. (1994).
Pineal gland and cancer: intracellular mechanisms of melatonin action on human breast cancer cells. *Abstr. NATO Workshop Pineal Gland, Erice Italy*.
- Blinkenstaff R.T., Brandstadter S.M., Reddy S. et Witt R. (1994).
Potential radioprotective agents: Homologs of melatonin. *J. Pharmaceut. Sci*; 83: 216-218.
- Boberg E.W., Miller E.C., Miller J.A., Poland A. et Liem A. (1983).
Strong evidence from studies with brachymorphic mice and pentachlorophenol that 1'-sulfoxysafrole is the major ultimate electrophilic and carcinogenic metabolite of 1'-hydroxysafrole in mouse liver. *Cancer Res*; 43:5163-5173.
- Bolli R., Zhu W.X., Hartley C.J., Michael L.H., Repine J., Hess M.L., Kukreja R.C. et Roberts R. (1987a).
Attenuation of dysfunction in the postischemic "stunned" myocardium by dimethylthiourea. *Circulation*; 76: 458- 468.
- Bolli R., Patel B.S., Zhu W.X., Hartley C.J., Charlat M.L. et Roberts R. (1987b).
The iron chelator desferrioxamine attenuates postischemic ventricular dysfunction. *Am. J. Physiol*; 253: H1372-H1380.

- Bolli R. (1988).
Oxygen-derived free radicals and postischemic myocardial dysfunction ("stunned myocardium"). *J. Am. Coll. Cardiol.*; 12: 239-249.
- Boucher F. et de Leiris J. (1990).
Radicaux libres de l'oxygène et ischémie myocardique. *Réalités Cardiol.*; 6: 6-9.
- Bramer M. et Binkley S. (1979).
Daily rhythms of serotonin and N-acetyltransferase in chicks. *Comp. Biochem. Physiol.*; 63C: 305-307.
- Bray T. et Taylor C. (1993).
Tissues glutathion, nutrition, and oxidative stress. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*; 71: 746-751.
- Bubenik G.A., Brown G.M. et Grota L.G. (1976).
Differential localization of N-acetylated indolealkylamines in CNS and the harderian gland using immunohistology. *Brain. Res.*; 118: 417-427.
- Burton K.P., Mc Cord J.M. et Ghai G. (1984).
Myocardial alterations due to free radical generation. *Am. J. Physiol.*; 246: H776-H783.
- Cardinali D.P., Lynch H.P. et Wurtman R.J. (1972).
Binding of melatonin to human and rat plasma proteins. *Endocrinology*; 91: 1213-1218.
- Cardinali D.P., Nagle C.A. et Rosner J.M. (1974).
Incorporation of ³H-leucine into proteins in the hypothalamus and the anterior hypophysis. Effect of pinealectomy superior cervical sympathectomy and continuous exposure to light or darkness. *Neuroendocrinology*; 16: 74-83.
- Cardinali D.P. (1975_a).
Changes in hypothalamic neurotransmitter uptake following pinealectomy, superior cervical ganglionectomy or melatonin administration to rats. *Neuroendocrinology*; 19: 91-95.
- Cardinali D.P. et Freire F. (1975_b).
Melatonin effects on brain. Interaction with microtubules protein inhibition of fast axoplasmic flow and induction of crystalloid and tubular formation in the hypothalamus. *Mol. Cell. Endocr.*; 2: 317-330.
- Cardinali D.P., Nagle C.A., Freire F. et Rosner J.M. (1975_c).
Effects of melatonin to human and rat plasma proteins. *Endocrinology*; 91: 1213-1218.
- Cardinali D.P., Nagle C.A., Freire F. et Rosner J.M. (1975_d).
Effects of melatonin on neurotransmitter uptake and release by synaptosome-rich homogenates of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology*; 18: 72-85.
- Cardinali D.P., Vacas M.I. et Estevez Boyer E. (1979).
Specific binding of melatonin in bovine brain. *Endocrinology*; 103: 437-441.
- Cardinali D.P., Vacas M.I. et Gejman P.V. (1981).
The sympathetic superior cervical ganglia as peripheral neuroendocrine centers. *J. Neural. Trans.*; 52: 1-21.
- Cardinali D.P. et Ritta M.N. (1983).
