



**HAL**  
open science

# Carence en zinc et peroxydation lipidique chez le rat Wistar : défenses antiradicalaires et étude in vitro de la captation des LDL par le macrophage P 388 D1

Anne Schmuck

► **To cite this version:**

Anne Schmuck. Carence en zinc et peroxydation lipidique chez le rat Wistar : défenses antiradicalaires et étude in vitro de la captation des LDL par le macrophage P 388 D1. Sciences pharmaceutiques. 1992. dumas-03431504

**HAL Id: dumas-03431504**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03431504>**

Submitted on 16 Nov 2021

**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.

La propriété intellectuelle du document reste entièrement celle du ou des auteurs. Les utilisateurs doivent respecter le droit d'auteur selon la législation en vigueur, et sont soumis aux règles habituelles du bon usage, comme pour les publications sur papier : respect des travaux originaux, citation, interdiction du pillage intellectuel, etc.

Il est mis à disposition de toute personne intéressée par l'intermédiaire de [l'archive ouverte DUMAS](#) (Dépôt Universitaire de Mémoires Après Soutenance).

Si vous désirez contacter son ou ses auteurs, nous vous invitons à consulter la page de DUMAS présentant le document. Si l'auteur l'a autorisé, son adresse mail apparaîtra lorsque vous cliquerez sur le bouton « Détails » (à droite du nom).

Dans le cas contraire, vous pouvez consulter en ligne les annuaires de l'ordre des médecins, des pharmaciens et des sages-femmes.

Contact à la Bibliothèque universitaire de Médecine Pharmacie de Grenoble :

[bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr](mailto:bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr)



115 014728 6

*2<sup>e</sup> exemplaire*

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER - GRENOBLE I  
SCIENCES, TECHNOLOGIE, MEDECINE  
U.F.R. DE PHARMACIE  
DOMAINE DE LA MERCI - LA TRONCHE

ANNEE : 1992

N° D'ORDRE : *7031*

**MEMOIRE**  
**DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES**  
**DE BIOLOGIE MEDICALE**

Soutenu le 26 Juin 1992

par **Anne SCHMUCK**

*[Données à caractère personnel]*

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 Octobre 1988 tient lieu de :

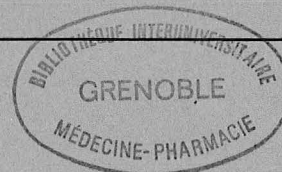
**THESE**  
**POUR LE DIPLOME D'ETAT**  
**DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

---

**Carence en zinc et peroxydation lipidique chez le rat  
Wistar : Défenses antiradicalaires et étude in vitro  
de la captation des LDL par le macrophage P 388 D<sub>1</sub>**

---

JURY



PRESIDENT : Madame le Professeur A.M. ROUSSEL

MEMBRES : Monsieur le Professeur A.J. HADJIAN

Monsieur le Docteur D. BLACHE

Madame F. TRICOT *Pharmacien*

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER - GRENOBLE I  
SCIENCES, TECHNOLOGIE, MEDECINE  
U.F.R. DE PHARMACIE  
DOMAINE DE LA MERCI - LA TRONCHE

ANNEE : 1992

N° D'ORDRE :

**MEMOIRE**  
**DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES**  
**DE BIOLOGIE MEDICALE**

Soutenu le 26 Juin 1992

par **Anne SCHMUCK**

*[Données à caractère personnel]*

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 Octobre 1988 tient lieu de :

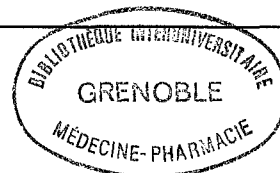
**THESE**  
**POUR LE DIPLOME D'ETAT**  
**DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

---

**Carence en zinc et peroxydation lipidique chez le rat  
Wistar : Défenses antiradicalaires et étude in vitro  
de la captation des LDL par le macrophage P 388 D<sub>1</sub>**

---

JURY



**PRESIDENT :** Madame le Professeur A.M. ROUSSEL  
**MEMBRES :** Monsieur le Professeur A.J. HADJIAN  
Monsieur le Docteur D. BLACHE  
Madame F. TRICOT

A Thiébaud, Emmanuelle et Guillaume,

A mes parents et à toute ma famille,

A Stéphane,

A mes amis.

## AUX MEMBRES DU JURY :

### A Anne-Marie ROUSSEL

Nous tenons à la remercier de la confiance qu'elle nous a témoignée et de l'accueil chaleureux qu'elle nous a toujours réservé.

Tout au long de ce travail, fruit de nombreuses rencontres au cours de nos études, son aide, sa gentillesse et son soutien ont été constants.

Nous lui exprimons toute notre reconnaissance et notre amitié.

### A Monsieur HADJIAN

Nous le remercions de nous avoir accueillie une nouvelle fois dans son Laboratoire.

Nous avons apprécié sa grande connaissance des lipoprotéines et la rigueur de son raisonnement.

Ses conseils et ses critiques nous ont été fort utiles.

Qu'il trouve ici le témoignage de notre sincère gratitude.

### A Monsieur Denis BLACHE

Nul autre que lui n'a son pareil pour effectuer les prélèvements en jugulaire chez les rats.

Il a accepté avec gentillesse de se déplacer une fois encore pour juger ce travail.

Nous le remercions de sa précieuse collaboration à cette étude.

Qu'il trouve ici l'expression de toute notre considération.

### A Françoise TRICOT,

Elle nous a initiée aux joies du marquage des LDL.

Nous avons toujours apprécié sa disponibilité, sa gentillesse et ses compétences.

Nous la remercions vivement de l'intérêt qu'elle a porté à ce travail et de l'aide qu'elle nous a souvent apportée.

Nous tenons à lui témoigner notre amitié et notre reconnaissance.

Nous remercions Monsieur Alain FAVIER qui nous a accueillie dans son Laboratoire et nous a toujours témoigné sa confiance.

Il sait, malgré un emploi du temps très chargé, rester à l'écoute de son équipe, et garder sa simplicité et son humour.

Qu'il trouve ici l'expression de notre sincère gratitude.

Nous remercions sincèrement le personnel du Laboratoire de Biochimie C pour son soutien technique et moral, et plus particulièrement Momo, Jacotte, Marie-Christine, les deux Dominique, ainsi que Anne-Marie qui nous a livré le secret des cultures cellulaires.

Nous tenons à remercier Henri FAURE qui nous a initiée à l'informatique et aux statistiques ; nous avons apprécié sa gentillesse, sa disponibilité et surtout sa patience car, certains jours, nous allions le déranger toutes les 5 minutes !

Nous remercions Josiane ARNAUD, Charles COUDRAY, Patrice FAURE pour leurs conseils avisés, et plus particulièrement Marie-Jeanne RICHARD qui nous a souvent "dépannée" côté documentation...

Nous tenons à remercier vivement le personnel du Laboratoire de Biochimie A, et plus particulièrement Jocelyne et Christine qui nous ont enseigné la préparation des LDL et souvent apporté leur aide, ainsi que Waltraud pour avoir patiemment fait migrer puis photographié ces chères LDL.

Un grand merci à Anne de l'Unité INSERM n° 63 (Bron) pour sa collaboration technique lors du dosage des acides gras.

Nous remercions Philippe du Laboratoire SERLIA de l'Institut Pasteur de Lille, pour nous avoir initiée à l'étude de la captation des LDL par les macrophages, au cours d'une semaine de stage.

Enfin, nous remercions toutes les personnes qui nous ont supportée et apporté soutien et amitié tout au long de ce travail.

# **SOMMAIRE**

---



<b><u>ABREVIATIONS</u></b> .....	6
<b><u>INTRODUCTION</u></b> .....	8
<b><u>PREMIERE PARTIE : TRAVAUX ANTERIEURS</u></b> .....	10
<b><u>I. RADICAUX LIBRES , SYSTEMES ANTIRADICALAIRES, PEROXYDATION LIPIDIQUE ET MACROPHAGES.</u></b> .....	11
<b>I.1. RADICAUX LIBRES ET PEROXYDATION LIPIDIQUE</b>	
<b>I.1.1. Définition des radicaux libres</b>	
<b>I.1.2. Les formes actives de l'oxygène et leurs origines</b>	
<b>I.1.3. Initiation et propagation de la peroxydation lipidique</b> .....	14
<b>I.1.4. Rôle du fer dans la peroxydation lipidique</b> .....	17
<b>I.2. LA PEROXYDATION DES LDL</b> .....	18
<b>I.3. CONSEQUENCES DE LA PEROXYDATION DES LDL</b> .....	19
<b>I.3.1. Conséquences sur le plan physico-chimique</b>	
<b>I.3.2. Conséquences sur le plan métabolique</b> .....	20
<i>1.3.2.1. Récepteurs B/E spécifiques et catabolisme des LDL :</i>	
<i>1.3.2.2. Métabolisme des LDL oxydées : rôle des récepteurs "scavenger"</i>	... 23
<b>I.3.3. Conséquences de la peroxydation sur les propriétés biologiques des LDL</b> .....	25
<b>I.4. LES SYSTEMES DE PROTECTION ANTIRADICALAIRE</b> .....	27
<b>I.4.1. Les systèmes de défense enzymatiques</b>	
<b>I.4.2. Les systèmes de défense non enzymatiques</b> .....	29
<b><u>II. QUEL EST LE ROLE DU ZINC DANS LA LUTTE CONTRE LES RADICAUX LIBRES ?</u></b> .....	30
<b>II.1. LE ZINC EN BIOLOGIE</b>	
<b>II.2. LE ZINC COMME ANTIOXYDANT</b> .....	31
<b>II.2.1. Les propriétés antioxydantes du zinc in vitro</b>	
<i>II.2.1.1. Dans des systèmes chimiques définis</i>	
<i>II.2.1.2. Au niveau des membranes et des organites intra-cellulaires</i> ....	32
<i>II.2.1.3. Dans les systèmes cellulaires</i> .....	33
<b>II.2.2. Les effets antioxydants in vivo de doses pharmacologiques de zinc</b>	
<b>II.3. CARENCE EN ZINC ET OXYDATION</b> .....	34

<b>II.3.1. Des études ont montré un effet protecteur de la vitamine E sur l'expression de certains effets de la carence en zinc</b>	
<b>II.3.2. Carence en zinc et métabolisme des radicaux libres</b>	
<i>II.3.2.1. Etudes suggérant une production accrue de radicaux libres dans les tissus ou les membranes de rats carencés en zinc</i>	
<i>II.3.2.2. Carence en zinc et systèmes de défense antiradicalaire</i> .....	35
<i>II.3.2.3. Carence en zinc et susceptibilité aux stress oxydatifs</i> .....	36
<b>III. <u>CARENCE EN ZINC ET A.G.P.I.</u></b> .....	37
<b>III.1. LA VOIE DE DESATURATION-ELONGATION DES ACIDES GRAS.</b>	
<b>III.2. L'INCORPORATION DES A.G.P.I. DANS LES LIPIDES</b>	
<b><u>CONCLUSION</u></b> .....	39
<b><u>DEUXIEME PARTIE : TRAVAUX PERSONNELS</u></b> .....	40
<b><u>OBJECTIF DE NOTRE TRAVAIL</u></b> .....	41
<b>I. <u>MATERIEL ET METHODES</u></b> .....	42
<b>I.1. MISE AU POINT, SUR LDL DE RATS TEMOINS, DE LA TECHNIQUE DE CAPTATION DES LDL PAR LE MACROPHAGE</b> .....	43
<b>I.1.1. Modèle animal</b>	
<b>I.1.2. Prélèvements</b>	
<b>I.1.3. Etude des LDL</b>	
I.1.3.1. Isolement et contrôle	
I.1.3.2. Marquage radioactif des LDL .....	44
<i>I.1.3.2.1. Protocole de marquage</i>	
<i>I.1.3.2.2. Contrôles du marquage</i>	
<i>I.1.3.2.2.1. Rapport I/P final (I/P f)</i>	
<i>I.1.3.2.2.2. Pourcentage de radioactivité liée aux protéines</i>	
<i>I.1.3.2.2.3. Pourcentage de radioactivité liée aux lipides</i> .....	45
<i>I.1.3.2.2.4. Activité spécifique des <sup>125</sup>I-LDL</i>	
I.1.3.3. Dégradation et captation des <sup>125</sup> I-LDL par le macrophage	
<i>I.1.3.3.1. Conditions de culture des macrophages</i>	
<i>I.1.3.3.2. Oxydation des <sup>125</sup>I-LDL</i> .....	46

I.1.3.3.3. Incubation des macrophages avec les $^{125}\text{I}$ -LDL	
I.1.3.3.4. Mesure du taux de dégradation des $^{125}\text{I}$ -LDL	
I.1.3.3.5. Mesure du taux d'internalisation- fixation des $^{125}\text{I}$ -LDL	..... 48
I.1.3.3.6. Modes de calculs	
<b>I.2. INFLUENCE DE LA CARENCE EN ZINC</b>	..... 49
<b>I.2.1. Modèle animal</b>	
I.2.1.1. Développement d'une carence expérimentale en zinc	
I.2.1.2. Les régimes	
I.2.1.2.1. Régime carencé en zinc	
I.2.1.2.2. Régime à 100 ppm de zinc	
I.2.1.3. Constitution des lots	
<b>I.2.2. Prélèvements</b>	..... 51
I.2.2.1. Etude des LDL	..... 52
I.2.2.2. Etude de différents paramètres biologiques au cours de la carence en zinc	
<b>I.2.3. Etude des LDL</b>	
I.2.3.1. Isolement des LDL	
I.2.3.2. Incubation des LDL avec les macrophages	
<b>I.2.4. Paramètres biologiques</b>	
I.2.4.1. Statut des animaux en oligo-éléments	
I.2.4.1.1. Statut en zinc	
I.2.4.1.2. Statut en cuivre	..... 53
I.2.4.1.3. Statut en sélénium	
I.2.4.1.4. Contrôle de qualité	
I.2.4.2. Statut en vitamines A et E	
I.2.4.3. Enzymes antiradicalaires	
I.2.4.3.1. Glutathion peroxydases (GPX) plasmatiques	
I.2.4.3.2. Superoxyde dismutases érythrocytaires (SOD)	..... 54
I.2.4.4. TBARs plasmatiques (exprimés en MDA)	
I.2.4.5. Nature des acides gras plasmatiques totaux	
<b>I.2.5. Statistiques</b>	..... 55
I.2.5.2. Etude de dégradation et de captation des LDL	
I.2.5.2. Etude des différents paramètres biologiques au cours de la carence en zinc	
<b>II. RESULTATS</b>	..... 56
<b>II.1. MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE DE CAPTATION DES LDL DE RATS PAR LE MACROPHAGE</b>	..... 57

<b>II.1.1. Isolement des LDL</b>	
<b>II.1.2. Marquage des LDL</b>	
<b>II.1.3. Dégradation et captation des LDL par le macrophage</b>	
<b>II.2. INFLUENCE DE LA CARENCE EN ZINC .....</b>	<b>60</b>
<b>II.2.1. Suivi de la carence</b>	
II.2.1.1. Aspect et poids des animaux	
II.2.1.2. Statut en zinc	
<b>II.2.2. Etude des LDL</b>	
II.2.2.1. Isolement	
II.2.2.2. Marquage .....	<b>63</b>
II.2.2.3. Incubation des LDL avec les macrophages	
<b>II.2.3. Etude de différents paramètres biologiques au cours de la carence en zinc.....</b>	<b>66</b>
II.2.3.1. Statut des animaux en oligoéléments	
<i>II.2.3.1.1. Statut en zinc</i>	
<i>II.2.3.1.2. Statut en cuivre</i>	
<i>II.2.3.1.3. Statut en sélénium</i>	
II.2.3.2. Statut des animaux en SOD, GPX et en vitamines A et E	
<i>II.2.3.2.1. Evolution dans le temps</i>	
<i>II.2.3.2.2. Comparaisons entre les 3 lots d'animaux.....</i>	<b>72</b>
II.2.3.3. TBARs plasmatiques (exprimés en MDA)	
<i>II.2.3.3.1. Evolution dans le temps</i>	
<i>II.2.3.3.2. Comparaisons entre les 3 lots d'animaux</i>	
II.2.3.4. Nature des acides gras plasmatiques totaux .....	<b>73</b>
<b>III. <u>DISCUSSION</u> .....</b>	<b>76</b>
<b><u>CONCLUSIONS</u>.....</b>	<b>88</b>
<b><u>BIBLIOGRAPHIE</u> .....</b>	<b>91</b>

# **ABREVIATIONS**

---

Ac-LDL = LDL acétylée

A.G.P.I. = Acide gras poly-insaturé

AL = Ad libitum

Apo = Apoprotéine

CCl<sub>4</sub> = Tétrachlorure de carbone

cpm = coups par minute

CZ = Carencé en zinc

DMEM = Dulbecco's Modified Eagle's Medium = Milieu de Eagle modifié par  
Dulbecco

EC-LDL = LDL modifiées par des cellules endothéliales

E.D.T.A. = Ethylène diamine tétra-acétique

GPX = Glutathion peroxydase

GR = Globule rouge

GST = Glutathion transférase

HDL = High Density Lipoprotein = Lipoprotéine de haute densité

<sup>125</sup>I-LDL = LDL marquée à l'Iode 125

I.N.R.A. = Institut National de Recherche Agronomique

LDL = Low Density Lipoprotein = Lipoprotéine de basse densité

MDA = Malondialdéhyde

PBS = Phosphate Buffer Saline

PF = Pair-fed

RA = Radioactivité

rpm = rotations par minute

S.A.A. = Spectrométrie d'absorption atomique

SD = "Standard deviation" = Ecart-type

SOD = Superoxyde dismutase

TBA = Acide thiobarbiturique

TBARs = "TBA reactants" = Composés réagissant avec le TBA

U.C. = Ultracentrifugation

∇ = Précipité

# **INTRODUCTION**

---

La lipidoperoxydation, résultant de l'action des radicaux libres dérivés de l'oxygène sur les acides gras poly-insaturés (A.G.P.I.), joue un rôle important dans le développement de la plaque d'athérome.

En effet, une des cibles privilégiées de la peroxydation est la LDL dont on sait que, modifiée, elle est captée par les récepteurs "scavenger" du macrophage et participe à la formation des cellules spumeuses.

L'attaque radicalaire est modulée par des systèmes de protection enzymatiques et non enzymatiques dans lequel le zinc pourrait jouer un rôle important comme antioxydant.

Si plusieurs travaux ont été consacrés au rôle du zinc dans la biosynthèse des A.G.P.I., et aux conséquences de la carence en zinc sur le métabolisme des lipoprotéines, en revanche, seuls quelques auteurs ont décrit l'influence du statut en zinc sur la peroxydation des lipides membranaires, tandis que le rôle de la carence en zinc sur la peroxydation des lipoprotéines n'a donné lieu qu'à une seule publication.

Ainsi, à notre connaissance, seule une étude préalable sur rat carencé en zinc, réalisée par les Laboratoires de Biochimie C et de Biochimie A (C.H.U. de Grenoble) a porté sur la peroxydation des lipoprotéines plasmatiques. A la suite de ce travail suggérant une susceptibilité accrue des LDL de rats carencés à la peroxydation, il nous a semblé intéressant d'établir un lien entre la sensibilité de ces LDL à la peroxydation, et une éventuelle augmentation de leur captation par les macrophages.

Nous avons également voulu déterminer, dans nos conditions expérimentales, l'influence de la carence en zinc sur le statut en systèmes protecteurs antioxydants, et sur la nature des acides gras plasmatiques.

Le Laboratoire de Biochimie C ne disposant actuellement que du rat Wistar comme modèle de carence expérimentale en zinc, notre travail a été réalisé sur cet animal.





**PREMIERE PARTIE :**

**TRAVAUX ANTERIEURS**

## **I. RADICAUX LIBRES , SYSTEMES ANTIRADICALAIRES, PEROXYDATION LIPIDIQUE ET MACROPHAGES**

### **I.1. RADICAUX LIBRES ET PEROXYDATION LIPIDIQUE**

La peroxydation lipidique est une des nouvelles hypothèses évoquées dans le processus de développement de la plaque athéromateuse. In vivo, elle est initiée par les radicaux libres, dont l'élimination est assurée par des systèmes protecteurs spécifiques.

#### **I.1.1. Définition des radicaux libres**

Un radical libre se définit comme un atome, un groupe d'atomes ou une molécule possédant un électron non apparié sur l'orbitale externe. La recherche avide d'électrons, pour réappairier leur électron célibataire et annuler leur champ magnétique, fait des radicaux libres de redoutables agresseurs et leur confère une durée de vie extrêmement brève.

Ainsi, les radicaux libres peuvent réagir avec les autres molécules de plusieurs façons (Halliwell et coll. 1989) (1) :

- 2 radicaux libres peuvent combiner leur électron célibataire et former une liaison covalente :  $A^\circ + A^\circ \text{ ----} \rightarrow A-A$

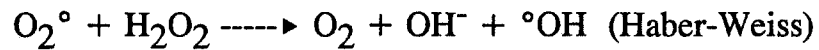
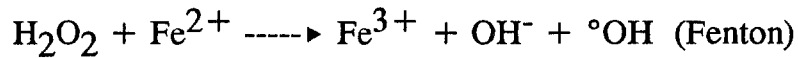
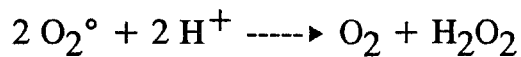
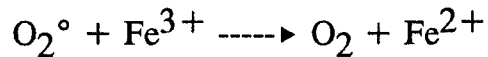
- un radical peut soit céder son électron célibataire à une molécule non radicalaire, soit lui arracher un électron, de façon à appairier le sien. Cette molécule devient à son tour un radical qui réagira de la même façon, engendrant ainsi des réactions en chaîne.

#### **I.1.2. Les formes actives de l'oxygène et leurs origines** (Fontecave et coll. 1991)(2)

Les formes actives de l'oxygène sont impliquées dans un grand nombre de processus physiologiques et physiopathologiques, ainsi que dans des phénomènes tels que l'inflammation, le vieillissement, la carcinogenèse, le mode d'action et la toxicité de diverses molécules (Sies et coll. 1991) (3), (Crystal et coll. 1991) (4).

Parmi les formes actives de l'oxygène (figure 1), certaines sont des radicaux libres, comme l'anion superoxyde  $O_2^\circ$  et les radicaux hydroxyle  $^\circ OH$  et perhydroxyle  $HO_2^\circ$ . D'autres ne sont pas radicalaires, comme l'oxygène singulet  $^1O_2$  et le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ .

Ces formes actives de l'oxygène sont interconverties entre elles par les réactions de Fenton et de Haber-Weiss, catalysées par les métaux de transition tels que le fer et le cuivre.



Ces réactions permettent en particulier la production du radical  $^\circ\text{OH}$ .

L'oxygène singulet  $^1\text{O}_2$  est formé par excitation lumineuse ou chimique de l'oxygène moléculaire, entraînant une modification de sa configuration électronique.

L'anion superoxyde  $\text{O}_2^\circ$  est généré physiologiquement au niveau cellulaire par différents systèmes enzymatiques, en particulier :

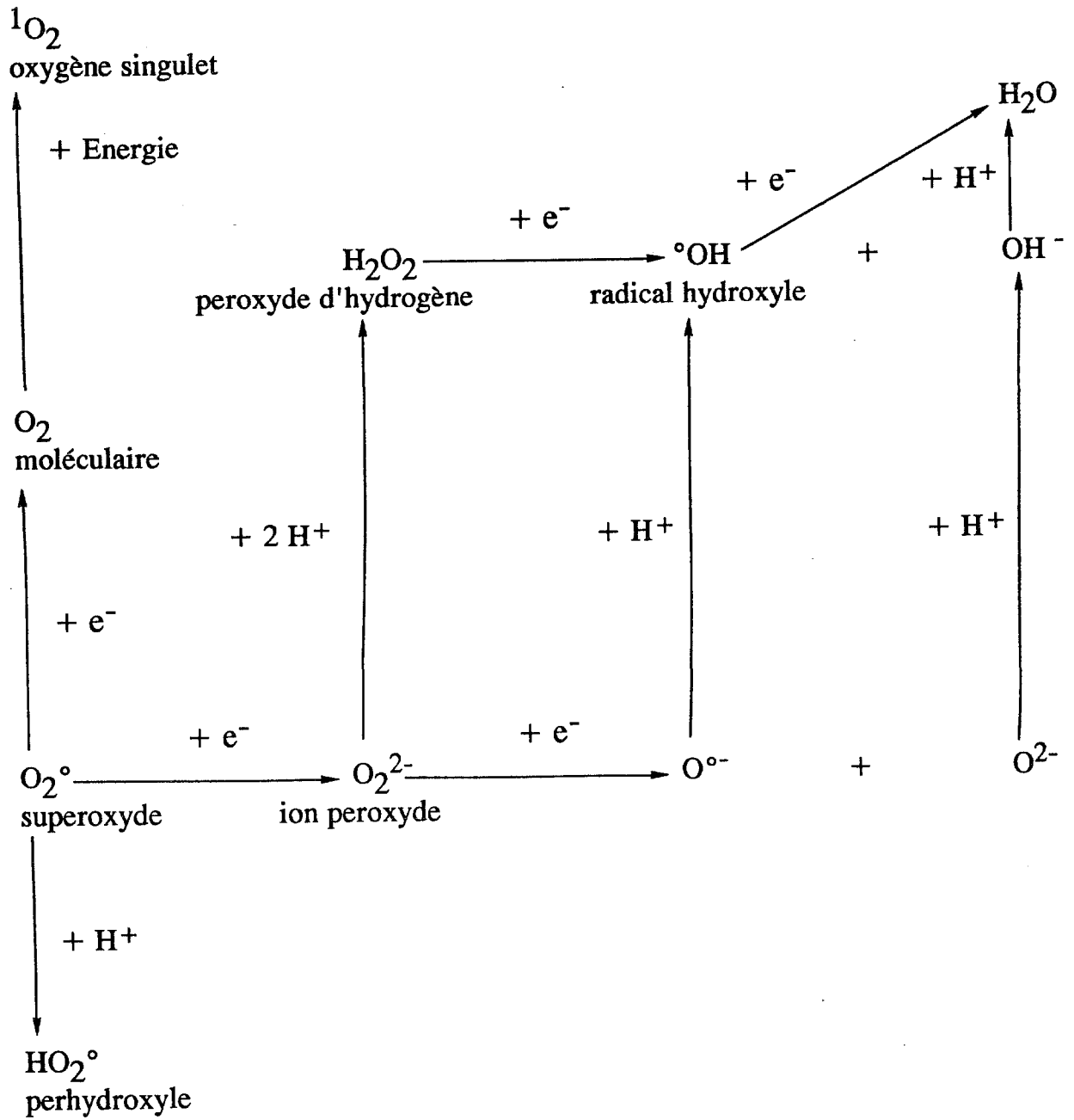
- l'ubiquinone-cytochrome C réductase et la NADH déshydrogénase au niveau des mitochondries,
- par le complexe oxy du cytochrome P-450 et par la NADPH-cytochrome P-450 réductase au niveau du réticulum endoplasmique,
- par la NADPH oxydase au niveau de la membrane cytoplasmique des leucocytes lors de la phagocytose.