The role of prostaglandins in neuroendocrine junctions: studies in the pineal gland and the hypothalamus. *Neuroendocrinology*; 36: 152-160.
- Cassone V.M., Lane R.F. et Menaker M. (1983).
Daily rhythms of serotonin metabolism in the medial hypothalamus of the chicken: Effects of pinealectomy and exogenous melatonin. *Brain. Res.*; 289: 129-134.
- Cassone V.M., Chesworth M.J. et Armstrong S.M. (1986).
Entrainment of rat circadian rhythms by daily injection of melatonin depends upon the hypothalamic suprachiasmatic nuclei. *Physiol. Behav.*; 36: 1111-1121.

- Castroviego D.A., Rosenstein R.E., Romeo H.E. et Cardinali D.P. (1986).
Changes in gamma-Aminobutyric acid high affinity binding to cerebral cortex membranes after pinealectomy or melatonin administration to rats. *Neuroendocrinology*; 43: 24-31.
- Charlat M.L., O'Neill P.G., Egan J.M., Abernathy D.R., Michael L.H., Myers M.L., Roberts R. et Bolli R. (1987).
Evidence for a pathogenetic role of xanthine oxidase in the "stunned" myocardium. *Am. J. Physiol*; 252: H566- H.577.
- Cheesemann K. et Salter T. (1993).
An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull*; 49: 481-493
- Chen L.D., Tan D.X., Reiter R.J., Yaga K., Poeggler B., Kumar P., Manchester L.C. et Chambers J.P. (1993).
In vivo and in vitro effects of the pineal gland and melatonin on $[Ca^{2+}+Mg^{2+}]$ -dependent ATPase in cardiac sarcolemma. *J. Pineal Res*; 14: 178-83.
- Chen L.D., Kumar P., Reiter R.J., Tan D.X., Manchester L.C., Chambers J.P., Poeggler B. et Saarela S. (1994).
Melatonin prevents the suppression of cardiac Ca^{2+} -stimulated ATPase activity induced by alloxan. *Am. J. Physiol*; 267: E57-E62.
- Cohen M., Roselle D., Chabner R., Schmidt I.J. et Lippman M. (1978).
Evidence for a cytoplasmic melatonin receptor. *Nature*; 274: 894-895.
- Cramer H., Rudolf J., Consbruch U. et Kendel K. (1974).
On the effects of melatonin on sleep and behavior in man. *Adv. Biochem. Psychopharmacol*; 11: 187-191.
- Cramer H., Bohme W., Kendel K. et Bonnadieu M. (1976).
Freisetzung von Wachstumskaraman und von melanozyten stimulierenden Rormon in durch Melatonin Gebahnten Schalf bein Menschen. *Arzne. Forsch*; 26: 1076-1078.
- Davies K. (1986_a).
Protein damage and degradation by oxygen radicals. I General aspects. *The journal of Biochemical Chemistry*; 262: 9895-9901.
- Davies K. et coll. (1986_b).
Protein damage and degradation by oxygen radicals. II Modification of amino acids. *J. Biochem. Chem*; 262: 9902-9907.
- De Hemptinne et coll. (1982).
In *Intracellular function*, New York: Alan R. Liss, 7-19.
- Delaunay J. (1987).
"Biochimie". Ed. Hermann. P530.
- Domenech R.J., Hoffnan J.L., Noble M.I., Saunders K.B., Henson J.R. et Subijanto S. (1969).
Total and regional coronary blood flow measured by radioactive microspheres in conscious and anesthetized dogs. *Circ. Res*; 25: 581-596.
- Eriksson B.M. (1993).
Determination of catecholamines in the rat heart tissue and plasma samples by liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of chromatography*; 612: 1-5.
- Farber N.E., Vercelotti G.M., Pieper G.M. et Gross G.J. (1987).
Enhancement of postischemic myocardial metabolic and functional recovery in the stunned myocardium by desferrioxamine. *Circulation*; 76: IV-230.
- Faure P. et Lafond J.L. (1995).
Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups. "Analysis of Free Radicals in Biological Systems". Ed. Birkhäuser, Verlag.

- Fevre-Montagne M., Van Cauter E., Refetoff S., Desir D., Tourniaire J. et Copinschi G. (1978).
Effects of "jet lag" on hormonal patterns. II Adaptation of melatonin circadian periodicity. *J. Clin. Endocrinol. Metab*; 52: 642-649.
- Flaherty J. (1991).
Myocardial injury mediated by oxygen free radicals. *Am. J. Med*; 91: 79-85.
- Gibbs F.P. (1985).
Elementary pharmacokinetics of ³H-melatonin in rats. *Adv. Biosci*; 53 241-246.
- Glenny R.W., Bernard S. et Brinkley M. (1993).
Validation of fluorescent-labeled microspheres for measurement of regional organ perfusion. *J. Appl. Physiol*; 74: 2584-2597.
- Go L.O., Murry C.E., Richard V.J., Weischedel G.R., Jennings R.B. et Reimer K.A. (1988).
Myocardial neutrophil accumulation during reperfusion after reversible and irreversible ischemic injury. *Am. J. Physiol*; 255: 1188-1198.
- Goldman B.D. et Darrow J.M. (1983).
The pineal gland and mammalian photoperiodism. *Neuroendocrinology*; 37: 386-396.
- Goldstein J.A., Butterfield M.C., Ohnishi Y., Shelton T.J. et Corr P.B. (1994).
Arrhythmogenic influence of intracoronary thrombosis during acute myocardial ischemia. *Circulation*; 90: 139-147.
- Golus P. et King M.G. (1977).
The effects of melatonin on openfield behavior. *Pharmac. Biochem. Behav*; 6: 449-552.
- Goto M., Oshima I., Tomita T. et Ebihara S. (1989).
Melatonin content of the pineal gland in different mouse strains. *J. Pineal Res*; 7. 195-205.
- Gross G.J., Farber N.E., Hardman H.F. et Warltier D.C. (1986).
Beneficial effects of superoxide dismutase and catalase in stunned myocardium of dogs. *Am. J. Physiol*; 250: 372-377.
- Guillon J.M., Rochette L. et Barnes J. (1986).
Effets de l'extrait de Gingko biloba sur deux modèles d'ischémie myocardique expérimentale. *La Presse Médicale*; 15: 1516-1519.
- Haldar-Misra C. et Prevet P. (1983).
Influence of melatonin on the process of protein and/or peptide secretion in the pineal gland of the rat and hamster. An in vitro study. *Cell Tissue Res*; 231, 73-82.
- Hale S.L., Alker K.J. et Klipner R.A. (1988).
Evaluation of nonradioactive, colored microspheres for measurement of regional myocardial blood flow in dogs. *Circulation*; 78: 428-434.
- Hardeland R., Reiter R.J., Poeggler B. et Tan D.X. (1993).
The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxydative protection and formation of biactive substances. *Neurosci. Biobehav. Rev*; 17: 347-357.
- Hata T. et Kita T. (1978).
A newly designed method for removal of the pineal body and depression of convulsion and enhancement of exploratory movement by pinealectomy in mice. *Endocrinology*; 25: 407-413.
- Hearse D.J., Humphrey S.M. et Chain E.B. (1973).
Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium arrested reperfused reat heart: a study of myocardial enzyme release. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, S, 395-407.
- Hearse D.J. et Tosaki A. (1987).
Free radicals and reperfusion-induced arrhythmias: protection by spin trap agent PBN in the rat heart. *Circ. Res*; 60: 375- 383.

- Heikkilä R.E., Winston B. et Cohen G. (1976).
Alloxan-induced diabetes: evidence for hydroxyl radical as a cytotoxic intermediate. *Biochem. Pharmacol*; 25: 1085-1092.
- Heithier G., Poeggeler B., Reimer A., et George A. (1992).
Effect of tryptophan administration on circulating melatonin levels in chicks and rats: evidence for stimulation of melatonin synthesis and release in the gastrointestinal tract. *Life Sci*; 51: 945-953.
- Hirata Y., Umemura K., Uematsu T. et Nakashima M. (1995).
An experimental myocardial infarction model in the rat and its properties. *Jpn. J. Pharmacol*; 67: 51-57.
- Ho A.K., Grotta L.J. et Brown G.M. (1984).