Les superoxydes sont produits de façon massive par le système xanthine/xanthine-oxydase lors d'une ischémie suivie de réoxygénation.

Dans le cytoplasme, certaines molécules endogènes telles que l'oxyhémoglobine et les flavines réduites sont auto-oxydables et vont conduire à la formation de superoxydes.

Les superoxydes peuvent également avoir une origine exogène due à des molécules pouvant catalyser le transfert d'électrons de diverses réductases à l'oxygène moléculaire. C'est le cas :

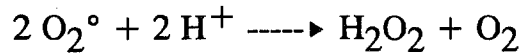
- des dérivés aromatiques ou hétérocycliques nitrés comme le nitrobenzène et la nitrofurantoïne,
- des composés quinoniques tels que l'adriamycine,
- des sels de pyridium comme le paraquat,
- etc...



**Figure 1** : Les formes actives de l'oxygène (d'après Fontecave et coll. 1990) (2)

Le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  est principalement formé :

- à partir de l'anion superoxyde dans une réaction catalysée par la superoxyde dismutase (SOD) :



- à partir de l'eau par les radiations ionisantes.

Le perhydroxyle  $HO_2^\circ$  est généré :

- en milieu acide par protonation de  $O_2^\circ$ ,

- par photolyse de  $H_2O_2$ .

Le radical hydroxyle  $^\circ OH$  est formé :

- à partir de  $H_2O_2$  par la lumière U.V. ou par les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss,

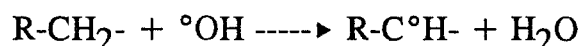
- à partir de l'eau par des radiations ionisantes.

De nombreuses molécules telles que l'éthanol et le  $CCl_4$  induisent directement ou indirectement sa formation.

### I.1.3. Initiation et propagation de la peroxydation lipidique (Halliwell et coll. 1989) (1) (figures 2 et 3)

Le radical  $^\circ OH$  est l'espèce radicalaire la plus réactive. Il attaque les lipides, les protéines, l'ADN et les sucres. Au niveau des lipides, il initie la peroxydation lorsqu'il est produit au voisinage de membranes ou de lipoprotéines.  $^\circ OH$  a pour cibles privilégiées les acides gras des phospholipides et attaque de préférence les A.G.P.I. tels que l'acide arachidonique.

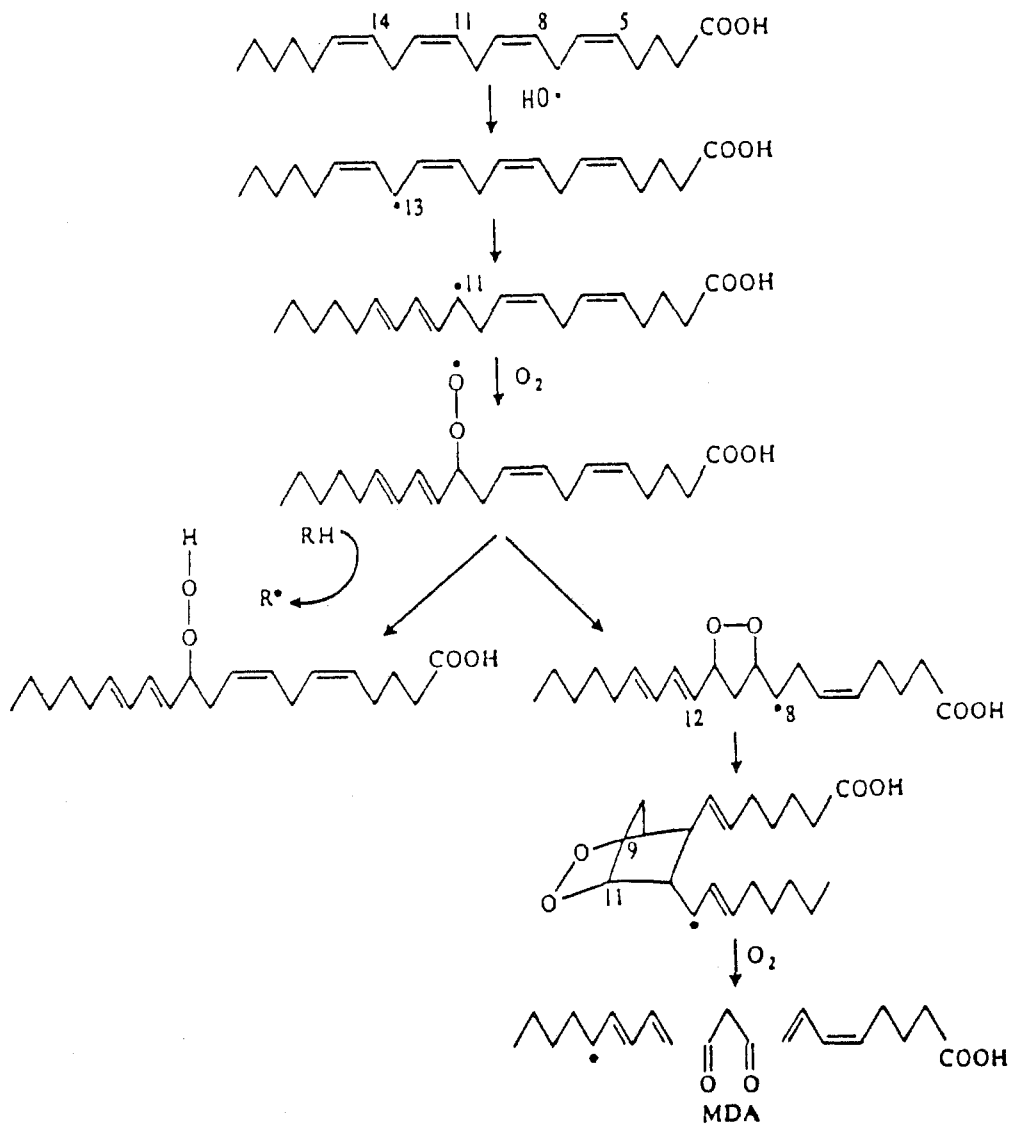
$^\circ OH$  arrache un atome d'hydrogène avec son électron à un des atomes de carbone d'un A.G.P.I., et se combine avec lui pour former de l'eau :



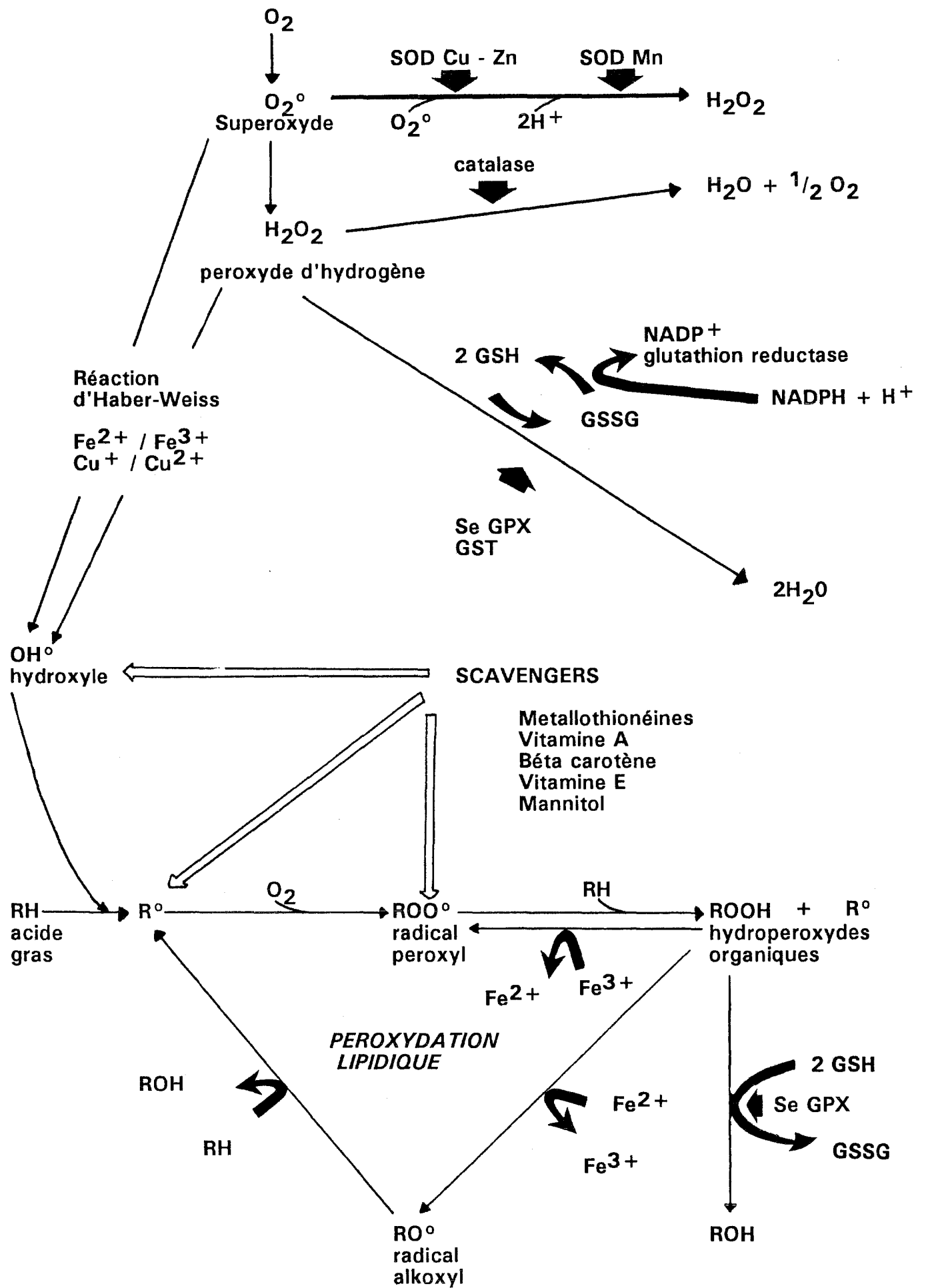
Cette réaction laisse derrière elle un radical carboné. Les radicaux ainsi formés à partir d'A.G.P.I. subissent généralement un réarrangement moléculaire pour former des diènes conjugués. Ceux-ci peuvent donner plusieurs types de réactions. Si par exemple 2 d'entre eux entrent en contact à l'intérieur d'une membrane, il en résultera la liaison des 2 molécules d'acides gras concernées :



Ces radicaux peuvent également réagir avec les protéines membranaires ou avec les apoprotéines.

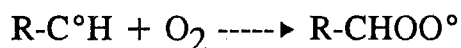


**Figure 2** : Peroxydation de l'acide arachidonique (Fontecave et coll. 1991) (2)

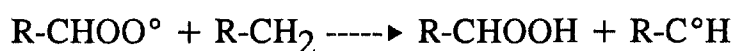


**Figure 3 :** Formes actives de l'oxygène, peroxydation lipidique et points d'impact des systèmes protecteurs antiradicalaires.

Cependant, dans des conditions d'aérobiose, le devenir le plus probable des diènes conjugués est de se combiner avec de l'O<sub>2</sub>, en formant un radical peroxyde :



Ces radicaux peroxyde sont suffisamment réactifs pour attaquer les acides gras adjacents, en leur arrachant de l'hydrogène :



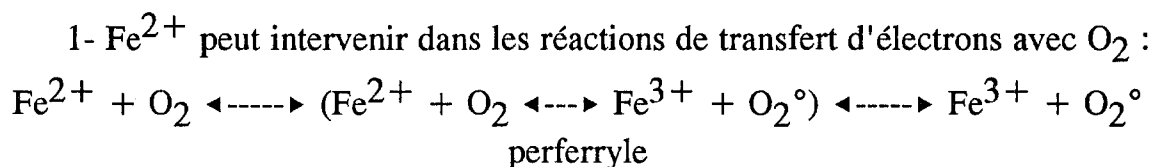
Il y a formation d'un hydroperoxyde lipidique et d'un nouveau radical carboné.

Cette réaction est l'étape de propagation de la peroxydation lipidique car le radical carboné peut réagir avec l'O<sub>2</sub> pour former un autre radical peroxyde, et la réaction en chaîne de la peroxydation lipidique peut continuer (figure 3).

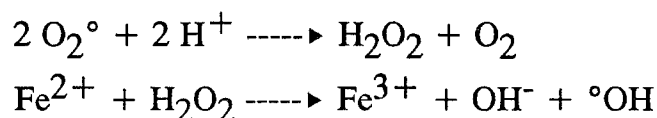
L'accumulation d'hydroperoxydes dans une membrane altère sa fonction et peut entraîner sa rupture. De plus, les hydroperoxydes peuvent se décomposer en produisant toute une gamme de produits cytotoxiques, parmi lesquels des aldéhydes comme le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonénal qui sont donc des marqueurs de la peroxydation lipidique.

#### I.1.4. Rôle du fer dans la peroxydation lipidique (Halliwell et coll. 1990) (5)

Les métaux de transition tels que le fer et le cuivre peuvent être impliqués dans la peroxydation lipidique de 2 façons :

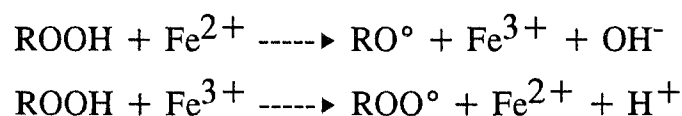


L'anion superoxyde peut se dismuter pour former H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en donnant les principaux intervenants de la réaction de Fenton, et en entraînant la formation de radicaux °OH:



Les ions cuivre peuvent donner des réactions similaires.

2- Quand des ions métalliques sont mis en présence de lipides contenant des traces d'hydroperoxydes lipidiques ROOH, ils permettent la décomposition de ces peroxydes en radicaux alkoxydes RO° et peroxydes ROO° (figure 3) :





Ces radicaux alkoxy et peroxy peuvent arracher un H° à un carbone d'un autre acide gras, permettant ainsi la propagation de la peroxydation lipidique.

## I.2. LA PEROXYDATION DES LDL

Les lipoprotéines de basse densité ou LDL sont une cible privilégiée de l'attaque radicalaire.

En effet, les LDL contiennent au niveau de leurs lipides des A.G.P.I. qui seront la première cible de l'attaque radicalaire, et elles sont également constituées d'apoprotéine B qui peut également, dans un 2<sup>ème</sup> temps, subir une attaque radicalaire.

De très nombreux travaux ont été consacrés, depuis les années 80, à l'étude des modifications oxydatives des LDL et des propriétés de ces LDL oxydées.

En effet, il est bien établi que des taux élevés de LDL plasmatiques sont corrélés avec un risque accru d'athérosclérose, et plusieurs études récentes ont montré que les LDL peuvent être oxydées *in vivo*.

Carew et coll. (1987) (6) ont montré qu'*in vivo*, le probucol, un antioxydant transporté par les lipoprotéines, ralentit la progression de l'athérosclérose aortique chez le lapin Watanabe, déficitaire en récepteurs B/E des LDL.

Palinski et coll. (1989) (7) ont rapporté que des anticorps développés contre les LDL oxydées ou contre les produits de dégradation de ces LDL se fixent sur les lésions athéroscléreuses aortiques chez le lapin Watanabe. Les LDL extraites de ces lésions sont reconnues par des anticorps développés contre des LDL conjuguées à du MDA (Palinski et coll. 1989) (7) et possèdent les propriétés physico-chimiques des LDL oxydées (Ylä-Herttuala et coll. 1989) (8). Des auto-anticorps circulants dirigés contre les "malondialdéhyde-LDL" ont été mis en évidence chez l'homme et le lapin (Palinski et coll. 1989) (7).

Il semble qu'*in vivo*, les LDL ne soient pas oxydées dans le sang, probablement en raison de la présence d'antioxydants. En effet, les études immunologiques n'ont pas mis en évidence de LDL oxydées dans la circulation.

L'oxydation a vraisemblablement lieu dans l'intima de la paroi artérielle, au niveau de micro-environnements créés par le rapprochement de macrophages, ou entre les macrophages et les cellules endothéliales (Parthasarathy et coll. 1990) (9).

*In vitro*, les LDL peuvent subir une oxydation radicalaire, soit catalysée par des cations divalents tels que le fer et le cuivre, soit par incubation avec des cellules

en culture telles que les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes et les monocytes-macrophages (Jürgens et coll. 1987) (10).

L'oxydation des LDL par les cellules mettrait en jeu 2 mécanismes principaux (Parthasarathy et coll. 1990) (9) :

- le relarguage dans le milieu d'anions superoxydes  $O_2^\circ$  générés par les cellules, qui, par dismutation en  $H_2O_2$  et par la réaction de Fenton, pourraient être à l'origine de radicaux  $^\circ OH$  responsables de l'attaque oxydative des A.G.P.I. des LDL.

- l'action d'enzymes telles que les lipoxygénases sur les lipides des membranes cellulaires ou directement sur les lipides des LDL, quand celles-ci sont au contact avec la membrane cellulaire. Les membranes cellulaires pourraient ainsi relarguer des hydroperoxydes capables d'initier des réactions d'oxydation en chaîne au niveau des LDL.

Dans l'oxydation des LDL par les cellules, la présence de faibles concentrations de fer ou de cuivre est indispensable.

En l'absence de cellules, les concentrations de fer ou de cuivre nécessaires sont plus importantes, et l'oxydation impliquera la génération d'anions superoxydes et la production ultérieure de radicaux  $^\circ OH$  par la réaction de Fenton.

### **I.3. CONSEQUENCES DE LA PEROXYDATION DES LDL**

Quel que soit le mécanisme, l'oxydation des LDL va entraîner d'importantes modifications de leurs propriétés physico-chimiques, métaboliques et biologiques.

#### **I.3.1. Conséquences sur le plan physico-chimique** (Jürgens et coll. 1987) (10), (Steinberg et coll. 1989) (11)

Les principales conséquences sont les suivantes :

- augmentation de la densité des LDL,
- augmentation de leurs charges négatives,
- augmentation de leur mobilité électrophorétique,
- diminution de leur contenu en esters de cholestérol, en A.G.P.I., en vitamine E et en  $\beta$ -carotène,
- hydrolyse des phospholipides avec formation de lysophosphatidyl-choline,
- augmentation de leur contenu en formes oxydées du cholestérol.

L'apoprotéine B subit également différents types de modifications :

- fragmentation,
- diminution du contenu en histidine, proline et lysine,
- fixation d'aldéhydes produits lors de la peroxydation des A.G.P.I. (MDA, 4-hydroxynonéal,...) au niveau des résidus lysine de l'apo B.

### I.3.2. Conséquences sur le plan métabolique

Tous ces phénomènes ont pour conséquence la modification de la reconnaissance des LDL oxydées par leur récepteur cellulaire.

#### *I.3.2.1. Récepteurs B/E spécifiques et catabolisme des LDL :*

Au cours de leur métabolisme (Luc et coll. 1989) (12) (figure 4), les LDL natives sont reconnues au niveau cellulaire par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique, le récepteur B/E. Il s'agit d'une glycoprotéine dont la séquence de 839 acides aminés est connue, et dont le gène situé sur le chromosome 19 a été isolé. Ces récepteurs B/E sont présents sur la quasi totalité des cellules de l'organisme, mais en particulier dans le cortex surrénalien et dans le foie.

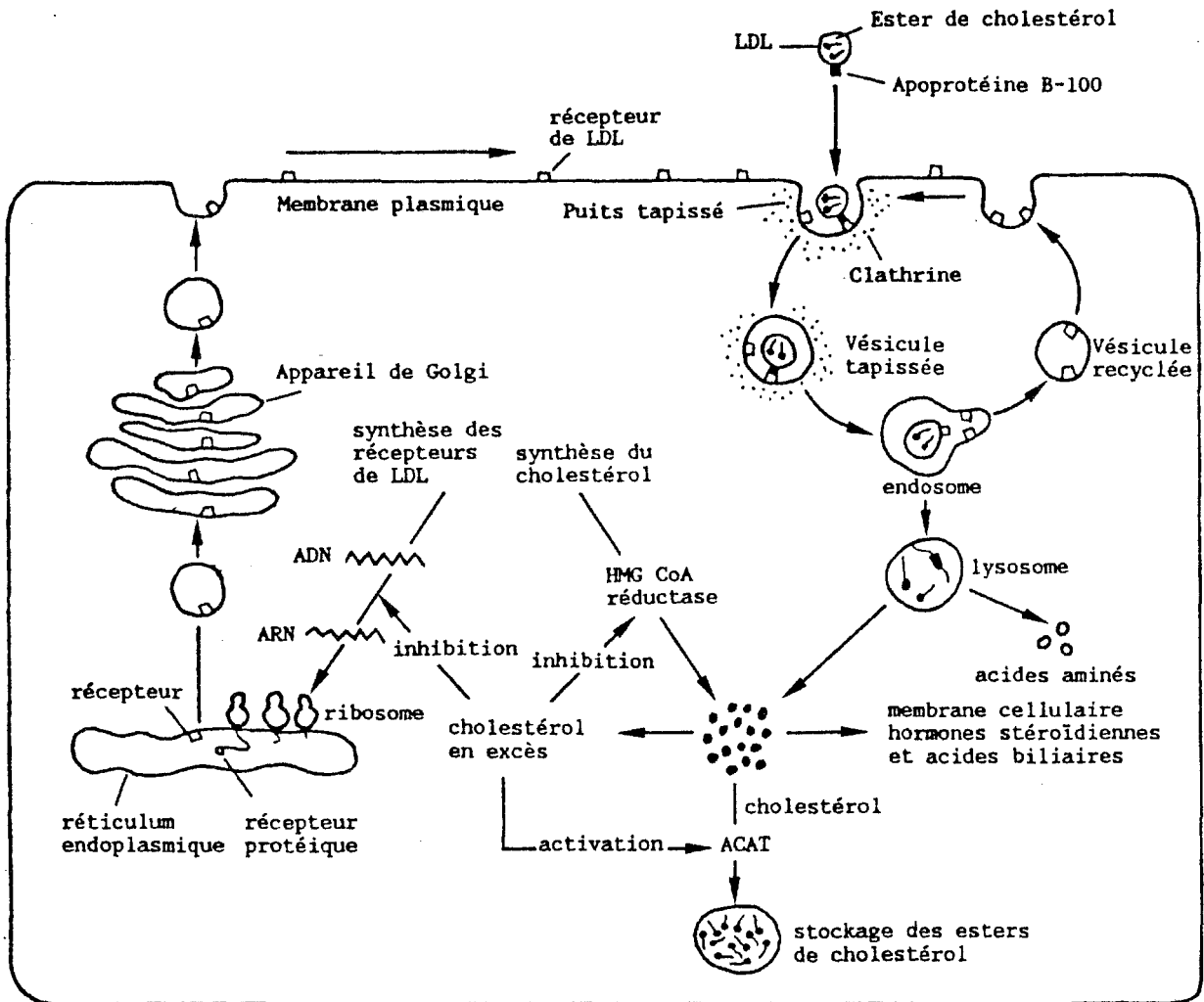
Après liaison des LDL aux récepteurs, mettant en jeu les charges négatives du récepteur riche en acides aminés acides, et les charges positives de l'apo B, le complexe LDL-récepteur subit alors une endocytose avec formation d'une vésicule dite "réceptosome". Il y a ensuite dissociation du complexe LDL-récepteur sous l'effet d'une baisse de pH. Le récepteur peut retourner à la surface des cellules pour un nouveau cycle.

Les LDL sont dégradées après fusion de la vésicule avec un lysosome. Les apoprotéines sont dégradées en acides aminés et les esters de cholestérol sont hydrolysés.