Relationship between pineal N-Acetyltransferase activity, pineal melatonin and serum melatonin in rats under different nighting conditions. *Neuroendocrinology*; 39: 465-470.
- Ianas O., Olivescu R. et Badescu I. (1991).
Melatonin involvement in oxidative processes. *Rom. J. Endocrinol*; 29: 117-123.
- Ikonomidis J.S., Tumiati L.C., Weisel R.D., Mickle D.A.G. et Li R-K. (1994).
Preconditioning human ventricular cardiomyocytes with brief periods of simulated ischaemia. *Cardiovasc. Res*; 28: 1285-1291.
- Johnson L.Y. (1982).
The pineal gland as a modulator of the adrenal and thyroid axis. In "The pineal gland - Extrareproductive effects". Reiter R.J. Ed. C.R.E. Press, Boca Raton: 107-152.
- Joyeux M., Godin-Ribuot D. et Ribuot C. (1998_a).
Resistance to myocardial infarction induced by heat stress and the effect of ATP-sensitive potassium channel blockade in the isolated rat heart. *Br. J. Pharmacol*; 123: 1085-1088.
- Joyeux M., Godin-Ribuot D., Demenge P., Yellon D.M et Ribuot C. (1998_b).
Infarct size-reducing effect of heat stress and α_1 Adrenoceptors in rats. *Br. J. Pharmacol*; 125: 645-650.
- Jurmann M.J., Schaffers H.J., Dammenhayn L. et Haverich A. (1988).
Oxygen-derived free radical scavengers for amelioration of reperfusion damage in heart transplantation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg*; 95: 368-377.
- Kaneko M., Elimban V. et Dhalla N.S. (1989_a).
Mechanisms for depression of heart sarcolemmal Ca^{2+} -pump by oxygen free radicals. *Am. J. Physiol*; 257: H804-H811.
- Kaneko M., Beamish R.E. et Dhallas N.S. (1989_b).
Depression of heart sarcolemma Ca^{2+} -pumping ATPase activity by oxygen free radicals. *Am. J. Physiol*; 256: H368-H374.
- Karpanen H., Vapaatalo H., Lahovaara S et Paasonen M.K. (1970).
Studies with pinealectomized rats. *Pharmacology*; 3: 76-84.
- Kennaway D., McCulloch G., Matthews C.D. et Semard R.F. (1979).
Plasma melatonin LH, FSH, prolactin and corticoids in two patients with pinealoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab*; 49:144-145.
- Kimura S., Bassett A.L., Furukawa T., Cuevas J et Myerburg R.J. (1990).
Electrophysiological properties and responses to simulated ischemia in cat ventricular myocytes of endocardial and epicardial origin. *Circ. Res*; 66: 469-477.
- Klein D.C. (1979_a).
Circadian rhythms in the pineal gland. In "Endocrine Rhythms" Krieger D.T. Ed. Raven Press, New-York: 203-204.

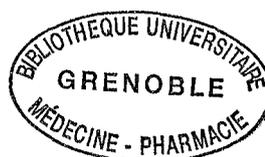
- Klein DC. et Moore R. Y. (1979_b).
Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase: control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nuclei. *Brain Res*; 174: 245-262.
- Klein D.C., Averbach D.A., Namboodiri M.A.A. et Wheeler G.H.T. (1981).
Indole metabolism in the mammalian pineal gland. In: "The pineal Gland". Reiter R.J. ed. C.R.E. Press, Boca Raton, Vol I: 199-220.
- Kopin I.J., Pare C.M.B., Axelrod J. et Weissbach H. (1961).
The fate of melatonin in animals. *J. Biol. Chem*; 236: 3072-3075.
- Langendorff O. (1895).
Untersuchungen am uberlebenden schaugethierherzen. *Pfluger's Arch*; 61: 291-332.
- Laudon M. et Zisapel N. (1986).
The effect of electrochemical stimulation of paraventricular nuclei on plasma corticosterone. *Neuroendocrinol. Lett*; 5: 207-210.
- Leonardelli J., Tramu G. et Hermand E. (1978).
Mélatonine et cellules à gonadolibérine (LH-RH) de l'hypothalamus du rat. *C.R. Soc. Biol*; 172: 481-484.
- Lerner A.B., Case J.D., Takahashi Y., Lee T.H. et Mori W. (1958).
Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J. Am. Chem. Soc*; 80: 2587.
- Lesnefsky E.J., Dauber I., Collier H. et Horwitz L.D. (1988).
Deferoxamine, an iron chelator, reduces canine infarct size. *Circulation*; 78: II-372.
- Lewy A.J., Tetsuo M., Markey S.P., Goodwin F.K. et Kopin I.J. (1980).
Pinelectomy abolishes plasma melatonin in the rat. *J. Clin. Endocrinol. Metab*; 50: 204-205.
- Lowenstein P.R., Rosenstein R. et cardinali D.P. (1985).
Melatonin reverses pinealectomy-induced decrease of benzodiazepine binding in rat cerebral cortex. *Neurochem. Int*; 7: 177-187.
- Lucchesi B.R., Romson J.L. et Jolly S.R. (1984).
Do leukocytes influence infarct size? In: Hearse D.J. et Yellon D.M. *Therapeutic approaches to myocardial infarct size limitation*, Ed. Raven Press, New York: 219-248.
- Lynch H., Jimerson D.C., Ozaki Y., Post R.M., Bunney W.E. et Wurtman R.J. (1978).
Entrainment of rhythmic melatonin secretion in man to a 12-hours phase shift in the light-dark cycle. *Life Sci*; 23: 1557-1563.
- Malaisse W.J. (1982).
Alloxan toxicity to the pancreatic β -cell: a new hypothesis. *Biochem. Pharmacol*; 31: 3527-3534.
- Manning A.S., Coltart D.J. et Hearse D.J. (1984).
Ischemia and reperfusion-induced arrhythmias in the rat. Effect of xanthine oxidase inhibition with allopurinol. *Circ. Res*; 55: 545-548.
- Marber M.S., Mestrlil R., Chi S.H., Sayen M.R., Yellon D.M. et Dillmann W.H. (1995).
Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increase the resistance of the heart to ischemic injury. *J. Clin. Invest*; 95: 1446-56.
- Maxwell M.P., Hearse D.J. et Yellon D.M. (1987).
Species variation in the coronary collateral circulation during regional myocardial ischemia: a critical determinant of the rate of evolution and extent of myocardial infarction. *Cardiovasc. Res*. 21: 737-746.
- Mc Donagh P.F. et Reynolds J.M. (1994).
Brief perfusion with diluted whole blood after global myocardial ischemia increases reperfusion injury. *Cardiovasc. Res*; 28: 1157-1165.

- Menendez-Pelaez A., Howes K.A., Gonzalez-Brito A. et Reiter R.J. (1987).
N-Acetyltransferase activity, hydroxyindole-O-methyltransferase activity, and melatonin levels in the harderian glands of the female Syrian hamster: changes during the light: dark cycle and the effects of 6-chlorophenylalanine administration. *Biochem. Biophys. Res. Commun*; 145: 1231-1238.
- Michael L.H., Entman M.L., Hartley C.J., Youker K.A., Zhu J., Hall S.R., Hawkins H.K., Berens K. et Ballantyne C.M. (1995).
Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am. J. Physiol*; 269: 2147-2154.
- Mitsos S.E., Askew T.E., Fantome J.C., Kunkel S.L., Abrams G.D., Schork M.A. et Lucchesi B.R. (1986).
Protective effects of N-2- mercaptopropionyl glycine against myocardial reperfusion injury after neutrophil depletion in the dog: evidence for the role of intracellular-derived free radicals. *Circulation*; 73: 1077-1086.
- Moore R.Y. et Klein D.C. (1974).
Visual pathway and the central neural control of circadian rhythm in pineal serotonin-N-acetyltransferase activity. *Brain Res*; 71: 17-33.
- Morita Y. Payne B.D. Aldea G.S. Mc Watters C., Husseini W., Mori H., Hoffman J.I. et Kaufman L. (1990).
Local blood flow measured by fluorescence excitation of nonradioactive microspheres. *Am. J. Physiol*; 258: 1573-1584.
- Mouret J., Coindet J. et Chouvet G. (1974).
Effet de la pinéalectomie sur les états de sommeil du rat mâle. *Brain Res*; 81: 97-105.