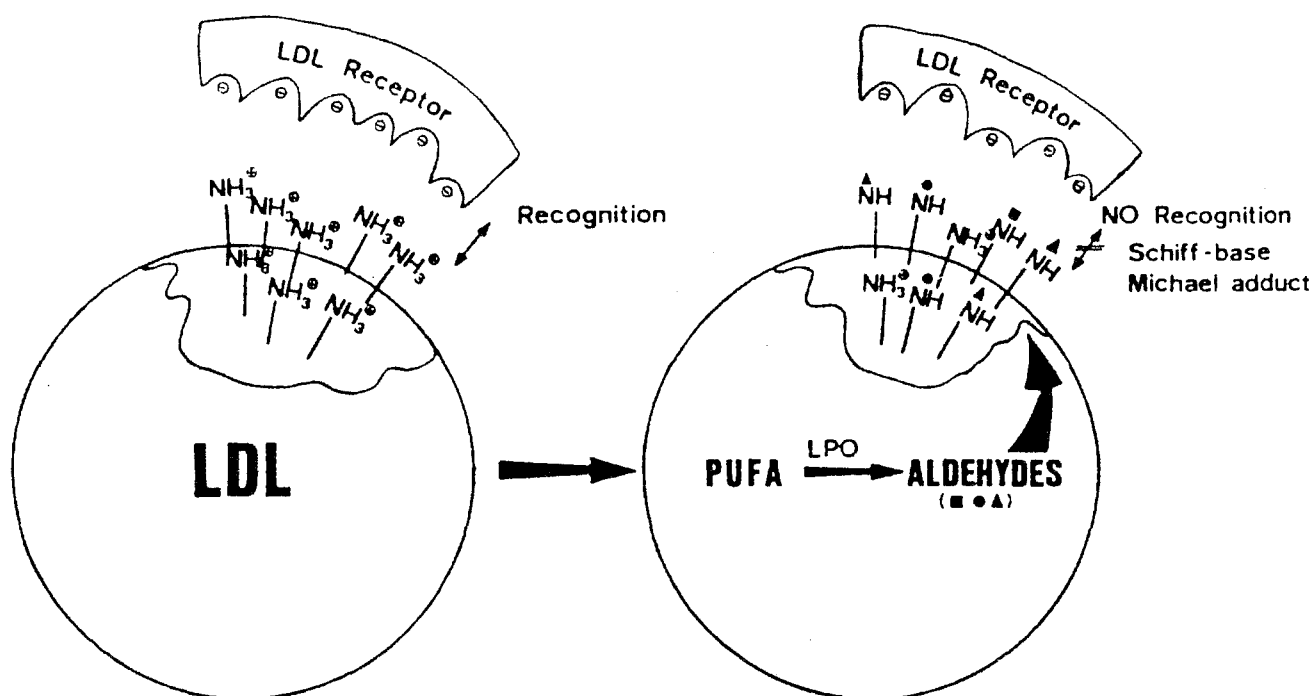
Le cholestérol libre est libéré dans la cellule et va réguler 3 processus intracellulaires permettant ainsi le contrôle et la stabilité du contenu cellulaire en cholestérol :

- le cholestérol libre réprime la synthèse de l'hydroxy-méthyl-glutaryl coenzyme A (HMG CoA réductase), enzyme régulateur de la synthèse endogène de cholestérol,
- il active une enzyme estérifiant le cholestérol, l'acyl CoA cholestérol acyltransférase (A.C.A.T.),
- enfin, il diminue la synthèse des récepteurs B/E des LDL.

Ainsi, grâce à ces mécanismes de régulation, la cellule garde une concentration stable en cholestérol non estérifié.



**Figure 4 :** Métabolisme cellulaire "normal" des LDL (Luc et coll. 1989) (12).



Scheme showing the principal points of the hypothesis. The LDL receptor recognizes a certain pattern of positive charged  $\text{NH}_3^+$  groups of the apo B in native LDL (*Left*). In oxidized LDL (*right*) aldehydes (■, ●, ▲) formed in situ from PUFAs by lipid peroxidation (LPO) have attacked and thereby neutralized  $\text{NH}_3^+$  groups. This LDL with modified apo B is no longer recognized by the LDL receptor but by the scavenger receptor

**Figure 5** : Modification de la reconnaissance des LDL par leurs récepteurs B/E après peroxydation ( Esterbauer et coll. 1988) (13).

### 1.3.2.2. Métabolisme des LDL oxydées : rôle des récepteurs "scavenger"

Après modification oxydative des LDL, en raison notamment des modifications de charge dues à la fixation sur les résidus lysine de produits de la peroxydation des lipides (figure 5) (Esterbauer et coll. 1988) (13), ces LDL modifiées ne sont plus reconnues par leur récepteur cellulaire, mais par les récepteurs dits "scavenger", découverts par Brown et Goldstein.

Ces récepteurs "scavenger" sont spécifique des LDL modifiées et présents en particulier au niveau des macrophages. Ils ont aussi été trouvés sur les cellules de Küppfer, les cellules endothéliales, particulièrement au niveau des cellules sinusoidales hépatiques.

Par des techniques immunohistochimiques, ce récepteur "scavenger" a été retrouvé au niveau de lésions athéromateuses chez l'homme, en particulier sur les macrophages.

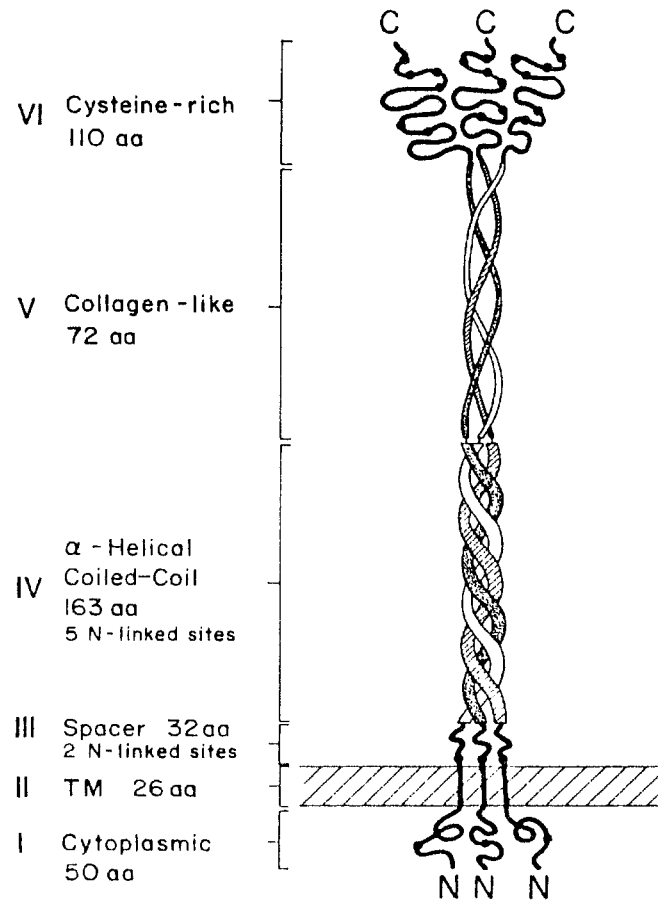
Sur le plan moléculaire, le récepteur scavenger serait une glycoprotéine dont le gène se situerait sur le chromosome 8 (Kelley et coll. 1991) (14).

Deux types d'ADN cytoplasmiques ont été identifiés dans les cellules bovines, murines et humaines, permettant théoriquement la production de 2 types de récepteurs. Le récepteur I comprendrait 6 domaines (figure 6) : une extrémité intracytoplasmique "N-terminale", une portion trans-membranaire, une séquence intermédiaire, une partie hélicoïdale, une région homologue au collagène, et une extrémité "C-terminale" riche en cystéine (Kodama et coll. 1990) (15). Cette dernière partie serait absente dans le récepteur de type II, mais elle ne serait pas indispensable à la liaison des LDL modifiées (Rohrer et coll. 1990) (16).

Initialement, ce récepteur a été décrit comme reconnaissant les LDL acétylées (Ac-LDL) (Goldstein et coll. 1978) (17), puis, plus tard, les LDL oxydées telles que les LDL modifiées par les cellules endothéliales (EC-LDL) (Henriksen et coll. 1981) (18), les cellules musculaires lisses (Heinecke et coll. 1986) (19), et les macrophages (Parthasarathy et coll. 1986) (20).

Sparrow et coll. (1989) (21) ont montré sur macrophage murin l'existence d'une autre classe de récepteurs "scavenger" reconnaissant les EC-LDL mais pas les Ac-LDL.

Arai et coll. (1989) (22) ont démontré qu'il existe au moins 3 types de récepteurs "scavenger" : un spécifique pour les LDL acétylées, un spécifique pour les EC-LDL, et le reste commun aux 2 types.



Schematic model of the predicted trimeric structure of the type I bovine scavenger receptor. Small filled circles in the cytoplasmic (domain I), spacer (domain III) and cysteine-rich (domain VI) domains represent the approximate positions of cysteine residues. Each monomer contains a single membrane-spanning domain (domain II). This model assumes that the  $\alpha$ -helical coiled-coil domain IV forms a single triple-stranded left-handed superhelix that merges with the right-handed collagen-like triple helix of domain V to form a single long fibrous stalk which would extend  $\sim 400$  Å. Alternative models based on the aggregation of subunits into higher-order oligomers are described in the text. Abbreviations: aa, amino acids; TM, transmembrane.

**Figure 6** : Modèle schématique de la structure trimérique présumptive d'un récepteur "scavenger" bovin de type I (Kodama et coll. 1990) (15).

Ces études de compétition indiquent donc la présence de plusieurs types de récepteurs "scavenger" pour les LDL acétylées et modifiées par le MDA ou par oxydation. A l'inverse, Kelley (1991) (14) a montré que ces 3 types de ligands se lient à une seule bande protéique de haut poids moléculaire dans des études de "ligand-blotting". Ce paradoxe pourrait s'expliquer par des différences d'affinité des divers ligands vis à vis du récepteur "scavenger".

Les LDL modifiées reconnues par les récepteurs "scavenger" sont internalisées, transférées aux lysosomes dans lesquels elles sont partiellement dégradées. Leur apoprotéine est attaquée par une protéinase et leurs lipides sont hydrolysés avec un relargage de cholestérol libre. Ce dernier stimule l'acyl-CoA cholestérol acyltransférase microsomale qui estérifie le cholestérol libre (figure 7) (Kottke et coll. 1987) (23). La captation par les récepteurs "scavenger" macrophagiques des LDL modifiées n'est pas régulée comme c'est le cas pour les récepteurs à apo B/E des LDL natives. Cela conduit à l'accumulation d'esters de cholestérol dans les macrophages (Goldstein et coll. 1979) (17).

Sparrow et coll. (1989) (21) ont montré une différence de taux de captation et de taux de dégradation par les macrophages, entre les LDL acétylées et les LDL modifiées par les cellules endothéliales. Après 5 heures d'incubation, les macrophages accumulent 6 fois plus de EC-LDL que de Ac-LDL, mais les Ac-LDL sont dégradées plus vite et dans une bien plus grande proportion que les EC-LDL (figure 8). Les EC-LDL entraînent donc une production de cholestérol estérifié à l'intérieur du macrophage inférieure à celle obtenue avec les Ac-LDL (Zhang et coll. 1990) (24).

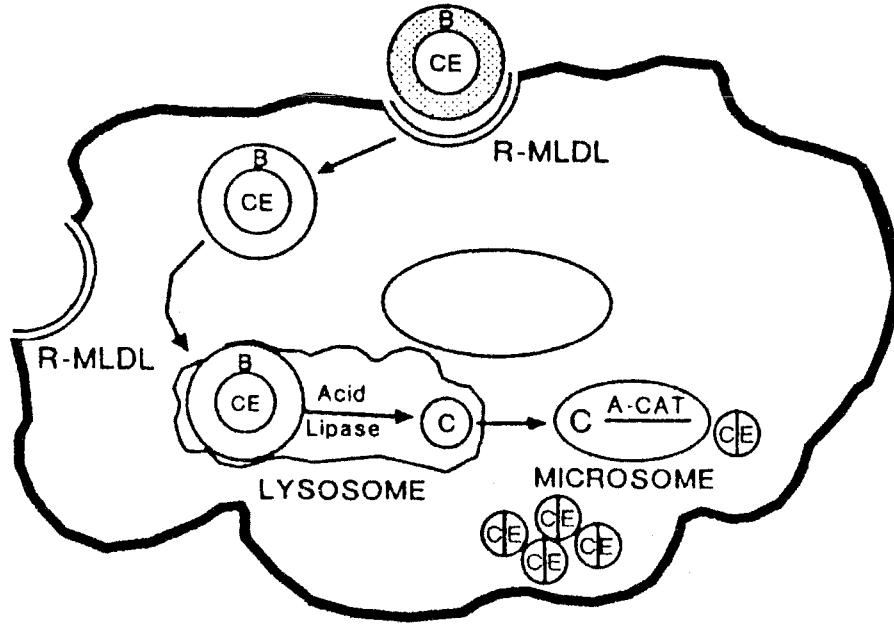
Les LDL captées n'étant pas dégradées à 100 % par le macrophage, le taux de captation cellulaire in vitro des LDL oxydées doit être déterminé non seulement par la mesure des produits de dégradation des LDL dans le milieu, mais aussi par la mesure des LDL fixées et internalisées par les macrophages.

*L'oxydation des LDL peut donc être mise en évidence par une captation et une dégradation accrues des LDL par le macrophage, comparées à celles obtenues avec des LDL natives.*

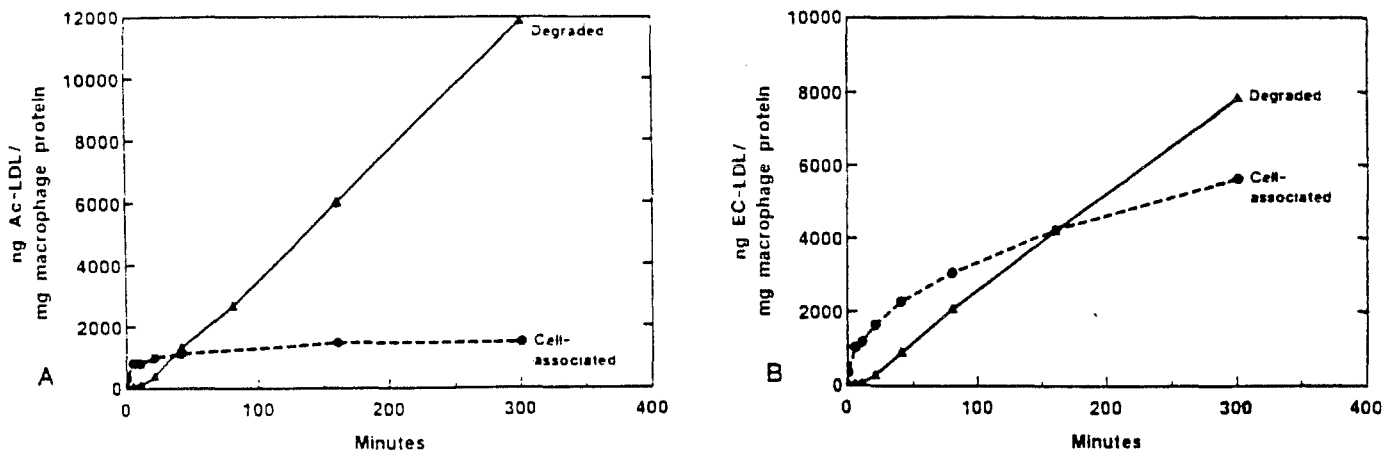
### **I.3.3. Conséquences de la peroxydation sur les propriétés biologiques des LDL**

Outre leur rôle dans l'accumulation de cholestérol à l'intérieur des macrophages [III] (figure 9), les LDL oxydées possèdent de nombreuses propriétés biologiques dont nous ne ferons que citer les principales :





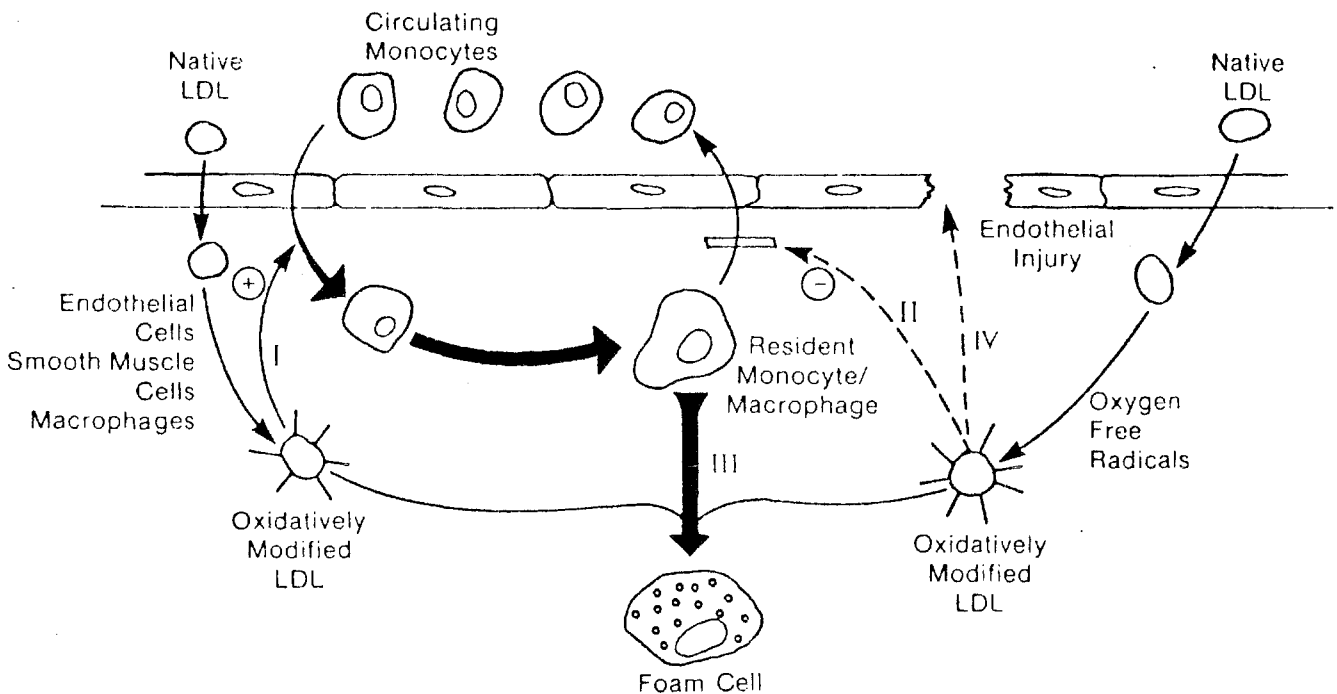
**Figure 7 :** Métabolisme à l'intérieur du macrophage des LDL modifiées (d'après Kottke 1987) (23).



**Time course of macrophage degradation of  $^{125}\text{I}$ -Ac-LDL and  $^{125}\text{I}$ -EC-LDL.** Macrophage monolayers were incubated at  $37^\circ\text{C}$  with  $4\ \mu\text{g}/\text{ml}$  of either  $^{125}\text{I}$ -Ac-LDL (A) or  $^{125}\text{I}$ -EC-LDL (B) under standard conditions. At various times the medium was harvested and assayed for degradation products ( $\blacktriangle$ ) as described under "Materials and Methods." The cells were washed once with medium, once with phosphate-buffered saline containing  $1\ \text{mg}/\text{ml}$  albumin, once with phosphate-buffered saline alone, and finally dissolved in  $0.2\ \text{N}$  NaOH. The radioactivity associated with the dissolved cells was measured ( $\bullet$ ) and then total cell protein determined.

**Figure 8 :** Cinétique de dégradation par le macrophage de LDL acétylées et de LDL modifiées par les cellules endothéliales (Sparrow et coll 1989) (21).

- les LDL oxydées ont une activité chimiotactique vis à vis des monocytes sanguins [I], favorisant l'adhésion des monocytes aux cellules épithéliales et leur différenciation en macrophages (Quinn et coll. 1987) (25),
- les LDL oxydées empêchent la migration des macrophages à partir de la paroi artérielle [II] (Steinberg et coll. 1989) (11),
- elles sont cytotoxiques, en particulier vis à vis des cellules endothéliales [IV] (Morel et coll. 1983) (26),
- elles favorisent l'agrégation plaquettaire (Steinberg et coll. 1989) (11),
- enfin, les LDL oxydées peuvent stimuler la production de facteurs de croissance cellulaires par les macrophages, les cellules musculaires lisses et les plaquettes (Steinbrecher et coll. 1990) (27).



**Figure 9 :** Propriétés biologiques des LDL modifiées (Steinberg et coll. 1989) (11).

#### **I.4. LES SYSTEMES DE PROTECTION ANTIRADICALAIRE (figure 3)**

In vivo, l'attaque radicalaire est modulée par des systèmes de protection.

##### **I.4.1. Les systèmes de défense enzymatiques**

Ils constituent la principale ligne de défense antioxydante au niveau intra-

cellulaire.

- Les superoxyde dismutases (SOD) catalysent la réaction de dismutation des anions superoxydes en  $H_2O_2$  :



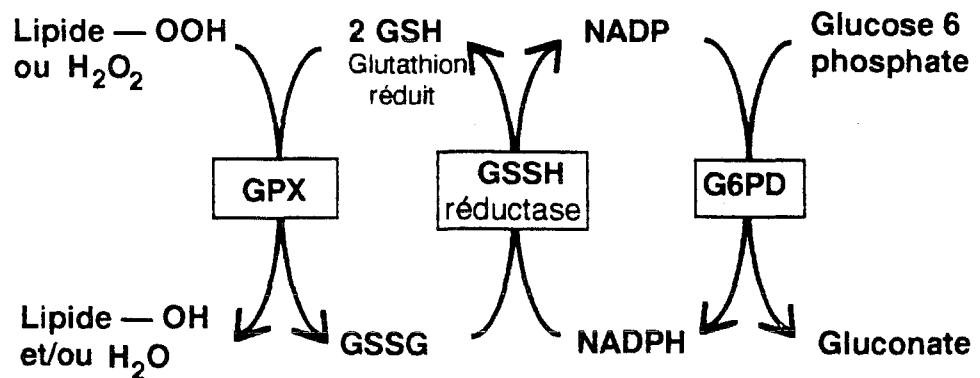
On trouve une SOD à cuivre et zinc dans le cytoplasme, et une SOD à manganèse dans les mitochondries.

Dans la SOD Cu-Zn, le cuivre joue le rôle le plus important en changeant de degré d'oxydation, tandis que le zinc participe à la structure en ayant un effet stabilisant (Fontecave et coll. 1991) (2), (Forman et coll. 1973) (28).

Le peroxyde d'hydrogène produit par la réaction est cytotoxique, et peut de plus entraîner la production de  $^\circ OH$  en présence de superoxyde et d'ions fer ou cuivre. Il est donc nécessaire d'éliminer aussi bien  $H_2O_2$  que  $O_2^\circ$ . De ce fait, la SOD "travaille" en coopération avec 2 autres types d'enzymes, les catalases et les glutathion peroxydases.

- Les catalases sont responsables de la réduction de  $H_2O_2$  en eau, localisées à l'intérieur des peroxysomes et particulièrement abondantes dans le foie et les érythrocytes (Fontecave et coll. 1991) (2).

- Les glutathion peroxydases (GPX), enzymes à sélénium cytoplasmiques et érythrocytaires, peuvent transformer  $H_2O_2$  en eau en présence de glutathion réduit. Si malgré l'action des enzymes sur  $O_2^\circ$  et  $H_2O_2$ , le radical  $OH^\circ$  est produit et déclenche un cycle d'auto-oxydation, les GPX interviennent à nouveau pour limiter la propagation radicalaire. En présence de glutathion réduit, elles peuvent transformer les hydroperoxydes organiques ROOH en acides gras hydroxylés ROH (Deby et coll. 1986) (29).



GPX : Glutathion peroxydase

GSSH réductase : Glutathion réductase

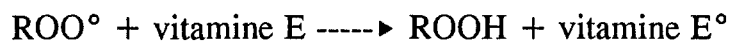
G6PD : Glucose 6 phosphate déshydrogénase.

- Les glutathion transférases (GST), possèdent une activité peroxydasique vis à vis des peroxydes organiques, et détoxifient de nombreux composés électrophiles (Proctor et coll. 1984) (30).

#### I.4.2. Les systèmes de défense non enzymatiques

- Les tocophérols (vitamine E) dont le plus actif est l'alpha-tocophérol, liposolubles et localisés dans les membranes cellulaires et mitochondriales, ainsi que dans les lipoprotéines.

La vitamine E intervient en piégeant les radicaux peroxydes et alkoxydes provenant de l'oxydation des A.G.P.I., en formant un radical tocophéroxyle peu réactif, permettant ainsi d'interrompre la réaction d'oxydation en chaîne.



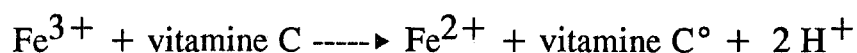
La vitamine E est l'anti-oxydant majeur des LDL. Lors de l'attaque radicalaire de celles-ci, l'alpha-tocophérol agit au niveau de la phase lipidique des LDL, tandis que les antioxydants hydrosolubles comme la vitamine C et l'acide urique suppriment l'oxydation induite par les radicaux libres de la phase aqueuse (Chazan et coll. 1987) (31), (Sato et coll. 1987) (32).

- La vitamine C a une activité synergique avec la vitamine E. En réduisant le radical tocophéroxyle, elle permet la régénération de cette dernière à l'interface entre la phase aqueuse et la phase lipidique des LDL (Sato et coll. 1990) (32).

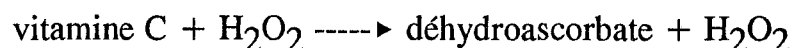
La vitamine C possède également un effet antiradicalaire propre (Halliwell et coll. 1990) (33).

Cependant, en combinaison avec des ions fer, la vitamine C peut devenir oxydante et entraîner la peroxydation lipidique.

Le mécanisme implique probablement la réduction du  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$  :



Or, au cours de l'oxydation de la vitamine C, il se forme du peroxyde d'hydrogène :



Ces 2 réactions fournissent  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{H}_2\text{O}_2$ , permettant la réaction de Fenton et ainsi la production de  $^\circ\text{OH}$  (Crystal 1991) (4).

- Les caroténoïdes dont le  $\beta$ -carotène peuvent piéger l'oxygène singulet et inhiberaient la lipoperoxydation en formant avec les radicaux peroxydes un radical plus stable (Krinsky 1989) (34).

- Les métallothionéines, protéines cytosoliques très riches en cystéine, peuvent fixer des métaux par leurs nombreux groupements thiols, particulièrement du zinc et du cuivre. Elles sont principalement trouvées dans le foie et les reins des mammifères (Thomas et coll. 1986) (35). Elles peuvent piéger les superoxydes et surtout les radicaux hydroxyles (Thornalley et coll.) (36).

- Le glutathion réduit qui, outre sa propriété de donneur d'électrons, possède un effet antiradicalaire propre. Cependant, en présence de fer, le glutathion réduit peut avoir une activité pro-oxydante (Crystal et coll. 1991) (4).

- D'autres molécules, enfin, telles que la céruloplasmine, l'albumine, la transferrine, l'haptoglobine, l'hémopexine, le glucose, le mannitol et l'acide urique sont, avec la vitamine C, les antioxydants principaux de la phase aqueuse du plasma et des autres fluides extracellulaires (Halliwell et coll. 1990) (33).

## **II. QUEL EST LE ROLE DU ZINC DANS LA LUTTE CONTRE LES RADICAUX LIBRES ?**

### **II.1. LE ZINC EN BIOLOGIE** (Arnaud et coll. 1991) (37)

On sait depuis longtemps que le zinc est un micronutriment essentiel pour une grande variété d'espèces animales, de plantes et de micro-organismes.

Chez le rat, les besoins sont de 12 mg de zinc par kg de régime, chez l'homme, 15 mg de zinc/jour sont nécessaires en moyenne.

Les fonctions du zinc sont très nombreuses et nous ne les développerons pas ici.

Sur le plan biochimique, le zinc intervient dans l'activité de près de 200 enzymes en ayant un rôle structural, régulateur ou catalytique. Le zinc joue ainsi un rôle dans le métabolisme des acides nucléiques, des protéines, des glucides, des lipides, des acides gras et des hormones.

Il joue également un rôle fondamental dans l'expression des gènes.

Sur le plan physiologique, le zinc est indispensable à la croissance et la multiplication cellulaire, la cicatrisation, l'intégrité cutanée, le métabolisme osseux, l'immunité, la protection contre les radicaux libres, la gustation, la vision et le fonctionnement cérébral.

En raison de l'implication du zinc dans les différents métabolismes et fonctions de l'organisme, en cas de carence, les répercussions sont multiples, tant sur le plan métabolique que physiologique.

Les conséquences du déficit en zinc ont fait l'objet de plusieurs revues dont Arnaud et coll. (1991) (37), Mc Clain et coll. 1985) (38) . Nous ne citerons ici que les symptômes principaux observés lorsque cette carence est sévère :

- retard de croissance,
- diarrhée chronique,
- anorexie,
- troubles de la peau,
- mauvaise cicatrisation,
- alopécie,
- hypogonadisme,
- immunodépression,
- troubles du comportement (irritabilité,...).

En rapport avec notre travail, nous évoquerons plus en détail le rôle physiologique du zinc comme antioxydant, et l'influence de la carence en zinc sur le métabolisme des radicaux libres et des A.G.P.I.

## **II.2. LE ZINC COMME ANTIOXYDANT (Bray et coll. 1990) (39)**

Plusieurs études ont montré que le zinc intervient dans le métabolisme des radicaux libres et ont suggéré un rôle d'antioxydant biologique.

### **II.2.1. Les propriétés antioxydantes du zinc in vitro**

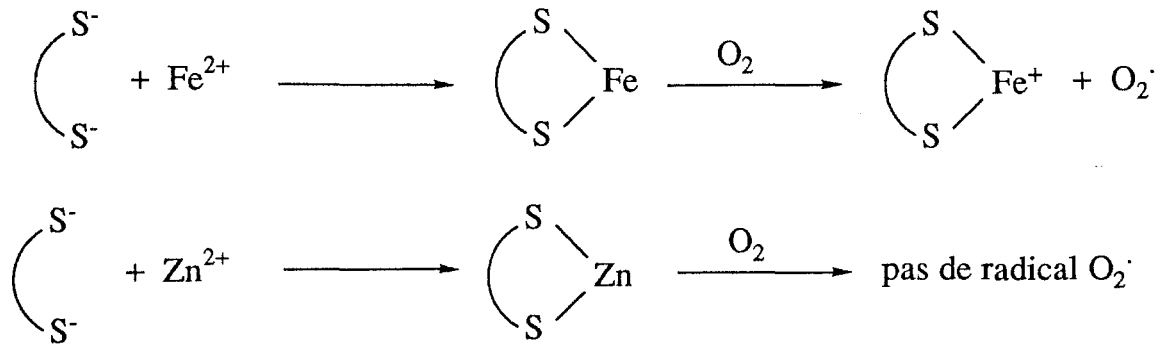
#### *II.2.1.1. Dans des systèmes chimiques définis*

Il a été montré que :

- le zinc protège les groupements -SH contre l'oxydation, empêchant la formation de ponts disulfures intramoléculaires. Ainsi, le zinc n'est pas indispensable à l'activité catalytique de la  $\delta$ -amino-lévuinate-deshydratase, mais il protège l'enzyme contre l'oxydation, permettant ainsi la maintenance de ses fonctions. Le zinc pourrait se lier directement aux groupements thiols, ou pourrait diminuer leur réactivité par un changement conformationnel (Anonyme 1986) (40).

- le zinc inhibe la production des radicaux  $\text{OH}^\circ$  et  $\text{O}_2^\circ$  par les métaux de transition au cours de la réaction de Fenton. Il rentrerait en compétition avec le fer et le cuivre, notamment en diminuant la chélation de ces derniers par la cystéine. Or, le

fer lié à celle-ci peut transférer des électrons à l'oxygène et produire des radicaux libres (Searle et coll. 1982) (41).



- le zinc inhibe la peroxydation lipidique provoquée par un mélange FeSO<sub>4</sub>/acide ascorbique au niveau de liposomes et de micelles lipidiques (Szebeni et coll. 1988) (42). Le zinc entrerait en compétition avec les ions Fe<sup>2+</sup> pour la formation de complexes entre de l'oxygène, Fe<sup>2+</sup> et les doubles liaisons des acides gras ( Peterson et coll. 1981) (43).

### II.2.1.2. Au niveau des membranes et des organites intra-cellulaires

Le zinc joue un rôle important en augmentant la stabilité des membranes. Cet effet a été l'objet de plusieurs revues, dont celles de Chvapil (1973) (44) et de Bettger et coll. (1981) (45).

L'effet stabilisant du zinc semble en partie dû à un effet protecteur vis à vis de la peroxydation lipidique, mais il semble que cela ne soit pas toujours le cas. Ainsi, Bettger et coll (1978) (46) ont montré chez le rat qu'au niveau des membranes érythrocytaires, le zinc diminue la lyse induite par le cuivre, mais sans diminuer la production de MDA, donc sans empêcher la lipoperoxydation.

D'autres études rapportent que le zinc peut diminuer la peroxydation lipidique au niveau membranaire.

Girotti et coll. (1985) (47) ont montré que le zinc diminue la production d'hydroperoxydes organiques et de MDA lors de l'exposition de membranes érythrocytaires au système fer/xanthine/xanthine-oxydase.

La même équipe a rapporté que les métallothionéines à zinc diminuent également la peroxydation lipidique au niveau des membranes érythrocytaires exposées au même système oxydant. Dans ce cas, la protection antiradicalaire semble mettre en jeu le relargage d'ions zinc après oxydation des métallothionéines, et la capture de ces ions zinc par les membranes (Thomas et coll. 1986) (35).

L'effet antiradicalaire du zinc mettrait en jeu l'inhibition du transport des électrons par les chaînes de transport mitochondriales et microsomales (Bray et coll. 1990) (39).

Le zinc exerce aussi un effet protecteur en inhibant l'oxydation microsomale du NADPH et le métabolisme des drogues dépendant du cytochrome P-450 (Jeffery 1983) (48).

### *II.2.1.3. Dans les systèmes cellulaires*

Le zinc diminue la production des anions superoxydes dans les neutrophiles humains isolés activés, et diminue celle des MDA et des radicaux libres dans les hépatocytes en culture (Bray et coll. 1990) (39).

### **II.2.2. Les effets antioxydants in vivo de doses pharmacologiques de zinc**

Le zinc per os ou en perfusion exerce un effet protecteur chez le rat vis à vis des lésions hépatiques induites par le  $\text{CCl}_4$  (Chvapil et coll. 1973) (49). Or ce xénotique est métabolisé au niveau des microsomes hépatiques en donnant un radical très toxique qui initie la peroxydation des A.G.P.I. de différentes membranes.

Le zinc pourrait exercer son effet protecteur en empêchant le métabolisme du  $\text{CCl}_4$  en  $\text{CCl}_3^\circ$  par les systèmes microsomaux dépendant du NADPH (Jeffery 1983) (48).

Une autre hypothèse fait intervenir les métallothionéines. Ainsi, Clarke et coll. (1985) (50) ont montré que l'administration de zinc à des rats, plusieurs heures avant traitement par le  $\text{CCl}_4$ , augmente nettement les concentrations de métallothionéines hépatiques qui peuvent piéger les métabolites radicalaires du  $\text{CCl}_4$ .

Bien qu'une supplémentation orale importante en zinc diminue la peroxydation au niveau du foie et l'hémolyse des érythrocytes, Chvapil et coll. (1974) (51) ont montré que cette supplémentation ne protège pas contre la lipoperoxydation au niveau du cerveau, du testicule, du poumon et du rein. Les auteurs pensent que ces organes ne sont pas capables d'augmenter leur contenu en zinc, tandis que le tissu hépatique peut stocker le zinc, en grande partie sous forme de métallothionéines.

Le zinc exerce un effet protecteur vis à vis de la mortalité due aux rayonnements gamma chez l'animal (Matsubara et coll. 1986) (52).

Le zinc protège aussi contre la toxicité aigüe de l'éthanol dont on sait qu'elle est en partie liée à la production de radicaux libres (Dar et coll. 1986) (53).



L'administration de doses pharmacologiques de zinc pourrait induire la synthèse de protéines telles que les métallothionéines, et altérer le métabolisme d'autres éléments tels que le fer et le cuivre, tout ceci contribuant indirectement aux effets antioxydants du zinc.

### **II.3. CARENCE EN ZINC ET OXYDATION**

#### **II.3.1. Des études ont montré un effet protecteur de la vitamine E sur l'expression de certains effets de la carence en zinc**

Bettger et coll. (1980) (54) ont établi que la production de MDA au niveau de la peau est significativement plus élevée chez des poulets carencés en zinc par rapport à leurs témoins non carencés. De fortes concentrations de vitamine E dans la ration alimentaire des poulets permettent de diminuer cette production de MDA. Chez le poulet carencé en zinc, on observe le développement de lésions sévères de la peau, ces lésions étant encore plus importantes lorsque l'alimentation est riche en A.G.P.I. Une supplémentation alimentaire importante en vitamine E prévient l'apparition de ces lésions.

Les auteurs ont montré que les améliorations observées avec l'alpha-tocophérol n'étaient pas dues à une absorption améliorée du zinc, ni à une modification du statut en zinc.

D'autre part, Bunk et coll. (1989) (55) ont rapporté une baisse de la concentration plasmatique en vitamine E chez les rats carencés en zinc, par rapport à leurs témoins "pair-fed". Ces rats témoins ne sont pas carencés en zinc mais reçoivent la même quantité de nourriture que les rats carencés, qui ont une inappétence secondaire à la carence.

Il est donc possible que certains effets pathologiques de la carence en zinc puissent être attribués à un métabolisme altéré de la vitamine E.

#### **II.3.2. Carence en zinc et métabolisme des radicaux libres**

L'effet antioxydant du zinc alimentaire pourrait être dû à l'influence du statut en zinc des animaux sur le métabolisme des radicaux libres

*II.3.2.1. Etudes suggérant une production accrue de radicaux libres dans les tissus ou les membranes de rats carencés en zinc*

Bray et coll. (1986) (56) ont rapporté une augmentation significative de la production de radicaux libres au niveau des microsomes pulmonaires chez des rats carencés en zinc. Cette production de radicaux libres endogènes semble résulter de la peroxydation lipidique induite par le découplage de la chaîne de transport d'électrons dépendante du NADPH.

Hammermueller et coll. (1987) (57) ont montré chez le rat une production accrue d' $H_2O_2$  dépendante du NADPH au niveau des microsomes pulmonaires et hépatiques, et y ont mesuré une concentration en fer augmentée.

Günther et coll. (1989) (58), chez des rates carencées et gravides, ont rapporté un accroissement des MDA dans les mitochondries et les microsomes du foie maternel et foetal, du rein maternel, ainsi que dans les microsomes de poumon maternel et les mitochondries de poumon foetal.

### *II.3.2.2. Carence en zinc et systèmes de défense antiradicalaire*

Taylor et coll. (1988) (59) ont étudié les effets de la carence en zinc sur le système primaire de défense antiradicalaire chez le rat, afin de préjuger *in vivo* des conséquences de la production accrue de radicaux libres observée *in vitro* dans les études précédentes. En effet, cette production accrue pourrait n'avoir aucune conséquence *in vivo*, si les systèmes de défense antioxydants sont adéquats.

Ils ont montré que l'activité de la SOD Cu-Zn pulmonaire est plus élevée chez les rats carencés en zinc que chez les témoins pair-fed. Or, l'activité de la SOD Cu-Zn est directement influencée par la concentration tissulaire de cuivre. Cette augmentation d'activité serait donc due à l'accroissement du taux de cuivre pulmonaire observée chez le rat carencé en zinc.

D'autre part, la production accrue de radicaux libres peut induire une augmentation de la SOD Cu-Zn dans le poumon de rat. Or, comme nous l'avons vu précédemment, la carence en zinc accroît la production de radicaux libres dans les microsomes pulmonaires (Bray et coll. 1986) (56), ce qui pourrait également expliquer l'activité SOD Cu-Zn élevée dans le poumon.

L'activité de la GPX ne varie pas selon la teneur en zinc du régime.

La restriction alimentaire provoquée par la carence est responsable d'une diminution des concentrations d'alpha-tocophérol et d'ascorbate dans le foie et le poumon.

Au niveau pulmonaire, les métallothionéines sont diminuées chez le rat carencé en zinc par rapport aux témoins pair-fed et *ad libitum*, mais de façon non significative.

Sur le plan hépatique, la concentration en métallothionéines est significativement diminuée chez les rats CZ par rapport aux 2 lots témoins.

Enfin, les concentrations tissulaires en fer aux niveaux hépatique et pulmonaire sont élevées dans les groupes carencés et pair-fed, et pourraient promouvoir une génération accrue de radicaux libres.

Les auteurs en ont conclu que la carence en zinc entraîne peu de changements au niveau des systèmes protecteurs antiradicalaires. Cependant, dans des circonstances entraînant une production accrue de radicaux libres, ces modifications modérées du statut en antioxydants pourraient se traduire par un dépassement des défenses antiradicalaires.

### *II.3.2.3. Carence en zinc et susceptibilité aux stress oxydatifs*

Ainsi, d'autres travaux de Taylor et coll. (1989) (60), dans lesquels des rats carencés et leurs témoins ont été placés sous 85 % d'O<sub>2</sub> pendant 7 jours, suggèrent que les animaux CZ pourraient ne pas tolérer un stress oxydatif supplémentaire. Ils ont observé des lésions pulmonaires plus importantes chez les animaux CZ que chez leurs témoins pair-fed (PF) et ad libitum (AL = nourris à volonté avec un régime non déplété en zinc), ces lésions étant évitées par un rétablissement du zinc dans l'alimentation au début de l'hyperoxie (groupe repleté). Ils ont également noté une diminution de la zincémie de 30 % dans les groupes repletés, PF et AL après 7 jours d'exposition à l'hyperoxie.

Coudray et coll. (1991) (61) ont évalué les effets de la carence en zinc sur la peroxydation lipidique chez des rats soumis à l'administration d'alcool. Ils ont observé que la combinaison de la carence en zinc et de l'administration d'éthanol entraîne une production accrue de MDA aux niveaux hépatique et cardiaque, et perturbe la fonction contractile du coeur isolé perfusé soumis à des conditions préischémiques.

Ces résultats montrent que le zinc pourrait jouer un rôle *in vivo* dans la protection membranaire, durant un stress oxydatif important.

Enfin, Faure et coll. (1991) (62) ont soumis des LDL de rat à un stress oxydatif réalisé par un mélange fer/ascorbate. Après ce stress, la teneur en MDA des LDL a été multipliée par 4 par rapport à l'état natif pour les LDL de rats normaux, alors qu'elle a été multipliée par 7 pour les LDL de rats carencés en zinc.

Cette susceptibilité accrue à l'oxydation dans la carence en zinc n'a pas été retrouvée au niveau des autres fractions VLDL, IDL, et HDL.

### III. CARENCE EN ZINC ET A.G.P.I.

La carence en zinc entraîne des perturbations dans le métabolisme des A.G.P.I. en agissant à 2 niveaux (Cunnane 1988) (63) :

#### III.1. LA VOIE DE DESATURATION-ELONGATION DES ACIDES GRAS.

En diminuant la conversion des précurseurs C18:2 n-6 (acide linoléique) et C18:3 n-3 (acide linoléique) en métabolites de plus longue chaîne, via les  $\delta$ -6,  $\delta$ -5 et  $\delta$ -4 désaturases (figure 10), elle entraîne notamment des carences en acide arachidonique C20:4 n-6 et en acide docosahexaénoïque C22:6 n-3, ainsi qu'une augmentation du taux de C18:2 n-6 (Cunnane 1988) (63).

Chez l'animal, les effets de la carence en zinc sur le métabolisme des A.G.P.I. varient selon le tissu étudié, le degré de la carence et l'état physiologique, mais aussi selon le type de lipides étudié, les conséquences du déficit en zinc n'étant pas les mêmes selon qu'il s'agisse de triglycérides, de phospholipides ou d'acides gras libres.

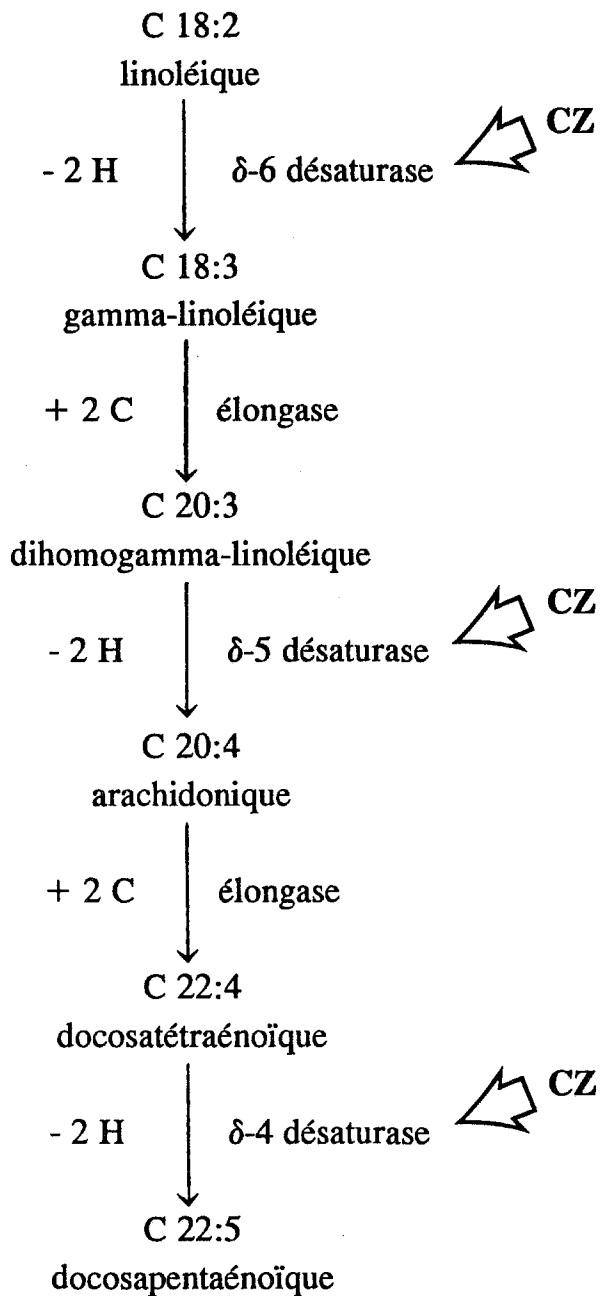
Ainsi, Cunnane et coll. (1984) (64), ont montré que la carence en zinc entraîne une augmentation du rapport C18:2 n-6 / C20:4 n-6 dans les phospholipides totaux du plasma, du foie et des testicules. Cette variation est due à une diminution du C20:4 n-6 au niveau des phospholipides totaux du plasma, à une augmentation du C18:2 n-6 au niveau du testicule, et à la conjugaison des deux au niveau hépatique.

La même étude a montré que les changements de composition en acides gras provoqués par la carence en zinc sont différents pour les phospholipides totaux et pour les triglycérides. Pour les premiers, les effets du déficit en zinc sont ceux mentionnés ci-dessus avec un rapport C18:2 n-6 / C20:4 n-6 augmenté. En ce qui concerne les triglycérides hépatiques, les acides gras C18:2 n-6 et C20:4 n-6 sont tous les deux diminués, tandis qu'ils sont augmentés dans les triglycérides de l'épididyme.

Cunnane et coll. (1988) (65) ont démontré qu'avec un régime à 3-4 mg de zinc par kg, la prise alimentaire des animaux n'est pas significativement diminuée par rapport aux témoins non carencés en zinc (soumis à un régime à 40 mg de zinc par kg), mais que la composition en A.G.P.I. des phospholipides plasmatiques et hépatiques varie cependant de façon significative.

#### III.2. L'INCORPORATION DES A.G.P.I. DANS LES LIPIDES

Cunnane et coll. (1986) (66) ont étudié l'incorporation de l'acide linoléique et



**Figure 10** : Chaîne de conversion des acides gras de la famille Omega-6 : Points d'impacts de la carence en zinc (CZ).

de l'acide arachidonique dans les leucocytes de patients atteints de la maladie de Crohn, sachant que chez ces malades, les leucocytes ont un contenu en zinc plus bas que ceux d'une population normale.

Ils ont mis en évidence, par rapport à des témoins normaux, une incorporation diminuée des acides linoléiques et arachidoniques dans la fraction phosphatidyl-choline, et de l'acide arachidonique dans la fraction phosphatidyl-éthanolamine et dans les triglycérides. Ils ont montré parallèlement une augmentation dans les leucocytes des taux d'acides linoléiques et arachidoniques libres.

Ces auteurs ont observé que dans la maladie de Crohn, le taux de zinc leucocytaire était positivement corrélé avec le pourcentage d'incorporation de l'acide arachidonique dans la phosphatidyl-choline.

Cunnane (1988) (63) pense que dans ce cas, l'effet du déficit en zinc s'explique par une augmentation d'activité de la Phospholipase A<sub>2</sub>, qui clive les acides gras à longue chaîne à partir de la position 2 des phospholipides. En effet, le zinc inhibe normalement l'activité de cette enzyme et cet effet répresseur serait donc levé par le déficit en zinc.

## CONCLUSION

Le rôle antioxydant du zinc a suscité de nombreux travaux. Leurs résultats sont parfois contradictoires, mais il semble malgré tout que le zinc joue un rôle important dans la lutte contre les radicaux libres.

Les LDL sont une cible privilégiée de l'attaque radicalaire. La carence en zinc pourrait favoriser leur oxydation in vivo, ou entraîner des modifications, notamment dans leur composition en acides gras, les rendant plus fragiles vis à vis d'un stress oxydant in vitro.

La peroxydation des LDL peut être mise en évidence in vitro par des taux de captation et de dégradation par les macrophages augmentés, comparés à ceux obtenus avec des LDL natives.