- Myers M.L., Bolli R., Lekich R., Hartley C.J. et Roberts R. (1985).
Enhancement of recovery of myocardial function by oxygen free-radical scavengers after reversible regional ischemia. *Circulation*; 72: 915-921.
- Myers M.L., Bolli R., Lekich R., Hartley C.J. et Roberts R. (1988).
N-2-mercaptopyropionyl glycine improves recovery of myocardial function after reversible regional ischemia. *J. Am. Coll. Cardiol*; 8: 1161-1168.
- Nachlas M.M., Kwan-Chung T., De Souza E., Chao-Shing C. & Seligman A.M. (1957).
Cytochemical demonstration of succinyl dehydrogenase by use of a new p-nitrophenyl substitute ditetrazole. *J. Histochem. Cytochem*; 5: 420-436.
- Neely J.R., Lieber-Meister M., Battersby E.J. et Morgan H.E. (1967).
Effect of pressure development on oxygen consumption by isolated rat heart. *Am. J. Physiol*; 212: 804-814.
- Niles L.P., Brown G.M. et Grota L.J. (1979_a).
Role of the pineal gland in diurnal endocrine secretion and rhythm regulation. *Neuroendocrinology*; 29: 14-21.
- Niles L.P., Wong Y.M., Wishra R.K. et Brown G.M. (1979_b).
Melatonin receptors in brain. *Eur. J. Pharmacol*; 55: 87-97.
- Oberley L.W. (1988).
Free radicals and diabetes. *Free. Rad. Biol. Med*; 5: 113-124.
- Opie L.H. (1991).
"The heart. Physiology and metabolism". Raven Press. 2^d edition.
- Opie L.H. (1992).
Cardiac metabolism-emergence, decline, and resurgence. Part I. *Cardiovasc. Res*; 26: 721-733.
- Pangerl B., Pangerl A. et Reiter R.J. (1990).
Circadian variations of adrenergic receptors in the mammalian pineal gland: a review *J. Neural. Transm*; 81:17-30.
- Pardridge W.M. et Mietus L. (1980).
Transport of albumine-bound melatonin through the blood-brain barrier. *J. Neurochem*; 34, 1761-1763.

- Pevet P., Balenmans M.G.M., Legerstee WC. et Vivien-Roels B. (1980).
Circadian rhythmicity of the activity, of hydroxyindole-O-methyltransferase in the formation of melatonin and 5-methoxytryptophol in the pineal, retina and harderian gland of the golden hamster. *J. Neural. Transm*; 49: 229-245.
- Pfeffer M.A., Pfeffer J.M., Fishbein M.C., Fletcher P.J., Spadaro J. Kloner R.A. et Braunwald E. (1979).
Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ. Res*; 44: 503-512.
- Pierrefiche G., Topall G., Henriot I. et Laborit H. (1991).
Protective effects of gamma-hydroxybutyrate on alloxan induced diabetes in mice. *Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol*; 71: 309-319.
- Pierrefiche G., Topall G., Courbain G., Henriot I. et Laborit H. (1993).
Antioxydant activity of melatonin in mice. *Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol*; 80:211-223.
- Przyklenk K. et Kloner R.A. (1986).
Superoxide dismutase plus catalase improve contractile function in the canine model of "stunned" myocardium. *Circ. Res*; 58: 148-156.
- Przyklenk K. et Kloner R.A. (1989).
" Reperfusion injury" by oxygengenerated free radicals? Effect of superoxide dismutase plus catalase, given at the time of reperfusion, on myocardial infarct size, contractile function, coronary microvasculature, and regional myocardial blood flow. *Circ. Res*; 64: 86-96.
- Raes M., Michels C. et Remacle J. (1987).
Comparative study on the enzymatic defense systems against oxygen-derived free radicals: the key role of glutathione peroxidase. *Free Rad. Biol. Med*; 3: 3-7.
- Reddy B.R. et Przyklenk K. (1988).
Deferoxamine pretreatment reduces oxygen free radical-mediated necrosis. *Circulation*; 78: II-373.
- Reddy B.R., Kloner R.A. et Przyklenk K. (1989).
Early treatment with deferoxamine limits myocardial ischemic/reperfusion injury. *Free Rad. Biol. Med*; 7: 45-52.