**DEUXIEME PARTIE :**

**TRAVAUX PERSONNELS**

## OBJECTIF DE NOTRE TRAVAIL

Il s'agissait d'apporter un élément de réponse aux questions suivantes :

1- Dans nos conditions d'expérience, la carence en zinc favorise-t-elle une production des radicaux libres, en provoquant des perturbations au niveau des systèmes de défense antioxydants ou des modifications dans la nature des acides gras ?

2- Le déficit en zinc entraîne-t-il une susceptibilité accrue des LDL à la peroxydation, s'accompagnant d'une augmentation de leur captation par le macrophage ?

Pour répondre à ces hypothèses, nous nous sommes proposée, sur modèle animal carencé en zinc :

- d'isoler les LDL et de mesurer leur captation et leur dégradation par les macrophages, avant et après stress oxydatif in vitro,

- de suivre l'évolution, au cours de la carence, de la SOD érythrocytaire et des GPX plasmatiques, composants du système de défense antiradicalaire, ainsi que celle du malondialdéhyde plasmatique, marqueur de la peroxydation,

- de déterminer la teneur du plasma des animaux en vitamines A et E, et la nature de ses acides gras.



**I : MATERIEL ET**

**METHODES**

## **I.1. MISE AU POINT, SUR LDL DE RATS TEMOINS, DE LA TECHNIQUE DE CAPTATION DES LDL PAR LE MACROPHAGE**

### **I.1.1. Modèle animal**

Les rats Wistar mâles pesant de 300 à 400 grammes (IFFA CREDO) ont été nourris à volonté avec un régime en granulés fourni par U.A.R. (Ref. A 04).

### **I.1.2. Prélèvements**

Les rats à jeun ont été anesthésiés par injection intrapéritonéale de Pentobarbital sodique (50 mg/kg) et thoracotomisés. Le sang a été prélevé par ponction intracardiaque et collecté dans des tubes contenant une solution d'E.D.T.A. dipotassique (FLUKA) à 15 % (P/V) à raison de 1 volume d'anticoagulant pour 99 volumes de sang.

Les prélèvements ont immédiatement été placés à + 4 °C, température toujours maintenue lors des traitements ultérieurs. Le sang a été centrifugé 10 minutes à 3000 rpm et le plasma soumis à l'ultracentrifugation dans les 24 heures.

### **I.1.3. Etude des LDL**

#### **I.1.3.1. Isolement et contrôle**

Les isolements ont été effectués à partir du pool plasmatique de 2 rats. Les LDL ont été isolées dans la gamme de densités de 1,019 à 1,055 par ultracentrifugation de flottation séquentielle selon la méthode de Havel et coll. (1955) (67), modifiée par Radding et Steinberg (1960) (68). Elles ont ensuite été dialysées pendant 18 heures contre deux fois un litre de NaCl 9 ‰, E.D.T.A. 0,1 ‰, pH 7,4 ajusté avec du Tris.

La concentration des LDL après dialyse, exprimée en protéines, a été déterminée par la méthode de Peterson 1977) (69).

La pureté des LDL a été vérifiée par électrophorèse en gel d'acrylamide (gradient 2-16, PHARMACIA, Ref.192119-01) par le Laboratoire de Biochimie A selon la technique de Gambert et coll. (1988) (70).

Une migration en parallèle des LDL ultérieurement marquées et oxydées a également été effectuée.

### I.1.3.2. Marquage radioactif des LDL

La technique de Macfarlane (1958) (71) modifiée par Bilheimer et coll. (1972) (72) a été ici adaptée au faible volume et à la faible concentration des LDL de rats. Les LDL ont été marquées dans les 24 heures suivant leur isolement.

#### *I.1.3.2.1. Protocole de marquage*

Les LDL ont été amenées à pH alcalin par addition de tampon glycine pH 9,8 (2,5:1 V/V).

Après l'addition de l'iode  $^{125}\text{I}$  ( $\text{NaI}^*$  en solution alcaline 100 mCi/ml AMERSHAM Ref IMS 30) à raison de 100  $\mu\text{Ci}$  pour 100  $\mu\text{g}$  de protéines à marquer, la réaction d'échange isotopique a été déclenchée par l'addition de chlorure d'iode 0,033 mM. Le volume de solution de chlorure d'iode à ajouter a été déterminé en fonction du rapport I/P initial choisi ( $I/P_i = \text{nombre de molécules d'iode} / \text{nombre de molécules d'apo B}$ ).

Après élimination de l'iode radioactif non lié aux LDL par chromatographie d'échange d'anions (colonne de résine Dowex AG 1 X 2, équilibrée avec du tampon PBS à pH 7,4), les LDL ont été éluées par le même tampon, et dialysées contre deux fois 2 litres de PBS pH 7,4 pendant 18 heures.

Les LDL marquées ( $^{125}\text{I}$ -LDL) ont ensuite été conservées à 4°C, et soumises à la captation par les macrophages dans les 48 heures suivantes.

#### *I.1.3.2.2. Contrôles du marquage*

Les mesures de radioactivité ont été effectuées par un compteur Gamma PACKARD (Ref. Cobra 5000).

##### *I.1.3.2.2.1. Rapport I/P final (I/P f)*

Il correspond au nombre de molécules d'iode fixées par molécule d'apo B et doit être inférieur à 3,4 pour les LDL de rats.

$$I/P f = I/P i \times \text{Rendement de marquage}$$

##### *I.1.3.2.2.2. Pourcentage de radioactivité liée aux protéines*

Il a été déterminé par précipitation à l'acide trichloracétique (TCA) à 20 % (P/V) d'une dilution au 1/100<sup>ème</sup> des  $^{125}\text{I}$ -LDL. Après centrifugation et filtration

du surnageant sur filtre MILLIPORE 0,45  $\mu\text{m}$  (Ref.SJHV013NS), la radioactivité du filtrat a été mesurée.

#### *1.1.3.2.2.3. Pourcentage de radioactivité liée aux lipides*

Il a été déterminé par solubilisation des lipides et précipitation des protéines de LDL par un mélange Hexane/Isopropanol (3:2 V/V) (Kolarovic et coll. 1986) (73), et après centrifugation, mesure de la radioactivité du surnageant.

#### *1.1.3.2.2.4. Activité spécifique des $^{125}\text{I}$ -LDL*

La concentration en protéines des LDL marquées a été déterminée après dialyse par la méthode de Peterson (1977) (69) afin d'établir le rapport radioactivité / masse.

### *1.1.3.3. Dégradation et captation des $^{125}\text{I}$ -LDL par le macrophage (figure 11)*

#### *1.1.3.3.1. Conditions de culture des macrophages*

Les expériences ont été effectuées sur une lignée de cellules d'origine murine à propriété macrophagique étudié par Via et coll. (1985) (74). Cette lignée P 388 D<sub>1</sub> a été fournie par American Tissue Culture Collection (Ref.TIB 63) Elle a été entretenue dans du milieu RPMI 1640 (PBS-orgenics Ref.01.104.1A) supplémenté avec 15 % de sérum de veau foetal (PBS-orgenics Ref.04.001), 0,3 mg/ml de L. Glutamine (GIBCO Ref.061-05039 D) et en concentration finale , 170 UI/ml et 0,17 mg/ml de Pénicilline-Streptomycine (BOEHRINGER Ref.1.074.440), 54  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Kanamycine (BOEHRINGER Ref.1.074.466), et 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  d'Amphotéricine B (Fungizone<sup>R</sup> SQUIBB, poudre pour préparation injectable) = Milieu M .

Les cultures ont été effectuées à 37°C sous 5 % de CO<sub>2</sub>, dédoublées une fois par semaine, et le milieu renouvelé à la même fréquence.

Pour l'incubation avec les  $^{125}\text{I}$ -LDL, les cellules ont été mises en puits dans des boîtes multi-puits FLOW LABORATORIES (Ref.76-053-05) dans les 72 heures précédant l'expérience, à la densité de 500000 cellules par ml de milieu M et par puits. Le milieu de culture a été renouvelé après 48 heures.

#### *I.1.3.3.2. Oxydation des $^{125}\text{I}$ -LDL*

Pour chaque lot de rats, une fraction de  $^{125}\text{I}$ -LDL a été soumise, le matin de l'expérience, au stress oxydatif par incubation 1/2 heure à  $37^{\circ}\text{C}$  avec, en concentration finale,  $10\ \mu\text{M}$  de sulfate de fer et  $250\ \mu\text{M}$  d'acide ascorbique (Faure et coll. 1991) (62). Les  $^{125}\text{I}$ -LDL oxydées ont ensuite été placées dans de la glace.

#### *I.1.3.3.3. Incubation des macrophages avec les $^{125}\text{I}$ -LDL*

Le milieu M des puits de cellules a été remplacé par 1 ml de DMEM (GIBCO Ref.041-01885 M) afin de les rincer.

Les  $^{125}\text{I}$ -LDL natives et oxydées ont été apportées aux macrophages dans du DMEM. Trois concentrations ont été étudiées pour réaliser une courbe de saturation : 5, 10 et  $25\ \mu\text{g}$  de  $^{125}\text{I}$ -LDL par ml de DMEM et 3 essais ont été réalisés respectivement avec des  $^{125}\text{I}$ -LDL à 10, 9 et à  $5\ \mu\text{g} / \text{ml}$ .

Chaque puits a reçu 0,5 ml de milieu.

Afin de déterminer la dégradation spontanée des  $^{125}\text{I}$ -LDL, nous avons incubé ce même milieu dans des puits sans cellules. L'activité ainsi mesurée a permis de corriger les valeurs obtenues avec les macrophages.

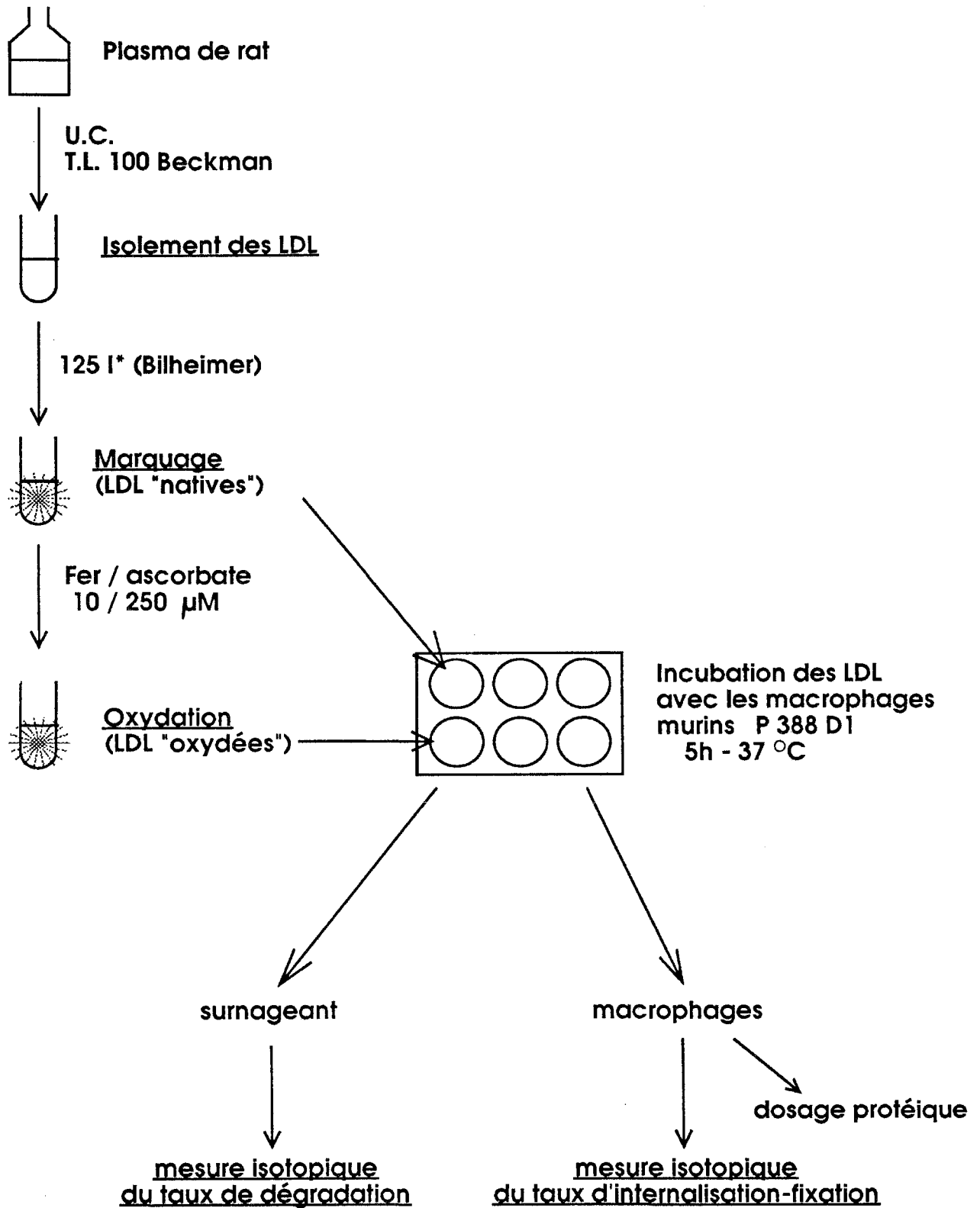
Pour chaque type de  $^{125}\text{I}$ -LDL testées (natives et oxydées), les mesures ont généralement été faites sur 2 puits avec cellules et sur 2 puits sans.

#### *I.1.3.3.4. Mesure du taux de dégradation des $^{125}\text{I}$ -LDL*

Nous avons utilisé la technique du laboratoire SERLIA (Pr. Fruchart, Institut Pasteur de Lille).

Après 5 heures d'incubation à  $37^{\circ}\text{C}$  et sous 5 % de  $\text{CO}_2$ , le surnageant de chaque puits a été prélevé pour y doser les produits de dégradation des  $^{125}\text{I}$ -LDL captées par les macrophages. Les  $^{125}\text{I}$ -LDL non reconnues par les cellules ont été précipitées par addition de TCA à 20 % et éliminées par 10 minutes de centrifugation à 10000 rpm.

Puis les iodures radioactifs libres ont été précipités par du nitrate d'argent à 5 % ( $\text{AgNO}_3$ ), et après 10 minutes de centrifugation à 10000 rpm, la radioactivité du surnageant a été mesurée.



**Figure 11** : Schéma du protocole expérimental d'étude de la captation des LDL de rats Wistar par les macrophages P388 D<sub>1</sub>.

*I.1.3.3.5. Mesure du taux d'internalisation- fixation des  $^{125}\text{I}$ -LDL (d'après Kraemer et coll. 1990 (75)*

Après séparation du milieu, les monocouches cellulaires ont été rincées 5 fois avec du PBS Ca-Mg (GIBCO Ref.07601300), et solubilisées dans 1 ml de soude 0,4 N. Après 30 minutes, la radioactivité a été mesurée sur une aliquote et les protéines cellulaires dosées par la méthode de Peterson (1977) (69).

*I.1.3.3.6. Modes de calculs*

Tous les taux ont été exprimés en ng de protéines de LDL par  $\mu\text{g}$  de protéines macrophagiques pour 5 heures.

-Taux de dégradation (D) :

$$D_{\text{ng}/\mu\text{g}/5\text{h}} = \frac{(x \text{ cpm essai} - y \text{ cpm blanc}) \cdot 2,4375}{\text{activité spécifique} * \cdot z \mu\text{g} \text{ proteines}}$$

x = RA en cpm, du surnageant d'un puits avec cellules après précipitations au TCA et au  $\text{AgNO}_3$

y = RA en cpm, du surnageant d'un puits sans cellule traité de la même façon  
2,4375 = facteur de dilution

\* Activité spécifique des  $^{125}\text{I}$ -LDL en cpm/ng de protéines

z = concentration des protéines macrophagiques en  $\mu\text{g}$ /puits

-Taux d'internalisation-fixation (I):

$$I_{\text{ng}/\mu\text{g}/5\text{h}} = \frac{x' \text{ cpm essai}}{\text{activité spécifique} * \cdot z \mu\text{g} \text{ protéines}}$$

x' = RA des macrophages du puits concerné

-Taux de captation globale (C) :

$$C_{\text{ng}/\mu\text{g}/5\text{h}} = D + I$$

-Pourcentage de dégradation (% d) des  $^{125}\text{I}$ -LDL captées :

$$\% d = D \times 100 / C$$

## I.2. INFLUENCE DE LA CARENCE EN ZINC

### I.2.1. Modèle animal

#### I.2.1.1. Développement d'une carence expérimentale en zinc

Les rats Wistar mâles pesant de 180 à 200 g et provenant du même élevage que les rats témoins, ont été répartis, deux jours après leur arrivée, en 3 lots dans des cages en acier inoxydable. Les cages des rats carencés ont été décontaminées une fois toutes les 2 semaines par trempage dans une solution d'acide chlorhydrique à 10 % et rinçage abondant à l'eau désionisée.

L'animalerie a été maintenue à la température de 20°C et un cycle jour - nuit a été programmé.

Les rats ont été nourris tous les jours à heure fixe et ont reçu de l'eau désionisée à volonté dans des biberons en plastique, décontaminés pour le lot carencé.

#### I.2.1.2. Les régimes

##### *I.2.1.2.1. Régime carencé en zinc*

Ce régime en poudre, conçu et préparé au Laboratoire des maladies nutritionnelles de l'I.N.R.A. (Ceyrat, Dr Lamand), a sa composition décrite dans le tableau I. Il a été vérifié par spectrométrie d'absorption atomique (S.A.A.) que sa teneur en zinc était inférieure à 0,2 ppm.

Le régime était réhydraté extemporanément avec 250 ml d'eau désionisée par kg de régime.

##### *I.2.1.2.2. Régime à 100 ppm de zinc*

Il s'agissait du même régime I.N.R.A., mais supplémenté avec une solution de sulfate de zinc de façon à obtenir une teneur de 100 ppm.

#### I.2.1.3. Constitution des lots

Pour chaque expérience, les rats ont été répartis en 3 lots :

- lot CZ (carencés en zinc)
- lot PF (témoins pair-fed)
- lot AL (témoins ad libitum)



Albumine d'oeuf	14,5 %
Amidon de blé	38,0 %
Saccharose	38,0 %
Huile de maïs	4,5 %
Complément minéral *	4,0 %
Vitamines **	1,0 %

\* Composition exprimée en g/kg :

L cystéine 2,356 ; L tryptophane 0,392 ; Ca pantothénate 0,392 ;  
CaCO<sub>3</sub> 9,42 ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10,68 ; NaCl 7,85 ; NH<sub>4</sub>, Fe citrate 1,29 ;  
Mn<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,03 ; CuSO<sub>4</sub> 0,03 ; CaCl<sub>2</sub> 0,03 ; KI 0,00023 ; MgSO<sub>4</sub> 7,51.

\*\* Composition exprimée par kg de supplément :

Vitamines A 1980 UI ; D<sub>3</sub> 250 UI ; B<sub>1</sub> 2 mg ; B<sub>2</sub> 1,5 mg ; B<sub>3</sub> 7 mg ;  
B<sub>12</sub> 5 µg ; C 80 mg ; E 17 mg ; PP 10 mg.

**Tableau I** : Composition centésimale du régime I.N.R.A. déplété en zinc.

	Nombre d'animaux / lot			Durée de la carence (semaines)
	<b>CZ</b> n =	<b>PF</b> n =	<b>AL</b> n =	
Etude des défenses antiradicalaires	6	6	6	7
Expériences 1 et 3	5	3	2	6
Expériences 2 et 4	5	3	2	7
Expérience 5	5	4	3	7
Expérience 6	5	5	5	7

**Tableau II** : Composition des lots d'animaux et durée de la carence pour l'étude des systèmes antioxydants et les expériences sur macrophages.

Le lot CZ a reçu à volonté du régime à teneur en zinc  $< 0,2$  ppm. La consommation moyenne par rat CZ a été déterminée tous les jours par pesée.

Le lot PF a reçu chaque jour la quantité de régime supplémenté à 100 ppm de zinc, correspondant à ce qu'avaient consommé la veille les rats CZ, selon le principe du pair-feeding.

Le lot AL a reçu à volonté le régime à 100 ppm.

Le nombre d'animaux par lots et la durée de la carence sont donnés dans le tableau II.

Au total, nous avons sacrifié 75 rats pour étudier l'influence de la carence en zinc.

## **I.2.2. Prélèvements**

Les échantillons ont tous été collectés et conservés dans des tubes en polyéthylène décontaminés.

### **I.2.2.1. Etude des LDL**

Prélèvements, isolement et marquage ont été identiques à ceux décrits pour la mise au point sur rats témoins.

Une fraction de plasma et un fémur par animal ont été congelés pour le contrôle de la carence.

### **I.2.2.2. Etude de différents paramètres biologiques au cours de la carence en zinc**

Avant la mise en carence ( $t_0$ ), en milieu ( $t_3$ ), et en fin d'expérience ( $t_7$ ), les rats à jeun ont été anesthésiés à l'éther, et le sang prélevé à la veine jugulaire. Il a été collecté dans des tubes contenant un volume de solution d'héparinate de sodium à 4 % (P/V) (PROLABO Ref.24541-078) pour 99 volumes de sang et dont l'absence de contamination par du zinc a préalablement été vérifiée. Les tubes ont été centrifugés à  $4^{\circ}\text{C}$  (10 minutes à 3000 rpm).

Après sacrifice des animaux, le fémur a été prélevé en vue de la mesure du zinc, et congelé à  $-18^{\circ}\text{C}$  jusqu'au dosage.

Les érythrocytes ont été lysés à  $4^{\circ}\text{C}$  par le tampon suivant :

$\text{NH}_4\text{Cl}$       0,155 M

$\text{KHCO}_3$       0,01 M

$\text{Na}_2\text{EDTA}$     0,1 mM

Le lysat au  $1/10^{\text{ème}}$  a été conservé à  $-18^{\circ}\text{C}$  après centrifugation.

Le plasma a été réparti en vue des différents dosages et congelé à la même température.

Les GPX et les vitamines ont été dosées dans les 24 heures, les MDA dans les 3 jours. Pour les autres paramètres, la conservation pouvait être plus longue.

### **I.2.3. Etude des LDL**

L'étude a été réalisée à l'aide des mêmes techniques que celles utilisées lors des mises au point sur rats nourris au régime U.A.R. Mais quelques modifications ont été apportées compte tenu des particularités du régime I.N.R.A., et des rats CZ. Toutes les étapes ont été effectuées en parallèle pour les 3 lots de rats.

#### **I.2.3.1. Isolement des LDL**

Les LDL ont été isolées à partir d'un pool plasmatique : pour les animaux carencés en zinc, 5 rats ont été nécessaires, 3 pour leurs témoins "pair-fed" et 2 pour leurs témoins ad libitum.

#### **I.2.3.2. Incubation des LDL avec les macrophages**

Les LDL natives et oxydées ont été apportées aux macrophages à la concentration de 5 µg/ml.

Les mesures ont généralement été effectuées sur 3 puits avec cellules et 2 puits sans, pour chaque type de LDL étudié (CZ, PF, AL ; natives et oxydées).

### **I.2.4. Paramètres biologiques**

#### **I.2.4.1. Statut des animaux en oligo-éléments**

##### *I.2.4.1.1. Statut en zinc*

Les fémurs ont été soumis à dessiccation pendant 18 heures à 50°C, pesés, minéralisés par addition d'acide nitrique à 65% (Suprapur<sup>R</sup> MERCK), et incubation une nuit à 50°C.

Les plasmas ont été dilués au 1/5ème avec de l'acide chlorhydrique 0,1 M.

Zinc plasmatiques et fémoraux ont été dosés pour chaque animal par S.A.A. en flamme air-acétylène (PERKIN ELMER 460, longueur d'onde = 213,9 nm) avec une gamme d'étalonnage externe.

#### *1.2.4.1.2. Statut en cuivre*

La cuprémie a été déterminée par la même technique que pour la zincémie, mais avec une longueur d'onde à 325 nm et du n-butanol à 6 % comme diluant des plasmas.

#### *1.2.4.1.3. Statut en sélénium*

Les dosages de sélénium plasmatique ont été effectués au Laboratoire de Biochimie C par S.A.A. électrothermique (PERKIN ELMER Z 5100 PC).

#### *1.2.4.1.4. Contrôle de qualité*

La validité de la méthode a été vérifiée par le laboratoire de Biochimie C à l'aide d'un sérum de contrôle Seronorm Trace Element n°112.

	Zinc $\mu\text{mol/l}$	Cuivre $\mu\text{mol/l}$	Sélénium $\mu\text{mol/l}$
Valeurs certifiées	12	17	1,1
Valeurs trouvées	$11,4 \pm 0,4$ n=10	$17,1 \pm 0,4$ n=15	$1,08 \pm 0,04$ n=38

#### I.2.4.2. Statut en vitamines A et E

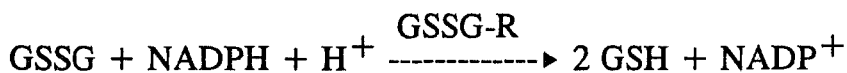
Leur dosage a été effectué par chromatographie liquide haute performance isocratique en phase inverse selon la technique d'Arnaud et coll. (1991) (76).

#### I.2.4.3. Enzymes antiradicalaires

##### *1.2.4.3.1. Glutathion peroxydases (GPX) plasmatiques*

Elles ont été dosées sur plasma dilué, par la méthode de Gunzler et coll. (1974) (77). Le substrat utilisé était le ter-butyl hydroperoxyde (t-BOOH). Le mélange réactionnel était le suivant : t-BOOH 30 mM, glutathion réduit 0,15 M, glutathion réductase 50 U/ml et NADPH 8,4 mM dans un tampon Tris Azide pH 7,6.

Le principe du dosage repose sur le couplage de réactions enzymatiques faisant intervenir la glutathion peroxydase et la glutathion réductase (GSSG-R) :



La quantité de glutathion (GSH) oxydé par le terbutyl a été mesurée en suivant la décroissance d'absorption du NADPH à 340 nm.

#### *1.2.4.3.2. Superoxyde dismutases érythrocytaires (SOD)*

Leur dosage a été effectué sur lysat globulaire selon la méthode de Marklund et coll. (1974) (78) après précipitation de l'hémoglobine par un mélange chloroforme / éthanol (1:1 V/V).

Il s'agit d'une technique mettant en jeu du pyrogallol. L'auto-oxydation de celui-ci en présence d'EDTA est inhibée par la SOD. Le principe du dosage est basé sur une compétition entre la réaction d'oxydation du pyrogallol par les radicaux  $\text{O}_2^\circ$ , et la dismutation de ces derniers par la SOD.

#### 1.2.4.4. TBARs plasmatiques (exprimés en MDA)

La technique de dosage utilisée (Richard et coll. 1991) (79) est basée sur la réaction d'une molécule de MDA avec 2 molécules d'acide thiobarbiturique (TBA). Le complexe a été dosé par fluorimétrie (PERKIN ELMER LS 50, avec excitation à 532 nm et émission à 553 nm) après extraction par du n-Butanol.

#### 1.2.4.5. Nature des acides gras plasmatiques totaux (Unité INSERM n° 63, Bron, D. Blache)

Les lipides totaux plasmatiques ont été extraits, selon la méthode de Folch et coll. (1957) (80), par un mélange dichlorométhane/méthanol (2:1 V/V) au lieu du mélange chloroforme/méthanol originel. Les phases ont été séparées par du KCl 0,88 % puis centrifugées (10 minutes à 1100 g). La phase inférieure contenant les lipides a été séchée sur sulfate de sodium, et évaporée à sec sous azote. L'extrait lipidique a ensuite été transméthylé (Morrisson et coll. 1964) (81) par du  $\text{BF}_3$  (SIGMA) en présence de méthanol et de toluène pendant 90 minutes à  $100^\circ\text{C}$ . Après refroidis-

sement et addition de  $K_2CO_3$  à 5 %, les esters méthyliques ont été extraits par de l'isooctane, puis concentrés et analysés par chromatographie en phase gazeuse (chromatographe Di 200 DELSI muni d'un injecteur "on-column", et d'un détecteur à ionisation de flamme à  $260^\circ C$ ) en colonne capillaire (SP 2340 SUPELCO). Le gaz vecteur était l'hélium avec un débit de 1,2 ml/minute. L'analyse a été effectuée en programmation de température à raison de  $5^\circ C$ /minute de 60 à  $135^\circ C$ , puis de  $2^\circ C$ /minute jusqu'à  $220^\circ C$ .

Les esters méthyliques ont été identifiés par rapport à des mélanges étalons, et quantifiés à l'aide d'un logiciel de traitement de données Chroma (BIOSYSTEMES).

### **I.2.5. Statistiques**

#### **I.2.5.2. Etude de dégradation et de captation des LDL**

Les comparaisons statistiques entre les 3 lots ont été réalisées par analyses de variance à un facteur avec un seuil de significativité fixé à  $p < 0,05$ . En cas de significativité des analyses de variance, nous avons ensuite effectué des comparaisons 2 à 2 entre les différents lots d'animaux.

Pour la comparaison entre les résultats des LDL natives et ceux des LDL oxydées, le test t de Student a été utilisé avec la même limite de significativité que précédemment.

#### **I.2.5.2. Etude des différents paramètres biologiques au cours de la carence en zinc**

La significativité des résultats a été testée, à l'aide du programme PCSM, par analyses de variance à 1 facteur, suivie d'un test de Newman-Keuls en cas de significativité. Le seuil de significativité a été fixé à  $p < 0,05$ .

## **II : RESULTATS**

## **II.1. MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE DE CAPTATION DES LDL DE RATS PAR LE MACROPHAGE**

### **II.1.1. Isolement des LDL**

A partir de 6 ml de plasma de rats témoins (régime U.A.R.), nous avons obtenu après dialyse en moyenne  $160 \pm 28 \mu\text{g}$  de LDL.

Les contrôles de pureté en gradient d'acrylamide (figure 12) ont montré la présence de HDL<sub>1</sub> dans la zone de densité des LDL (1,019 - 1,055).

La concentration en protéines mesurée correspondait donc aux protéines de LDL et de HDL<sub>1</sub>. Toutefois, dans un souci de simplification, cette contamination étant peu importante, nous avons exprimé nos résultats en  $\mu\text{g}$  de LDL par ml.

### **II.1.2. Marquage des LDL** (tableau III)

Pour les LDL de rats nourris au régime U.A.R., nous avons fait varier le rapport I/P initial en vue d'obtenir le meilleur rendement d'incorporation.

Avec un rapport I/P initial allant de 20 à 70, nous avons respectivement obtenu des rendements de 35 à 12 %. Nous avons choisi pour la suite de nos expériences un rapport I/P égal à 20.

Pour être dans les conditions fixées par Bilheimer et coll. (1972) (72), le rapport I/P final devait être inférieur à 3,4 pour les LDL de rat.

Cette exigence a été respectée dans le cas des rats "régime I.N.R.A." mais pas pour les animaux "régime U.A.R."

Plus de 97 % de la radioactivité était précipitable par le TCA.

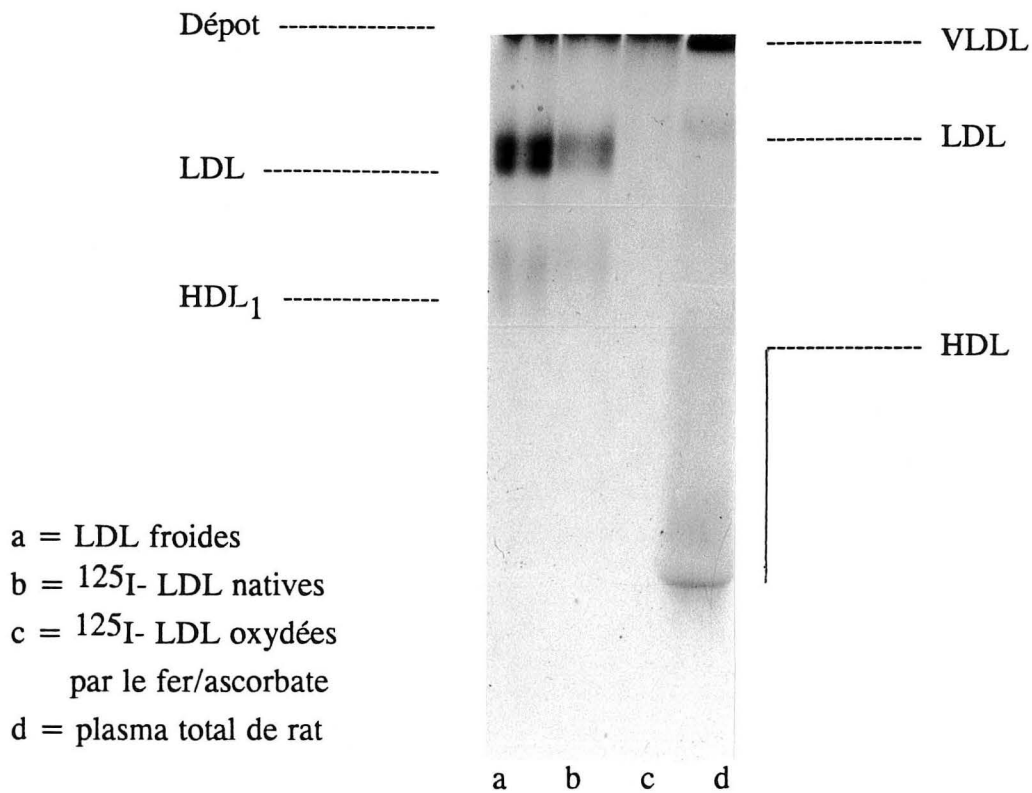
Pour les LDL de "rats régime U.A.R.", 13 à 24 % de l'iode 125 a été incorporé aux lipides, alors que cette valeur n'aurait pas dû excéder 5 %. Cette condition a cependant été respectée dans le cas des LDL de rats nourris au régime I.N.R.A. (CZ, PF, AL).

Nous avons vérifié en gradient d'acrylamide (figure 12) que la migration des LDL marquées était identique à celle des LDL avant marquage.

### **II.1.3. Dégradation et captation des LDL par le macrophage**

Les résultats des expériences réalisées avec les LDL de rats témoins nourris au régime U.A.R. pour la mise au point de la méthode, sont donnés dans le tableau IV.





**Figure 12** : Electrophorèse en gel d'acrylamide (gradient 2-16) de LDL froides, de  $^{125}\text{I}$ -LDL natives, de  $^{125}\text{I}$ -LDL oxydées et de plasma total de rats Wistar.

	I/P <sub>i</sub>	Rendement (%)	I/P <sub>f</sub>	RA $\tau$ par le TCA (%)	RA liée aux lipides (%)	Activité spécifique (cpm/ng)
LDL de rats AL Régime U.A.R. n= 6 marquages	20-70	12-35	6,6 - 8,7	< 3	3-24	84-350
LDL de rats AL Régime I.N.R.A. n= 4 marquages	20	5-17	1 - 3,3	< 4	1-5	24-198

**Tableau III** : Conditions de marquage des LDL de rats témoins nourris ad libitum : comparaison de 2 régimes (U.A.R. et I.N.R.A.).

Expérience	LDL	Concentration	Dégradation Intern. + Fixation		Captation	% de dégradation	% capté sur total
		$\mu\text{g/ml}$	$\text{ng}/\mu\text{g}/5\text{h}$	$\text{ng}/\mu\text{g}/5\text{h}$	$\text{ng}/\mu\text{g}/5\text{h}$	des LDL captées	mis dans le puit
1	natives	10	0,438	1,375	1,813	24	4,5
	oxydées	10	0,644	4,837	5,481	12	14
2	natives	5	0,070	0,391	0,461	15	3,7
	oxydées	4,6	0,210	1,216	1,426	15	10,9
	natives	10	0,100	0,576	0,676	15	2,6
	oxydées	9,2	0,290	2,101	2,391	12	9,8
	natives	25	0,168	0,968	1,136	15	1,6
	oxydées	23,2	0,423	4,384	4,807	9	7,4
3	natives	9	0,466	1,530	1,996	23	18,5
	oxydées	9	0,975	5,842	6,816	14	66,2
4	natives	5	0,061	0,348	0,410	15	6,5
	oxydées	5	0,114	1,480	1,594	7	26,2

Les valeurs des colonnes 4 à 8 correspondent aux moyennes des 2 ou 3 mesures réalisées pour chaque type de LDL.

**Tableau IV** : Résultats des 4 expériences réalisées pour la mise au point de la technique sur LDL de rats

"régime U.A.R."

- Les coefficients de variation étaient inférieurs à 10 % pour les mesures réalisées en double.

- Après le stress oxydatif provoqué in vitro par le fer/ascorbate, la captation globale des LDL a été multipliée par 3 à 4 par rapport à celle des LDL natives.

- En faisant varier de 5 à 25  $\mu\text{g/ml}$  la concentration des LDL incubées avec les macrophages, nous avons vérifié que la saturation des récepteurs cellulaires n'était pas atteinte pour ces valeurs (figures 13, 14 et 15).

## **II.2. INFLUENCE DE LA CARENCE EN ZINC**

### **II.2.1. Suivi de la carence**

#### **II.2.1.1. Aspect et poids des animaux**

Le jour de la mise en carence, les rats pesaient de 180 à 200 g. Le déficit en zinc a provoqué rapidement une diminution de la prise alimentaire des animaux. Dès 2 ou 3 semaines, la perte de poils a été visible et nous avons observé des lésions érythémato-squameuses chez les rats carencés.

Lors des 2 premières expériences de captation des LDL, pour lesquelles les animaux ont reçu un régime préparé dans les 4 mois précédant son utilisation, les rats témoins non carencés ont également présenté des pertes de poils, mais sans lésions associées.

Le jour du sacrifice, la prise de poids moyenne a été de 23 % pour les rats CZ tandis qu'elle était de 62 % pour leurs témoins PF, et de 100 % pour leurs témoins AL (tableau V).

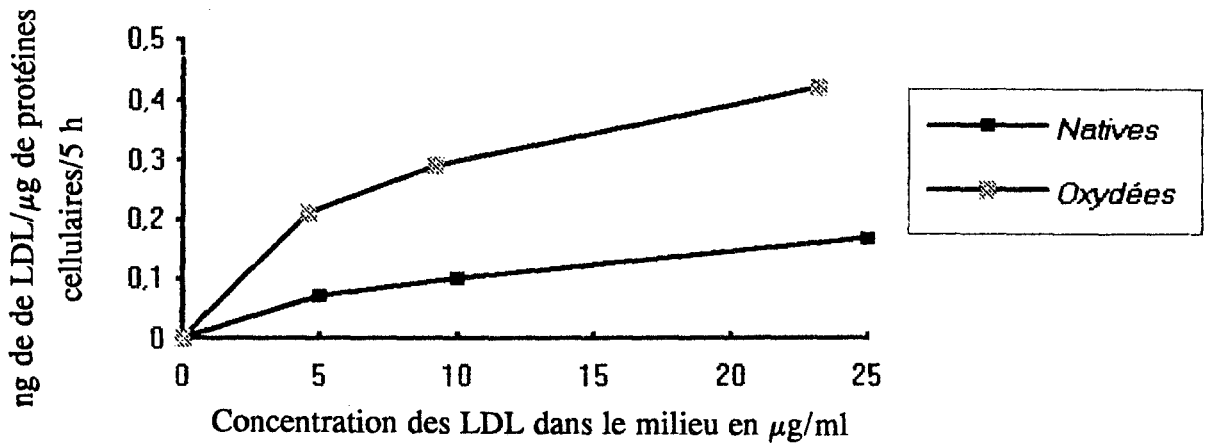
#### **II.2.1.2. Statut en zinc (tableau VI)**

Pour chacune des expériences réalisées, les taux de zinc plasmatique et fémoral des animaux CZ étaient 1,5 à 4 fois plus bas que ceux des rats témoins.

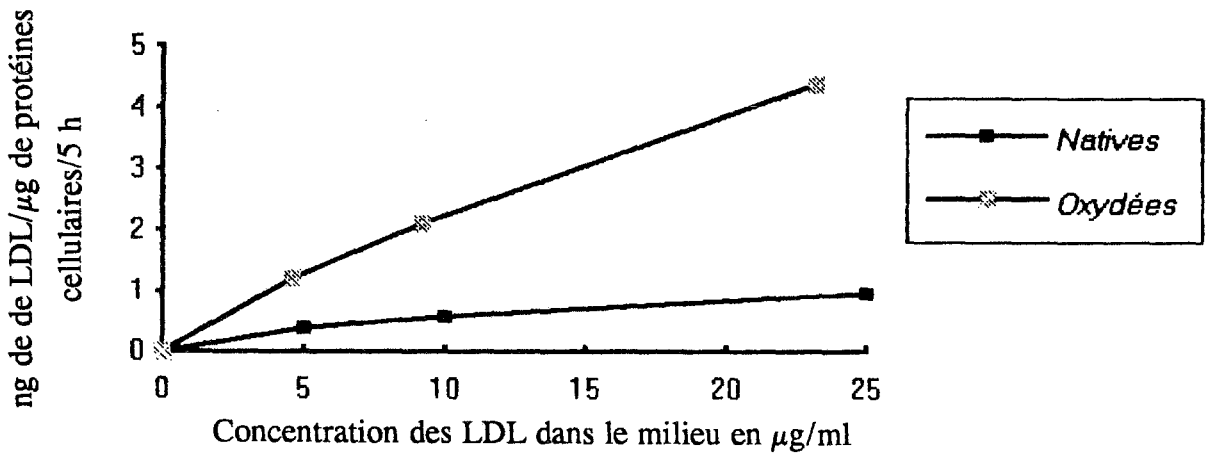
### **II.2.2. Etude des LDL**

#### **II.2.2.1. Isolement**

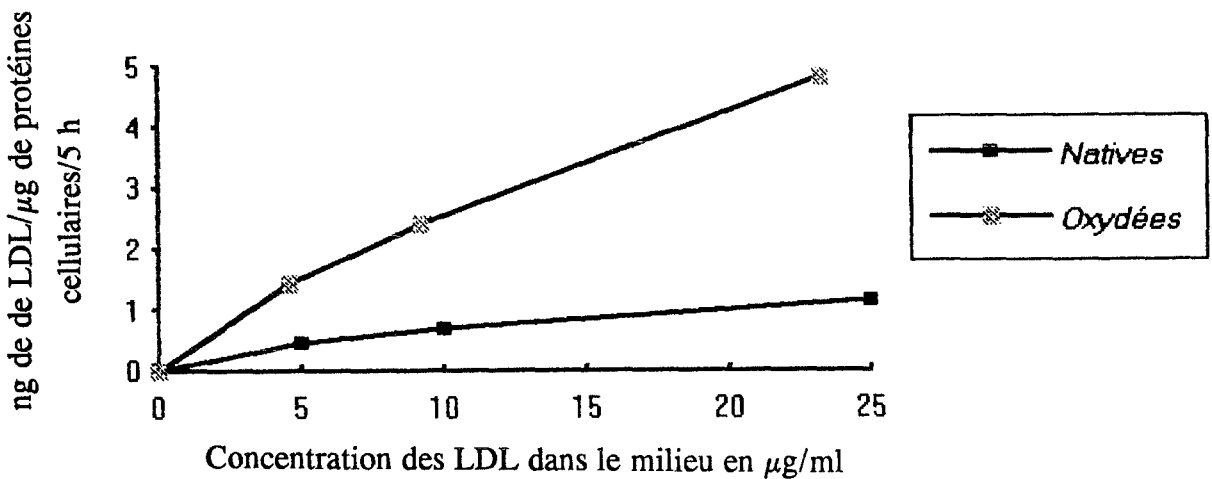
Chez le rat nourri avec le régime I.N.R.A., nous avons enregistré une diminution de la quantité de LDL isolée, par rapport au régime U.A.R. ( $124 \pm 38 \mu\text{g}$  à



**Figure 13** : Dégradation par les macrophages P388 D<sub>1</sub> des  $^{125}\text{I}$ -LDL de rats nourris au "régime U.A.R.".



**Figure 14** : Internalisation-fixation par les macrophages P388 D<sub>1</sub> des  $^{125}\text{I}$ -LDL de rats nourris au "régime U.A.R.".



**Figure 15** : Captation globale par les macrophages P388 D<sub>1</sub> des  $^{125}\text{I}$ -LDL de rats nourris au "régime U.A.R.".

CZ	PF	AL
n=30	n=21	n=16
233 ± 23	307 ± 25	380 ± 48

**Tableau V** : Poids (en grammes) des rats après 6 ou 7 semaines de "régime I.N.R.A." (poids initiaux : 180-200 g).

Expérience	ZINC PLASMATIQUE $\mu\text{mol/l}$			ZINC FEMORAL $\mu\text{g/g}$		
	CZ	PF	AL	CZ	PF	AL
1	11,7 ± 3,3	18,9 ± 1,1	18,0 ± 2,4	115,8 ± 20,7	203,5 ± 11,8	211,6 ± 4,6
2	6,3 ± 1,3	28,3 ± 1,1	20,9 ± 1,8	111,0 ± 12,9	252,7 ± 20,0	
3	6,4 ± 2,0	19,5 ± 0,8	19,0 ± 0,5	115,8 ± 12,0	228,0 ± 8,8	203,5 ± 20,2
4	5,3 ± 0,6	24,2 ± 4,1		109,1 ± 7,9	237,2 ± 22,4	235,8 ± 17,9
5	7,3 ± 1,1	20,4 ± 1,8	21,1 ± 0,8	104,8 ± 6,2	305,4 ± 9,0	306,0 ± 3,0
6	4,3 ± 1,2	17,0 ± 1,7	18,3 ± 1,9	121,7 ± 9,1	261,0 ± 18,5	274,5 ± 19,7

Valeurs exprimées en moyenne ± SD pour n animaux par lot.

Toutes les valeurs CZ sont significativement différentes des valeurs PF et AL ( $p < 0,01$ ).

Les valeurs PF ne diffèrent pas des valeurs AL.

**Tableau VI** : Statut en zinc des animaux utilisés pour l'isolement des LDL.

partir de 6 ml de plasma pour le régime I.N.R.A. vs  $160 \pm 28 \mu\text{g}$  pour le régime U.A.R.), et une légère contamination par les HDL<sub>1</sub>.

Lors de l'expérience 5, les LDL n'ont pas pu être isolées.

#### II.2.2.2. Marquage

Au cours de nos 6 expériences, nous avons obtenu des activités spécifiques allant de 41 à 189 cpm/ng de protéines.

Exception faite de 4 marquages (sur 17) pour lesquels seulement 90 à 96 % de la RA était précipitable par le TCA, moins de 3 % de la RA des LDL se trouvait dans le filtrat après précipitation.

L'Iode 125 incorporé dans les lipides correspondait à moins de 5 % de la radioactivité totale, sauf dans l'expérience 4, où il représentait alors 29 % pour les LDL de rats AL. Nous n'avons donc pas pris en compte les résultats obtenus avec ces LDL.

#### II.2.2.3. Incubation des LDL avec les macrophages

Les résultats des 6 expériences sont donnés dans le tableau VII. Chaque valeur correspond à la moyenne de généralement 3 mesures, le coefficient de variation étant inférieur à 10 %.

- La réponse au stress oxydatif est nette, bien qu'elle soit de plus faible amplitude que celle observée pour les LDL de "rats régime U.A.R." (taux de captation multipliés par 1,5 en moyenne pour les LDL oxydées par rapport aux LDL natives avec le régime I.N.R.A. vs 3,5 en moyenne pour les LDL de rats nourris aux granulés U.A.R.).

- Une fois les LDL captées par le macrophage, leur pourcentage de dégradation est resté constant d'un lot à l'autre, qu'elles soient oxydées ou natives.

- Les taux observés pour les LDL oxydées lors des 2 premières expériences, avec un régime préparé 4 mois auparavant, sont nettement plus élevés que ceux des 4 expériences suivantes, réalisées avec un régime plus récent. Compte tenu du mauvais état général des animaux au terme des expériences 1 et 2, nous n'avons exploité que les 4 dernières sur le plan statistique. Les résultats en sont présentés dans le tableau VIII.

- Comme on l'observe dans ce tableau, les quantités de lipoprotéines natives ou oxydées in vitro réagissant avec le macrophage, ainsi que les pourcentages

Exp	LDL	Dégradation			Internalisation+ Fixation			Captation globale			% de dégradation des LDL captées			% capté sur total mis dans le puit		
		ng/μg/5h			ng/μg/5h			ng/μg/5h			CZ	PF	AL	CZ	PF	AL
1	Natives	0,326	0,302	0,362	0,352	0,360	0,416	0,678	0,662	0,778	48	46	46	10,8	9,9	12,4
	Oxydées	0,796	0,728	0,593	2,531	2,348	1,763	3,328	3,076	2,356	24	24	25	51,0	47,7	38,3
2	Natives	0,453	0,344	0,518	0,143	0,158	0,210	0,596	0,515	0,728	76	70	71	10,4	8,9	12,8
	Oxydées	0,621	0,349	0,606	0,558	0,435	0,908	1,178	0,783	1,514	53	45	40	20,2	12,7	26,1
3	Natives	0,354	0,420	0,352	0,118	0,146	0,124	0,472	0,566	0,476	75	74	74	6,5	7,6	6,3
	Oxydées	0,469	0,547	0,460	0,233	0,240	0,219	0,702	0,788	0,679	67	69	68	10,4	9,7	9,3
4	Natives	0,627	0,382		0,309	0,161		0,936	0,543		65	70		10,2	6,8	
	Oxydées	0,903	0,548		0,488	0,233		1,393	0,781		72	73		16,6	9,0	
5	Natives	0,433	0,453		0,164	0,172		0,597	0,625		72	73		7,8	8,4	
	Oxydées	0,723	0,828		0,295	0,361		1,019	1,189		71	70		13,2	14,2	
6	Natives	0,297	0,464	0,537	0,092	0,119	0,161	0,389	0,583	0,698	76	80	77	6,2	9,8	11,3
	Oxydées	0,429	0,586	0,731	0,145	0,180	0,240	0,574	0,765	0,970	75	77	75	9,6	12,5	14,8

Les valeurs correspondent aux moyennes des 2 ou 3 mesures effectuées pour chaque type de LDL.

**Tableau VII** : Résultats des 6 expériences de captation par les macrophages P 388 D<sub>1</sub> des LDL de rats "régime I.N.R.A."