- Reddy M.V. et Randerath K. (1996).
Nuclease P1-mediates enhancement of sensitive of ³²P-postlabeling test for structurally diverse DNA adducts. *Carcinogenesis*; 7: 1543-1551.
- Redman J., Armstrong S. et Ng. K.T. (1983).
Free-running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin. *Science*; 219: 1089-1091.
- Rees S.A. et Curtis M.J. (1995).
Further investigations into the mechanism of antifibrillatory action of the specific IK1 blocker, RP58866, assessed using the rat dual coronary perfusion model. *J. Mol. Cell. Cardiol*; 27:2595-2606.
- Reiter R.J., (1980).
The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocrine Rev*; 1, 109-131.
- Reiter R.J. (1991_a).
Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocrine Rev*; 12: 151-180.
- Reiter R.J. (1991_b).
Melatonin: that ubiquitously acting pineal hormone. *News Physiol. Sci*; 6: 223-227.
- Reiter R.J., Poeggler B., Tan D.X., Chen L.D., Manchester L.C. et Guerrero J.M. (1993).
Antioxydant capacity of melatonin: A novel action not requiring a receptor. *Neuroendocrinol. Lett*; 15: 103-316.
- Reiter R.J., Tan D.X., Poeggler B., Menendez-Pelaez A., Chen L.D. et Saarela S. (1994_a).
Melatonin as a free radical scavenger: Implications for aging and age-related diseases. *Ann. NY. Acad. Sci*; 719: 1-12.

- Reiter R.J., Tan D.X., Poeggler B., Chen L.D. et Menendez-Pelaez A. (1994_b).
Melatonin, free radicals and cancer initiation. In: Maestroni GJM, Toniti A., Reiter R.J., eds. *Advances in pineal research* Vol.7. John Libbey, London: 211-228.
- Reiter R.J. (1995).
Functional pleiotropy of the neurohormone melatonin: Antioxydant protection and neuroendocrine regulation. *Frontiers in neuroendocrinology*; 16: 383-415.
- Reiter R.J., Chen L.D., Burkhard H., Poeggler B., Barlow-Walden L., Sewerynek E. et Melchiorri D. (1996).
Antioxidant actions of melatonin and structurally related compounds. In: *Handbook of antioxidants*. Ed. E. Cadenas and L. Packer, New-York: 513-541.
- Richard V.J., Gest K.L., Murry C.E., Jennings R.B. et Reimer K.A. (1988_a).
Lack of neutrophil accumulation during reversible ischemic injury in the canine myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol*; 20: 514.
- Richard V.J., Murry C.E., Pennings R.B. et Reimer K.A. (1988_b).
Therapy to reduce free radicals during early reperfusion does not limit the size of myocardial infarcts caused by 90 minutes of ischemia in dogs. *Circulation*; 78: 473- 480.
- Rios C. et Santamaria A. (1991).
Quinolinic acid is a potent lipid peroxidant in rat brain homogenates. *Neurochem. Res*; 16: 1139-1143.
- Ritta D.P. et Cardinali D.P. (1980).
Effect of indomethacin treatment on monoamine metabolism and melatonin synthesis of the rat pineal gland. *Hormone Res*; 26, 305-312.
- Rochete L. et Maupoil V. (1993).
De l'ischémie aux lésions de reperfusion. *Archives des maladies du cœur*. 86 (IV): 13-17.
- Rudeen P.K., Reiter R.J. et Vaughan M.K. (1975).
Pineal serotonin-N-acetyltransferase in four mammalian species. *Neurosci. Lett*; 1: 225-229.
- Rump A. et Klaus W. (1994).
Evidence for norepinephrine cardiotoxicity mediated by superoxyde anion radicals in isolated rabbit hearts. *Naunyn-Schmeid. Arch. Pharmacol*; 349: 295-300.
- Selye H., Bajusz E., Grasso S. et Mendell P. (1960).
Simple techniques for the surgical occlusion of coronary vessels in the rat. *Angiology*; 11: 398-407.
- Sewerynek E., Melchiorri D., Ortiz G.G., Poeggeler B. et Reiter R.J. (1995).
Melatonin reduces H₂O₂-induced lipid peroxidation in homogenates of different rat brain regions.