	Dégradation LDL natives ng/ $\mu$ g/5h	Dégradation LDL oxydées ng/ $\mu$ g/5h	Augmentation % *
CZ n=4	0,428 $\pm$ 0,144	0,631 $\pm$ 0,223	47,0 $\pm$ 14,4
PF n=4	0,430 $\pm$ 0,037	0,627 $\pm$ 0,135	45,7 $\pm$ 25,8
AL n=2	0,445 $\pm$ 0,131	0,596 $\pm$ 0,192	33,4 $\pm$ 3,8

	Internalisation LDL natives ng/ $\mu$ g/5h	Internalisation LDL oxydées ng/ $\mu$ g/5h	Augmentation % *
CZ n=4	0,171 $\pm$ 0,097	0,290 $\pm$ 0,146	70,8 $\pm$ 22,2
PF n=4	0,150 $\pm$ 0,023	0,254 $\pm$ 0,077	67,6 $\pm$ 19,5
AL n=2	0,143 $\pm$ 0,026	0,230 $\pm$ 0,015	62,8 $\pm$ 19,5

	Captation LDL natives ng/ $\mu$ g/5h	Captation LDL oxydées ng/ $\mu$ g/5h	Augmentation % *
CZ n=4	0,599 $\pm$ 0,241	0,922 $\pm$ 0,366	54,0 $\pm$ 11,2
PF n=4	0,579 $\pm$ 0,035	0,881 $\pm$ 0,206	51,1 $\pm$ 26,6
AL n=2	0,587 $\pm$ 0,157	0,825 $\pm$ 0,206	40,8 $\pm$ 2,5

\* : entre les taux obtenus avec les LDL natives et ceux obtenus avec les LDL oxydées.  
Valeurs exprimées en moyenne  $\pm$  SD pour n expériences.

Les analyses de variance n'ont montré aucune différence entre les 3 lots de rats, concernant les taux de dégradation, d'internalisation-fixation et de captation des LDL natives ou oxydées.

Les taux obtenus avec les LDL oxydées sont significativement différents de ceux obtenus avec les LDL natives ( $p < 0,01$ ).

**Tableau VIII** : Moyennes des taux de dégradation, internalisation et captation des LDL par les macrophages pour les expériences 3 à 6.



d'augmentation de dégradation et de captation entre l'état natif et l'état oxydé, ne varient pas significativement en fonction des lots.

### **II.2.3. Etude de différents paramètres biologiques au cours de la carence en zinc**

#### **II.2.3.1. Statut des animaux en oligoéléments (tableau IX )**

##### *II.2.3.1.1. Statut en zinc (figure 16 )*

Chez les animaux recevant un régime à 100 ppm de zinc (PF et AL), nous constatons, à la fin de l'expérience, une diminution significative de la zincémie de l'ordre de 30 %.

Dès 3 semaines de carence, la zincémie est significativement diminuée chez les rats CZ par rapport aux témoins PF et AL.

Après 7 semaines de régime déplété en zinc, le zinc fémoral est significativement abaissé chez les animaux CZ par rapport aux 2 lots témoins.

##### *II.2.3.1.2. Statut en cuivre (figure 17 )*

En ce qui concerne la cuprémie, on ne note pas de variation significative dans le temps, même si la tendance est à la baisse pour les rats CZ, et à la hausse pour les témoins PF et AL.

Après 7 semaines de carence en zinc, la cuprémie est significativement abaissée chez les rats CZ par rapport aux 2 lots témoins.

##### *II.2.3.1.3. Statut en sélénium (figure 18 )*

On observe une relative stabilité du taux de sélénium plasmatique dans le temps, et on ne note pas de différence significative entre les 3 lots.

#### **II.2.3.2. Statut des animaux en SOD, GPX et en vitamines A et E** (tableau X, figures 19 et 20)

##### *II.2.3.2.1. Evolution dans le temps*

Pour les lots CZ et PF, on n'observe pas d'évolution significative des enzymes antiradicalaires dans le temps, mais pour les GPX plasmatiques, la tendance est à la baisse entre le début et la fin de l'expérience.

	Lot		T <sub>0</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>7</sub>
Zinc plasmatique <i>μmol/l</i> a <sup>3</sup> , b <sup>3</sup> , c <sup>3</sup> , a <sup>7</sup> , b <sup>7</sup>	CZ	♦♣	27,7 ± 3,2	13,9 ± 1,5	12,5 ± 1,9
	PF	♣	27,3 ± 3,4	23,7 ± 5,0	17,7 ± 2,1
	AL	♦♣♠	29,1 ± 5,4	39,1 ± 7,1	19,4 ± 1,9
Zinc fémoral <i>μg/g</i> a <sup>7</sup> , b <sup>7</sup>	CZ				149,8 ± 24,3
	PF				282,2 ± 21,8
	AL				304,2 ± 23,4
Cuivre plasmatique <i>μmol/l</i> a <sup>3</sup> , a <sup>7</sup> , b <sup>7</sup>	CZ		15,2 ± 0,9	13,9 ± 2,5	12,4 ± 3,0
	PF		16,7 ± 4,1	16,6 ± 0,9	18,3 ± 1,9
	AL		14,9 ± 3,9	14,8 ± 1,5	18,3 ± 1,6
Sélénium plasmatique <i>μmol/l</i>	CZ		5,51 ± 0,34	6,05 ± 0,47	6,00 ± 0,67
	PF		5,83 ± 0,32	5,68 ± 0,20	5,61 ± 0,68
	AL		5,76 ± 0,33	5,63 ± 0,44	6,21 ± 0,44

Résultats exprimés en moyennes ± SD pour 6 animaux par lot.

Lecture des symboles de significativité :

- Evolution du paramètre dans le temps  
pour un lot de rats donné :

♦ = T<sub>0</sub> - T<sub>3</sub> p < 0,05

♣ = T<sub>0</sub> - T<sub>7</sub> p < 0,05

♠ = T<sub>3</sub> - T<sub>7</sub> p < 0,05

- Comparaison entre les 3 lots de rats  
à un temps donné (en exposant) :

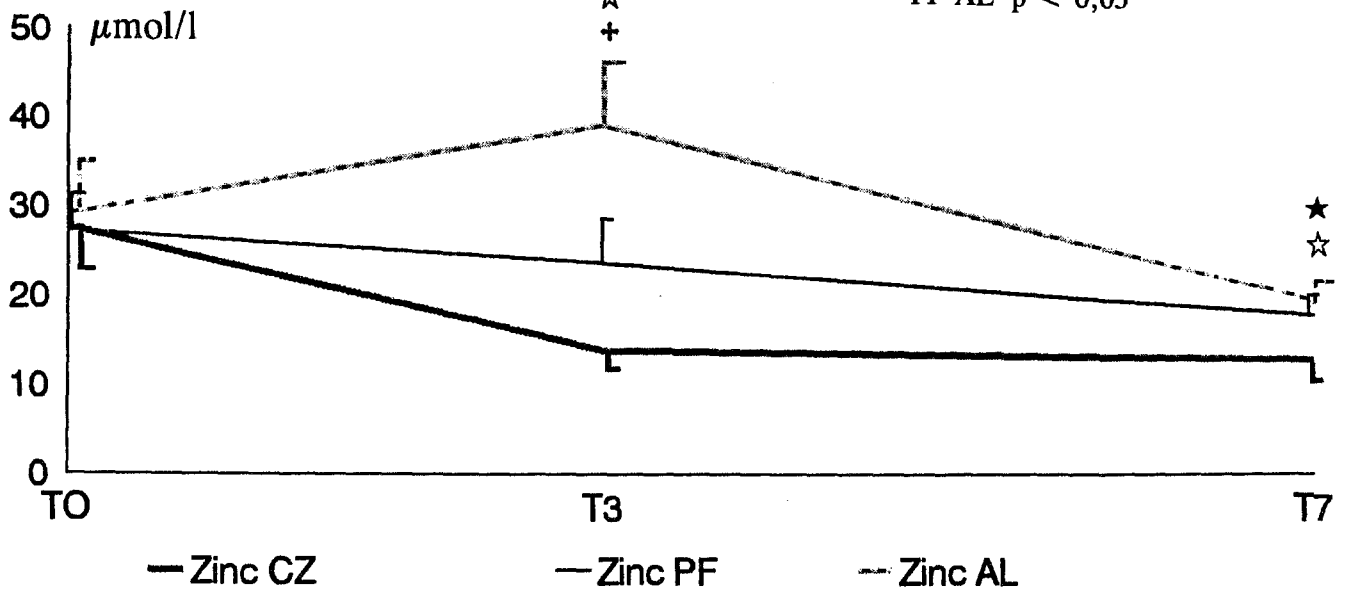
a = CZ - PF p < 0,05

b = CZ - AL p < 0,05

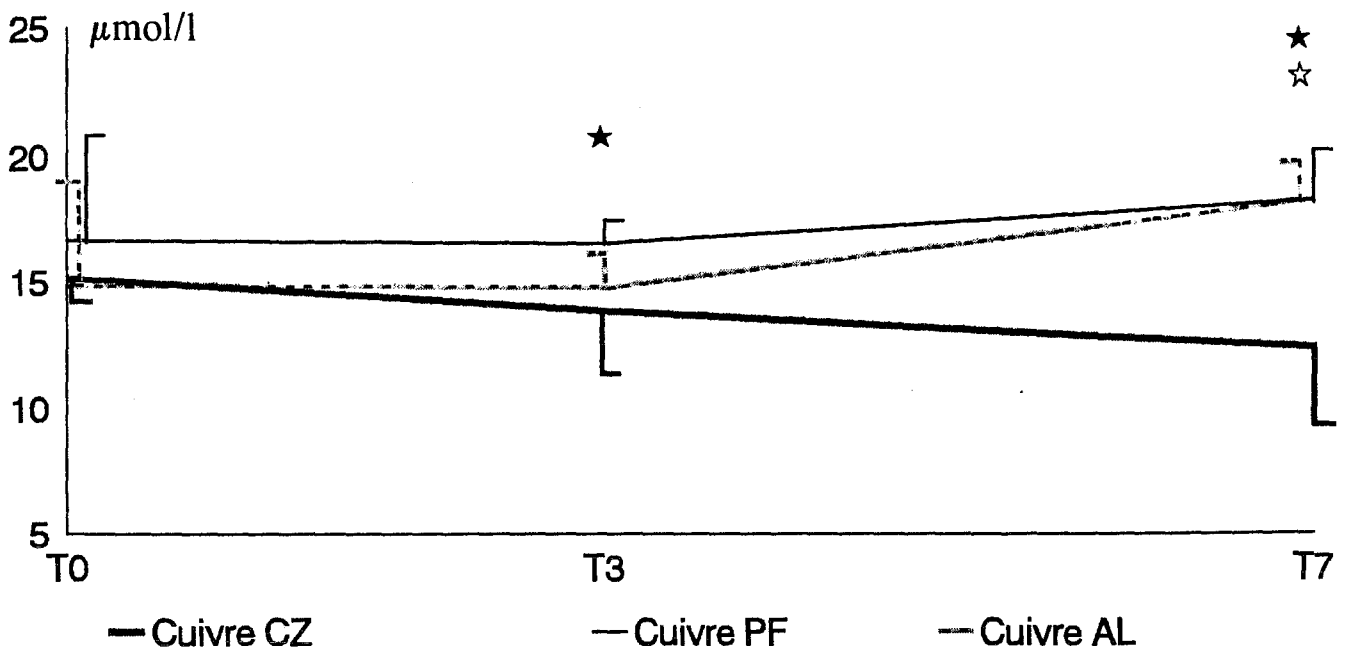
c = PF - AL p < 0,05

**Tableau IX :** Statut des 3 lots de rats en oligo-éléments aux temps T<sub>0</sub>, T<sub>3</sub> et T<sub>7</sub>-semaines de l'expérience.

Lecture des symboles de significativité :

★ = CZ-PF  $p < 0,05$ ☆ = CZ-AL  $p < 0,05$ + = PF-AL  $p < 0,05$ 

**Figure 16** : Statut des 3 lots d'animaux (carencés en zinc CZ, témoins pair-fed PF et témoins ad libitum AL) en zinc plasmatique aux temps T<sub>0</sub>, T<sub>3</sub> et T<sub>7</sub> semaines de l'expérience.



**Figure 17** : Statut des 3 lots d'animaux (carencés en zinc CZ, témoins pair-fed PF et témoins ad libitum AL) en cuivre plasmatique aux temps T<sub>0</sub>, T<sub>3</sub> et T<sub>7</sub> semaines de l'expérience.

	Lot	T <sub>0</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>7</sub>
<b>Vitamine A plasma</b> <i>μmol/l</i>	<i>CZ</i>			3,7 ± 0,9
	<i>PF</i>			4,0 ± 0,7
	<i>AL</i>			5,0 ± 1,2
<b>Vitamine E plasma</b> <i>μmol/l</i>	<i>CZ</i>			68,5 ± 7,7
	<i>PF</i>			66,9 ± 13,0
	<i>AL</i>			92,0 ± 38,2
<b>GPX plasmatiques</b> <i>μmol/l</i>	<i>CZ</i>	10033 ± 1110	9481 ± 2381	8609 ± 1314
	<i>PF</i>	9576 ± 982	9660 ± 1207	8500 ± 845
	<i>AL</i>	10047 ± 1430	10563 ± 1472	9512 ± 839
<b>SOD érythrocytaires</b> <i>ng/ml GR</i> <i>a<sup>7</sup>, b<sup>7</sup>, c<sup>7</sup></i>	<i>CZ</i>	225 ± 72	157 ± 28	169 ± 30
	<i>PF</i>	192 ± 31	176 ± 10	199 ± 17
	<i>AL</i> ♣♣	183 ± 58	167 ± 11	242 ± 6
<b>MDA plasmatique</b> <i>μmol/l</i> <i>c<sup>7</sup></i>	<i>CZ</i>	3,28 ± 0,23	3,19 ± 0,46	3,34 ± 0,32
	<i>PF</i> ♠	3,28 ± 0,24	3,56 ± 0,15	2,97 ± 0,30
	<i>AL</i>	3,34 ± 0,28	3,66 ± 0,38	3,73 ± 0,38

Résultats exprimés en moyennes ± SD pour 6 animaux par lot.

Lecture des symboles de significativité :

- Evolution du paramètre dans le temps  
pour un lot de rats donné :

◆ = T<sub>0</sub> - T<sub>3</sub> p < 0,05

♣ = T<sub>0</sub> - T<sub>7</sub> p < 0,05

♠ = T<sub>3</sub> - T<sub>7</sub> p < 0,05

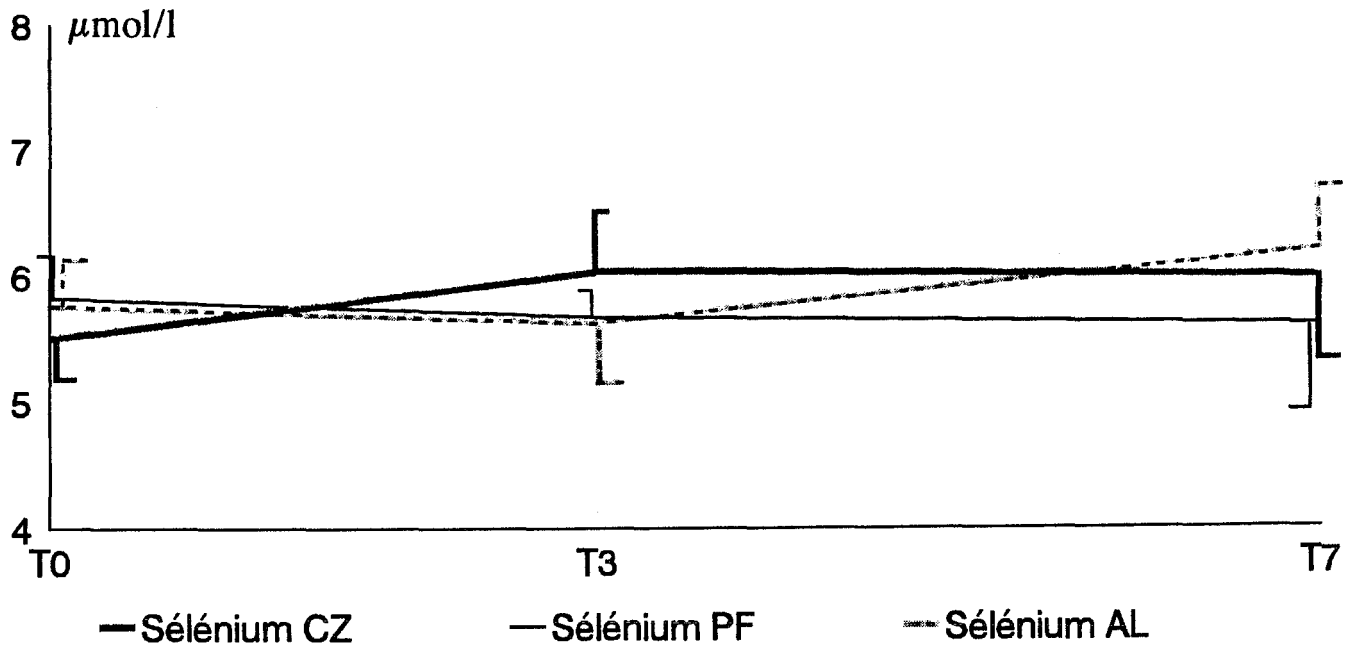
- Comparaison entre les 3 lots de rats  
à un temps donné (en exposant) :

a = CZ - PF p < 0,05

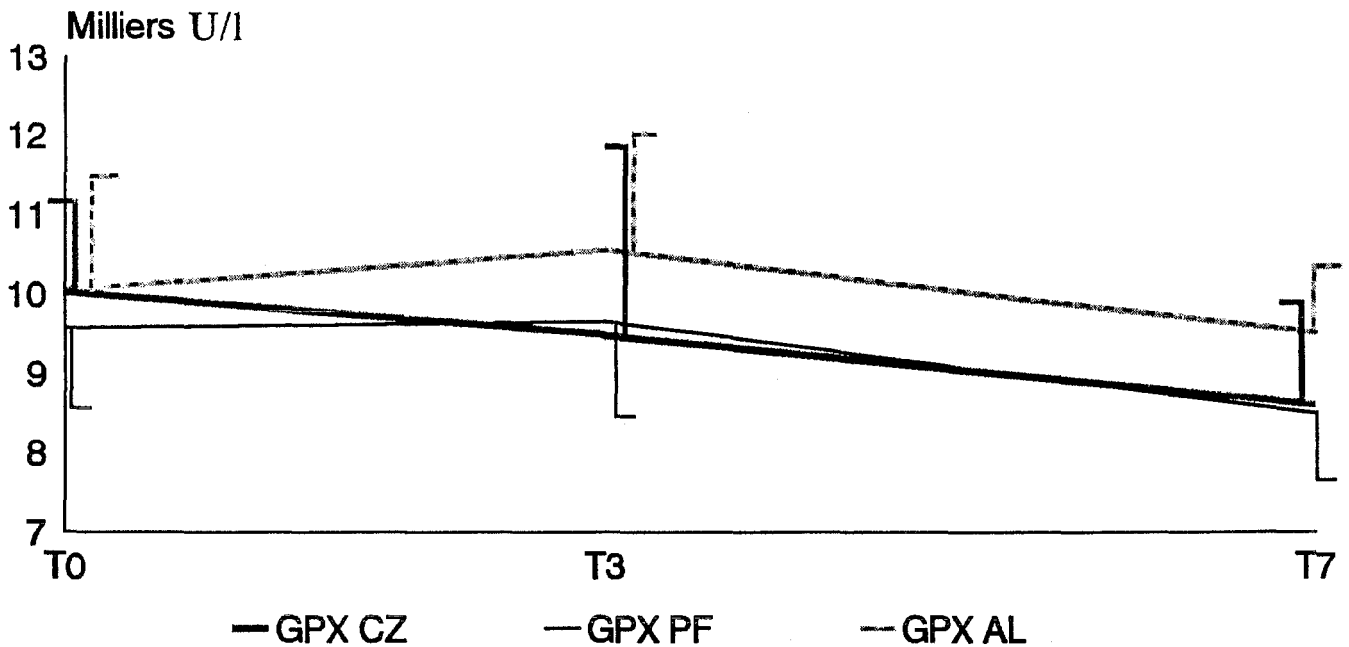
b = CZ - AL p < 0,05

c = PF - AL p < 0,05

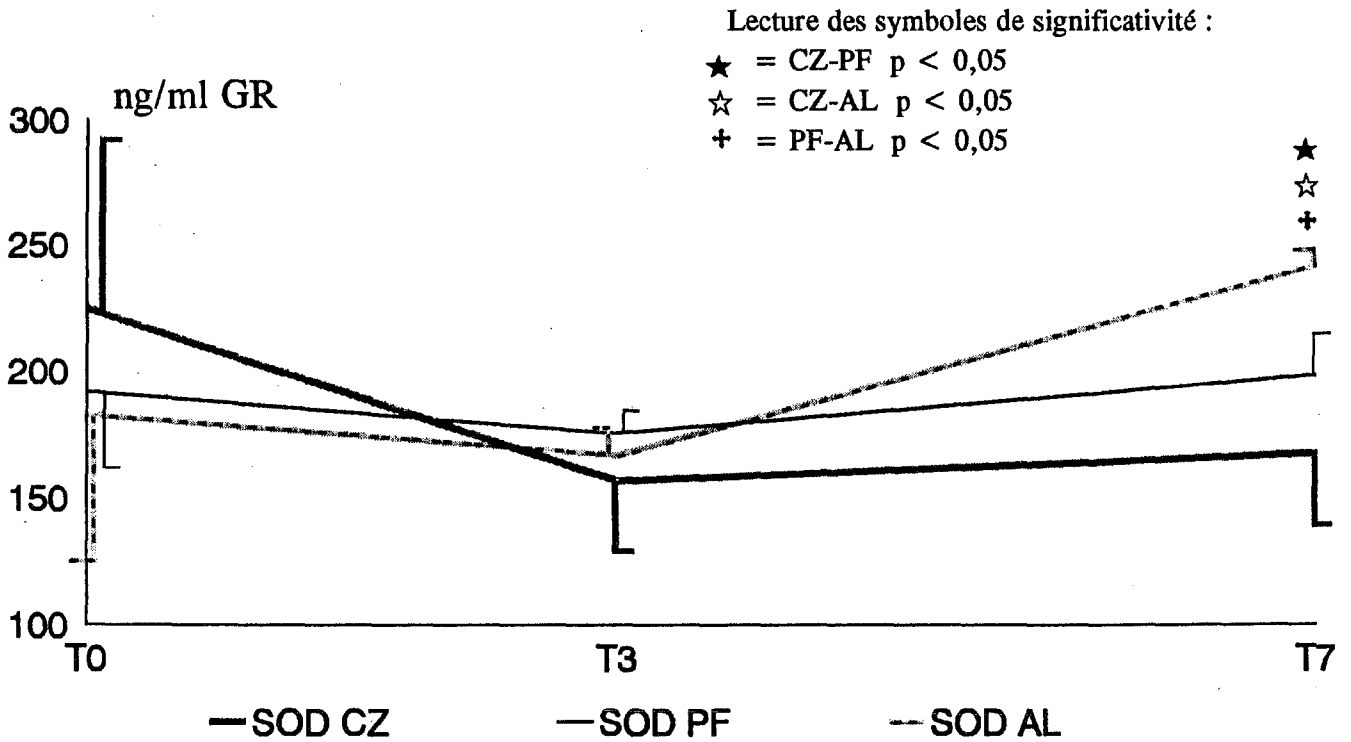
**Tableau X :** Statut des 3 lots de rats en vitamines, enzymes antiradicalaires et en MDA aux temps T<sub>0</sub>, T<sub>3</sub> et T<sub>7</sub>-semaines de l'expérience.



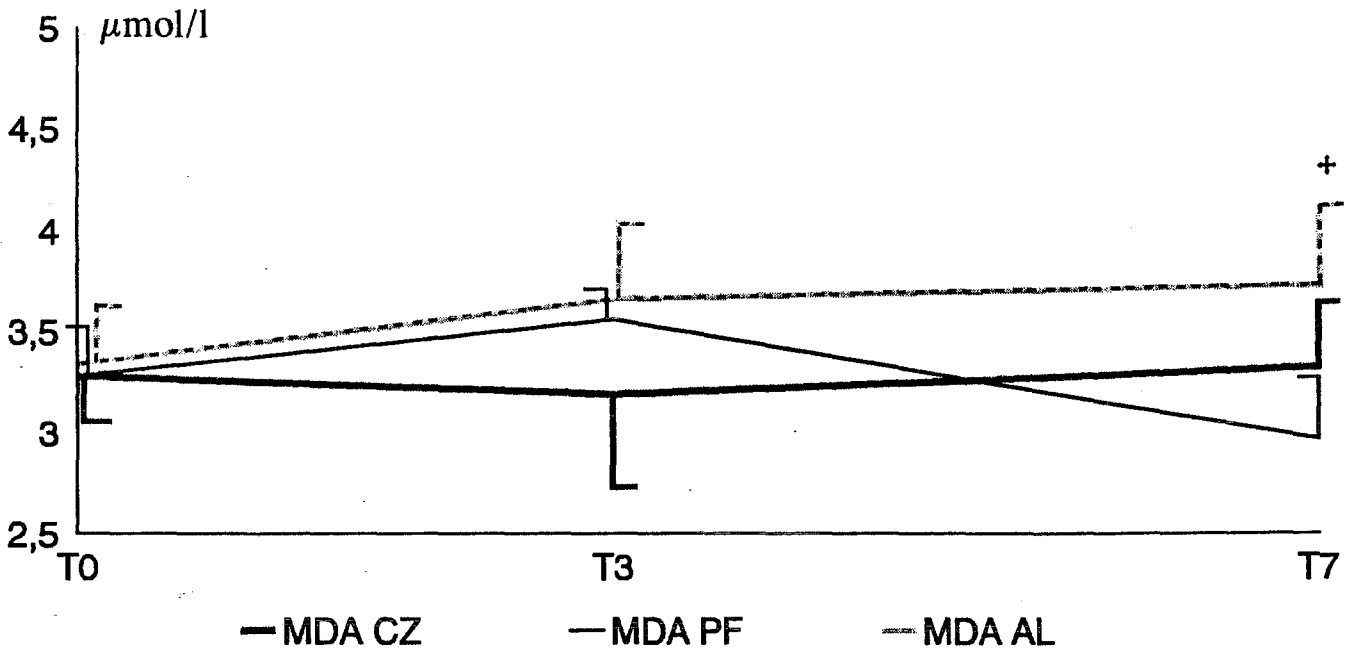
**Figure 18** : Statut des 3 lots d'animaux (carencés en zinc CZ, témoins pair-fed PF et témoins ad libitum AL) en sélénium plasmatique aux temps T<sub>0</sub>, T<sub>3</sub> et T<sub>7</sub>-semaines de l'expérience.