- Shida C.S., Castrucci A.M.L. et Lamy-Freund M.T. (1994).
High solubility of melatonin in aqueous medium. *J. Pineal Res*; 16: 198-201.
- Smith J.A., O'Hara J. et Schiff A.A. (1981).
Altered diurnal serum melatonin rhythms in blind men. *The Lancet*; 11:933.
- Sugden D. (1983).
Psychopharmacological effects of melatonin in mouse and rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther*; 227: 587-591.
- Tan D.X., Chen L.D., Poeggeler B., Manchester L.C. et reiter R.J. (1993_a).
Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine Rev*; 1: 57-60.
- Tan D.X., Poeggler B., Reiter R.J., Chen L.D., Manchester L.C. et Barlow-Walden L.R. (1993_b).
The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct formation induced by the chemical carcinogen safrole in vivo. *Cancer Lett*; 70: 65-71.

- Tan D.X., Reiter R.J., Chen L.D., Poeggler B., Manchester L.C. et Barlow-Walden L.R. (1994).
Both physiological and pharmacological levels of melatonin reduce DNA adduct formation induced by the carcinogen safrole. *Carcinogenesis*; 15: 215-218.
- Tappel A.L. (1973).
Lipid peroxydation damage to cell components. *Fed. Proc*; 32: 1879-1881.
- Vacas M.I. et cardinali D.P. (1980).
Binding sites for melatonin in bovine pineal gland. *Hormone Res*; 13:121-131.
- Vakkuri O., Tervo J., Luttinen R., Ruotsalainen H., Rahkamaa E. et Leppäluoto J. (1987).
Acyclic isomer of 2-hydroxymelatonin: a novel metabolite of melatonin. *Endocrinology*; 120: 2453-2459.
- Vitte P.A. (1987).
Les effets centraux de la mélatonine.
Thèse d'état ès-sciences pharmaceutiques. Université Claude Bernard – Lyon I, Faculté de Pharmacie; n°250 : 16.
- Vriend J. (1983).
Evidence for pineal gland modulation of the neuroendocrine thyroid axis. *Neuroendocrinology*; 36:68-78.
- Weiss S. (1986).
Oxygen, ischemia and inflammation. *Acta Physiol. Scand*; 126: 9-37.
- Werns S.W., Shea M.J., Driscoll E.M., Cohen C., Abrams G.D., Pitt B. et Lucchesi B.R. (1985).
The independent effects of oxygen radical scavengers on canine infarct size: reduction by superoxide dismutase but not catalase. *Circ. Res*; 56: 895-898.
- Wetterberg L. (1983).
Melatonin as a chronobiological marker in health and disease. In: "The pineal gland and its endocrine role". J Axelrod et coll. Eds, Plenum Press, New-York; 575-587.
- Woodward B. et Zakaria M. (1985).
Effect of some free radical scavengers on reperfusion-induced arrhythmias in the isolated rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol*; 17: 485-493.
- Wurtman R.J., Altschule M.D. et Holmgren U. (1959).
Effects of pinealectomy and of bovine extracts in rats. *Am. J. Physiol*; 197, 108-110.
- Yaga K., Reiter R.J. et Richardson B.A. (1993).
Tryptophan loading increases daytime serum melatonin levels in intact and pinealectomized rats. *Life Sci*; 52: 1231-1238.
- Yamada M., Hearse D.J. et Curtis M.J. (1990).
Reperfusion and readmission of oxygen. Pathophysiological relevance of oxygen-derived free radicals to arrhythmogenesis. *Circ. Res*; 67: 1211-1224.
- Ytrehus K., Mykibust R. et Mjos O. (1986).
Influence of oxygen radicals generated by xanthine oxidase in the isolated perfused rat heart. *Cardiovasc. Res*; 20: 597-603.
- Zisapel N., Egozi Y. et Laudon M. (1982).
Inhibition of dopamine release by melatonin: regional distribution in the rat brain. *Brain Res*; 246: 161-163.
- Zisapel N. et Laudon M. (1983).
Inhibition by melatonin of dopamine release from rat hypothalamus: regulation of calcium entry. *Brain Res*; 272: 378-387.





Serment des Apothicaire

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