**Figure 19** : Statut des 3 lots d'animaux (carencés en zinc CZ, témoins pair-fed PF et témoins ad libitum AL) en glutathion peroxydases (GPX) plasmatiques aux temps T<sub>0</sub>, T<sub>3</sub> et T<sub>7</sub>- semaines de l'expérience.



**Figure 20** : Statut des 3 lots d'animaux (carencés en zinc CZ, témoins pair-fed PF et témoins ad libitum AL) en superoxyde dismutases (SOD) érythrocytaires aux temps T<sub>0</sub>, T<sub>3</sub> et T<sub>7</sub> semaines de l'expérience.



**Figure 21** : Statut des 3 lots d'animaux (carencés en zinc CZ, témoins pair-fed PF et témoins ad libitum AL) en malondialdéhyde (MDA) plasmatique aux temps T<sub>0</sub>, T<sub>3</sub> et T<sub>7</sub> semaines de l'expérience.

Chez les rats nourris ad libitum, après 7 semaines de régime I.N.R.A., on note une augmentation significative de la SOD érythrocytaire par rapport aux temps T<sub>0</sub> et T<sub>3</sub>.

Les vitamines n'ont pu être dosées aux 2 premiers temps de l'expérience.

#### *II.2.3.2.2. Comparaisons entre les 3 lots d'animaux*

Après 3 semaines de régime I.N.R.A., on ne note pas de différence significative entre les 3 lots de rats, en ce qui concerne la SOD et les GPX.

Au terme de l'expérience (T<sub>7</sub>) :

- si l'on compare le bilan des animaux en "pair-feeding" à celui des rats témoins ad libitum, on peut noter chez les premiers une baisse de la SOD érythrocytaire, tandis que les GPX et les vitamines sont abaissées, mais de façon non significative.

- chez l'animal carencé comparé à l'animal en "pair-feeding", on observe uniquement une diminution significative de la SOD érythrocytaire.

#### *II.2.3.3. TBARs plasmatiques (exprimés en MDA) (tableau X, figure 21)*

##### *II.2.3.3.1. Evolution dans le temps*

Pour les lots CZ et AL, l'évolution du MDA dans le temps n'est pas significative, mais, chez les rats AL, on peut noter une augmentation progressive du MDA au cours de l'expérience.

Pour les rats PF, on observe une baisse significative du MDA entre T<sub>3</sub> et T<sub>7</sub>.

##### *II.2.3.3.2. Comparaisons entre les 3 lots d'animaux*

A T<sub>3</sub>, les taux de MDA ne varient pas significativement entre les 3 lots de rats.

A T<sub>7</sub>, on observe une production de MDA plasmatique significativement plus faible chez les rats PF comparés aux témoins AL.

Chez les rats CZ, les taux de MDA sont plus élevés que chez les témoins PF, et plus faibles que chez les témoins AL, mais ces différences ne sont pas significatives.

#### II.2.3.4. Nature des acides gras plasmatiques totaux (tableau XI, figure 22)

Après 7 semaines de régime I.N.R.A., par rapport au rat en "pair-feeding", on note chez l'animal carencé en zinc une augmentation des pourcentages d'acide linoléique et d'acide linoléique (C 18:3 n-3), ainsi qu'une baisse du pourcentage d'acide arachidonique.

En comparant les acides gras plasmatiques des rats PF à ceux des rats AL, on observe chez les premiers une augmentation du pourcentage d'acide stéarique (C 18:0), une baisse du pourcentage d'acide linoléique (C 18:2 n-6), et une augmentation de celui de l'acide arachidonique (C 20:4 n-6).



	<b>CZ</b>	<b>PF</b>	<b>AL</b>
<b>C 16:0</b>	21,24 ± 1,25	20,52 ± 1,11	20,80 ± 1,42
<b>C 16:1 n-7</b>	2,40 ± 0,59	2,78 ± 0,38	3,19 ± 0,59
<b>C 18:0</b> b, c	9,75 ± 1,38	10,70 ± 0,83	7,43 ± 0,84
<b>C 18:1 n-9</b>	15,91 ± 3,72	16,22 ± 3,21	19,09 ± 4,44
<b>C 18:1 n-7</b>	2,73 ± 0,58	2,16 ± 0,31	2,96 ± 0,10
<b>C 18:2 n-6</b> a, b, c	22,64 ± 1,13	16,54 ± 2,40	25,74 ± 1,06
<b>C 18:3 n-3</b> a	0,79 ± 0,36	0,25 ± 0,22	0,43 ± 0,27
<b>C 20:4 n-6</b> a, c	23,44 ± 3,79	30,62 ± 4,92	19,79 ± 2,94
<b>C 22:6 n-3</b>	1,59 ± 0,34	1,31 ± 0,27	1,15 ± 0,74

Résultats exprimés en moyennes ± SD pour 6 animaux par lot.

Lecture des symboles de significativité :

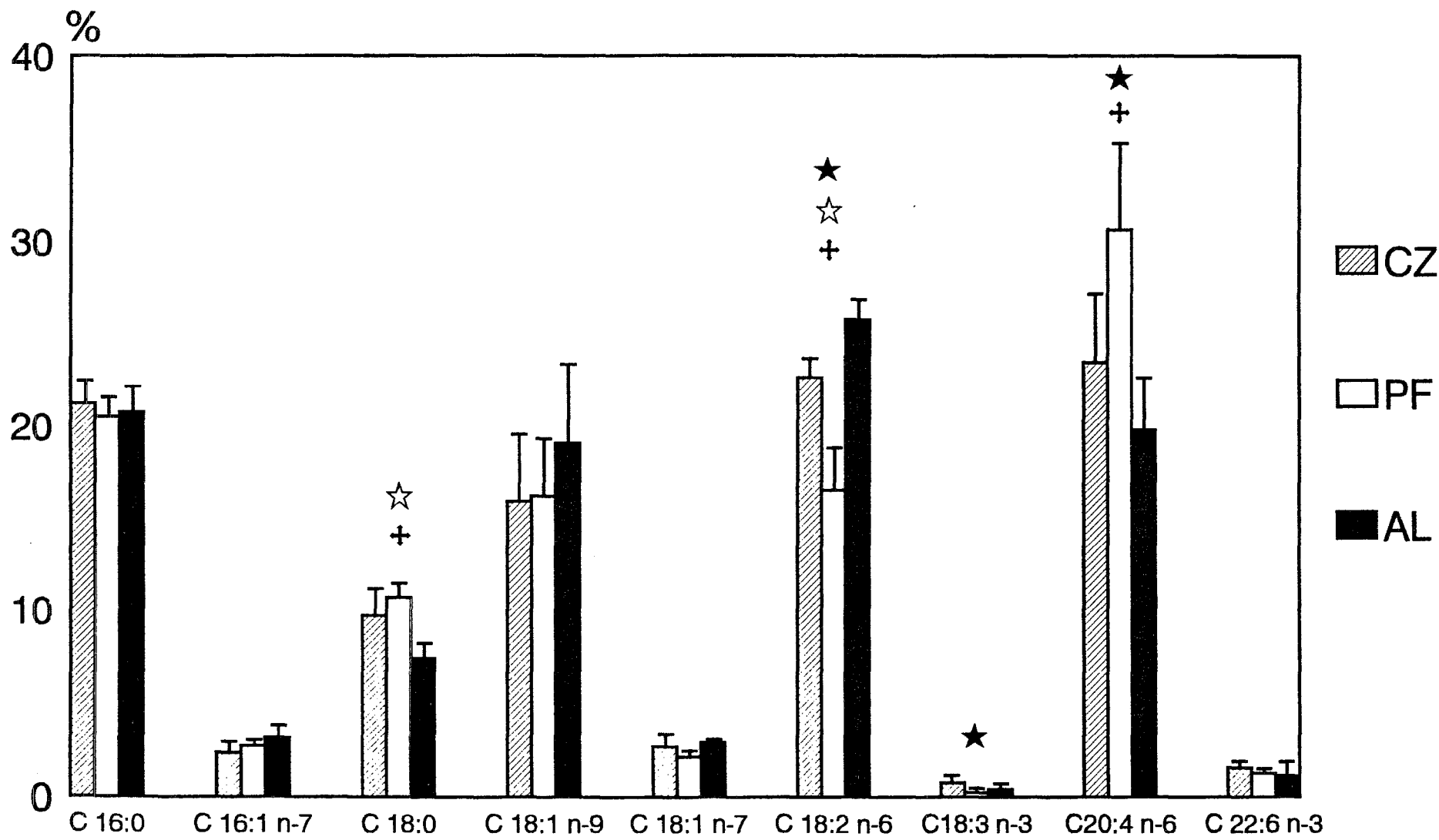
- Comparaison entre les 3 lots de rats à T<sub>7</sub> :

a = CZ - PF p < 0,05

b = CZ - AL p < 0,05

c = PF - AL p < 0,05

**Tableau XI** : Nature des acides gras totaux plasmatiques (exprimés en pourcentages) des 3 lots d'animaux au terme de 7 semaines de régime "I.N.R.A.".



Lecture des symboles de significativité :

★ = CZ-PF  $p < 0,05$

☆ = CZ-AL  $p < 0,05$

‡ = PF-AL  $p < 0,05$

**Figure 22** : Nature des acides gras plasmatiques des 3 lots d'animaux (carencés en zinc CZ, témoins pair-fed PF et témoins ad libitum AL) au terme de 7 semaines de "régime I.N.R.A.".

## **III : DISCUSSION**

---

Notre projet de recherche comportait 2 parties :

- la mise au point des techniques d'étude de la captation et de la dégradation des LDL de rats par les macrophages, et l'étude de la faisabilité , ce modèle animal n'ayant, à notre connaissance, donné lieu à aucune étude de ce type jusqu'à présent.

- l'étude de l'influence de la carence en zinc sur la susceptibilité des LDL à la peroxydation.

Dans cette partie de notre travail, nous avons été amenée à mesurer in vitro la captation et la dégradation par le macrophage de LDL natives et oxydées, et à évaluer sur une série d'animaux certains composants du système de défense antiradicalaire ainsi que les TBARs dont le MDA plasmatique, l'un des marqueurs de la peroxydation lipidique.

Dans notre discussion, nous analyserons donc successivement les résultats concernant la mise au point de la technique d'étude de la captation des LDL par les macrophages, puis ceux nous permettant d'estimer l'influence de la carence en zinc.

#### MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE D'ETUDE DE LA CAPTATION DES LDL PAR LE MACROPHAGE :

Nous avons rencontré 2 types de difficultés lors de l'isolement des LDL :

- \* Le rat présente un profil lipoprotéinique pauvre en LDL (Oschry et coll. 1982) (81).

D'autres modèles de carence en zinc existent (cobaye, mouton, poulet), mais le rat carencé est pour le moment le seul modèle développé au Laboratoire.

De plus, c'est sur cet animal que Faure et coll. (1991) (62) ont montré que la carence en zinc entraîne, après stress oxydatif in vitro, une production accrue de MDA au niveau des LDL.

C'est pour ces raisons que nous avons travaillé sur le rat.

Le volume sanguin du rat étant faible et le plasma contenant peu de LDL, nous avons choisi de travailler sur des pools de plasma , ce qui a alourdi notre protocole et limité le nombre d'expériences et l'exploitation statistique des résultats.

\* Les contrôles de pureté en gradient d'acrylamide ont indiqué la présence de HDL<sub>1</sub> dans la zone de densité des LDL.

Cette contamination, déjà rapportée par Koga et coll. (1969) (83), a été constante quels que soient les lots et les expériences.

Cependant, nous l'avons limitée en isolant les LDL dans la gamme de densité de 1,019 à 1,055 au lieu de 1,063 comme cela est fait habituellement.

Dans ces conditions, la présence des HDL<sub>1</sub> a été négligeable et n'a pas gêné notre étude.

Pour éliminer ces HDL<sub>1</sub>, une étape supplémentaire de purification aurait pu être effectuée. Kokkonen et coll. (1985) (84) sur LDL de rats ont utilisé une électrophorèse en bloc Pévikon, mais compte tenu du peu d'importance de la contamination, du faible volume de lipoprotéines dont nous disposions, et surtout des risques d'altération occasionnés par cette étape, nous n'avons pas retenu cette solution.

Notre objectif était ensuite d'obtenir, malgré la faible reproductibilité du rendement liée à la pauvreté en protéines, un marquage des LDL en accord avec la littérature : moins de 5 % de la radioactivité fixée sur la partie lipidique, et plus de 95 % de la radioactivité précipitable par le TCA.

Nous avons obtenu ces conditions chez le rat nourri avec le régime I.N.R.A., alors que dans le cas du régime U.A.R., le marquage lipidique était beaucoup trop important.

Ce changement est sans doute à relier à la différence de composition en huiles de ces 2 régimes.

Nous aurions pu choisir la technique de marquage de Bolton et Hunter telle qu'elle a été modifiée par Innerarity et coll. (1979) (85) utilisant la Chloramine comme source d'Iode radioactif, et décrite comme permettant une incorporation plus faible de l'Iode dans les lipides. Cependant, avec cette technique, Kokkonen et coll. (1985) (83) ont malgré tout obtenu pour les LDL de rats, un marquage lipidique trop important (10 %).

Quant à l'activité spécifique de nos LDL, elle a varié d'une expérience à l'autre mais est restée en accord avec les travaux de Zhang (1990) (24).

Pour rester dans les mêmes conditions que dans les travaux de Faure et coll. (1991) (62), nous avons choisi le mélange fer/ascorbate à 10/250  $\mu$ M comme agent d'oxydation des LDL, alors que la plupart des auteurs utilisent le cuivre à 5  $\mu$ M décrit initialement par Steinbrecher et coll. 1984 (86).

Le système fer/ascorbate a réalisé une oxydation des LDL in vitro suffisante pour les modifier. En effet, après ce stress oxydatif, leur captation et leur dégradation par le macrophage ont été significativement augmentées.

La mise au point de la méthode a été réalisée à des concentrations en LDL de 10, 9 et 5  $\mu\text{g/ml}$ . La réponse au stress oxydatif a été très nette puisque les taux de captation ont été multipliés par 3 ou 4 après incubation des LDL en présence de fer et d'ascorbate.

Avec des LDL natives à la concentration de 5  $\mu\text{g/ml}$ , nous avons obtenu un taux de captation de 0,41  $\text{ng}/\mu\text{g}/5\text{h}$ . Or, les LDL natives ne sont pas reconnues par les récepteurs "scavenger" des macrophages. Cette captation des LDL peut avoir 3 origines :

- les macrophages P388 D<sub>1</sub> possèdent des récepteurs à Apo B/E reconnaissant spécifiquement les LDL natives (Via et coll. 1985) (74),
- les monocytes-macrophages sont capables de phagocyter les LDL (Brown et coll. 1983) (87),
- lors de l'isolement et du marquage, l'altération d'une petite fraction des LDL est pratiquement inévitable. Ces LDL altérées peuvent alors être captées par les récepteurs "scavenger" des macrophages.

Comme l'indiquent les figures 13, 14 et 15 (page 61), la saturation des récepteurs macrophagiques n'a pas été atteinte pour des concentrations allant de 5 à 25  $\mu\text{g/ml}$ . Chez les animaux nourris au régime I.N.R.A., nous avons dû adopter le taux de 5  $\mu\text{g/ml}$  compte tenu des quantités de LDL isolées. A cette concentration, l'amplitude de la réponse à l'oxydation est plus faible que pour le taux couramment utilisé de 10  $\mu\text{g/ml}$  (Parthasarathy et coll. 1986) (88), mais dans nos conditions expérimentales, elle est restée significative.

De plus, la répétabilité ayant été très satisfaisante pour les mesures réalisées en double ou en triple (coefficient de variation < 10 %), et les conditions de marquage étant en accord avec la littérature, nous avons pu entreprendre par cette méthode l'étude de l'influence de la carence en zinc sur la peroxydation des LDL.

#### INFLUENCE DE LA CARENCE EN ZINC :

Chez les rats CZ, le ralentissement de la croissance, l'abaissement par rapport aux témoins, dès 3 semaines, du zinc plasmatique et du zinc fémoral, dont on sait

qu'il est le meilleur marqueur du statut (Momcilovic et coll. 1975) (89), ont indiqué que les carences étaient bien établies.

Cependant, lors de l'étude de plusieurs paramètres biologiques à différents temps de la carence, nous avons mis en évidence une baisse de la zincémie entre le début et la fin de l'expérience chez les animaux recevant un régime non carencé en zinc. Cette diminution du taux de zinc plasmatique est surprenante, la supplémentation à 100 mg de zinc /kg de régime devant couvrir largement les besoins physiologiques du rat, estimés à 12 mg/kg de régime.

Cette baisse est à l'évidence liée à la composition du régime I.N.R.A. et n'a pas été décrite à notre connaissance.

Cette influence du régime n'a pas gêné notre protocole expérimental, une carence significative ayant pu être établie, mais cet effet hypozincémiant mériterait d'être corrigé.

D'autre part, la composition et la teneur en zinc des régimes n'ont pas modifié l'absorption et la biodisponibilité du sélénium, comme en témoignent la stabilité des taux plasmatiques observée pour les 3 lots d'animaux au cours de l'expérience.

En revanche, nous avons été surprise de constater chez les rats carencés en zinc une baisse de la cuprémie, ce qui est contraire aux observations généralement décrites.

Cependant, Turnlund et coll. (1988) (90) ont rapporté que l'absorption du cuivre était inférieure chez des sujets recevant 5,5 mg de zinc par jour, par rapport à ceux recevant 16,5 mg par jour.

Dans l'étude des LDL de rats CZ et de leurs témoins, nous avons rencontré les mêmes difficultés que celles déjà décrites lors de la mise au point, et dues à la pauvreté du plasma en LDL.

L'utilisation du régime semi-synthétique I.N.R.A. a contribué à abaisser un taux de LDL déjà faible. En effet, dans ce type d'alimentation, l'apport lipidique est constitué par 4 % d'huile de maïs alors que les granulés U.A.R. sont plus riches en acides gras saturés. Les bilans lipidiques réalisés en contrôle ont indiqué une baisse importante du cholestérol-LDL. Ceci est en accord avec les travaux de Spady et coll. (1990) (91) établissant que les concentrations plasmatiques en LDL chutent lorsque, dans l'alimentation, les triglycérides saturés sont remplacés par des triglycérides insaturés.

Une modification de ce régime n'était cependant pas envisageable sans compromettre l'établissement de la carence en zinc.

De plus, la carence en zinc entraînant une augmentation importante de l'hématocrite et un ralentissement de la croissance, nous avons dû pooler le plasma de 5 rats carencés, pour obtenir un volume équivalent au plasma de 2 rats témoins AL.

Néanmoins, malgré un rendement irrégulier, le marquage des LDL a été satisfaisant et nous avons pu réaliser 6 séries de mesures.

Pour les raisons déjà évoquées dans la partie "Résultats", les LDL des témoins AL n'ont pu être étudiées que dans 4 de ces séries.

Il ressort de nos expériences que :

\* A l'état natif, la captation et la dégradation des LDL par les macrophages in vitro ne varient pas en fonction des lots.

Les LDL des rats CZ ne sont donc pas plus reconnues par le macrophage que celles des rats témoins, ce qui suggérerait qu'elles n'ont pas été modifiées in vivo.

Cependant, Nagelkerke et coll. (1984) (92) ont montré que les LDL modifiées disparaissent très rapidement de la circulation sanguine. La captation in vivo des LDL peroxydées, par les cellules possédant des récepteurs "scavenger", et/ou l'épuration plasmatique de ces LDL par le foie, rendraient l'isolement plasmatique de formes peroxydées très difficile. Ceci pourrait expliquer l'absence de différence entre les lots à l'état natif.

\* Après le stress oxydatif in vitro, la captation et la dégradation des LDL sont significativement augmentées par rapport à l'état natif.

Pour les 2 premières expériences, les taux de captation ont été multipliés respectivement par 4 et 2 en moyenne après oxydation, alors que pour les 4 expériences suivantes, les taux n'ont été augmentés en moyenne que d'un facteur 1,5.

Cette différence de réponse s'explique vraisemblablement par la différence de régime existant entre les 2 séries d'expériences. En effet, pour les expériences 1 et 2, les rats ont été nourris avec un régime préparé 4 mois auparavant, conservé à 4°C et à l'abri de la lumière. Les rats témoins PF et AL qui recevaient aussi ce régime, mais supplémenté à 100 ppm de zinc, présentaient également des pertes de poils.

Dans ces 2 expériences, le mauvais état général des animaux, ainsi que la susceptibilité importante des LDL à l'oxydation, pourraient s'expliquer par une altération des vitamines de ce premier régime. Il est un autre argument en faveur de cette hypothèse : au cours de l'expérience 2, cet ancien régime a été épuisé et les rats ont alors reçu pendant la dernière semaine un régime fraîchement préparé. La réponse à l'oxydation a diminué de moitié par rapport à la première expérience, pour laquelle les rats ont reçu uniquement de l'ancien régime. Il est donc probable que l'utilisation de régime frais pendant la dernière semaine ait pu restaurer en partie les défenses antioxydantes des rats en leur apportant les vitamines dont ils manquaient.



Par contre, une semaine de nouveau régime n'a pas suffi à compenser le mauvais état général des rats témoins non carencés.

C'est pour cette raison que nous n'avons exploité que les 4 dernières expériences sur le plan statistique.

Pour ces 4 manipulations, le pourcentage de dégradation des LDL captées est resté stable d'un lot à l'autre pour une même expérience. Cela signifie que les LDL des différents lots de rats subissent le même métabolisme à l'intérieur des macrophages.

De plus, les taux de dégradation et de captation mesurés après le stress oxydatif ne diffèrent pas en fonction des lots, et entre les résultats obtenus avec les LDL natives, et ceux obtenus avec les LDL oxydées, les pourcentages d'augmentation ne varient pas significativement d'un lot à l'autre.

Ces résultats laissent supposer que, dans nos conditions d'expérience, la susceptibilité à la peroxydation des LDL de rats carencés en zinc ne serait pas augmentée.

Cette constatation pourrait s'accorder indirectement avec les conclusions de travaux récents portant sur le vieillissement. Les revues de Yu (1990) (93) et de Masoro et coll. (1991) (94) font le point des études indiquant que la restriction alimentaire chronique module la production de radicaux libres.

Laganière et coll. (1987) (95) ont montré sur modèle animal que la production de MDA, et donc la peroxydation lipidique au niveau des membranes microsomales et mitochondriales hépatiques, augmente avec l'âge des animaux. Or, les membranes d'animaux soumis à restriction alimentaire produisent significativement moins de MDA que celles des rats nourris ad libitum.

Ainsi, dans la carence en zinc, l'inappétence qu'elle entraîne pourrait générer des perturbations métaboliques compensant un éventuel effet pro-oxydant du déficit en zinc. Cette hypothèse pourrait d'ailleurs expliquer en partie le phénomène de l'anorexie observé dans la carence en zinc.

On peut également supposer que la carence en zinc, compte tenu de ses effets sur le métabolisme des acides gras, serait susceptible de modifier la composition des LDL.

Il serait donc intéressant de préciser la composition en acides gras des LDL de rats carencés. Cette détermination permettrait de préciser si, dans nos conditions d'expérience, les changements de composition en acides gras sont en faveur d'une diminution de la peroxydation, liée à l'augmentation de la teneur des LDL en acides gras plus résistants aux stress oxydants.

Ainsi, la combinaison des effets protecteurs de la restriction calorique, et d'un éventuel l'enrichissement des LDL en acides gras moins insaturés, pourrait expliquer le comportement identique des LDL des différents lots de rats vis à vis du macrophage.

Nous avons exploré, au cours d'une autre expérience, certains composants du système de défense antiradicalaire, les TBARs, ainsi que la nature des acides gras plasmatiques.

Notre protocole comportait l'étude de la cinétique d'évolution de la SOD érythrocytaire, des GPX plasmatiques, et des TBARs au cours de la carence.

Il ressort de cette étude qu'il est nécessaire de prolonger la carence en zinc au delà de 3 semaines pour observer des variations significatives au niveau des paramètres que nous avons étudiés.

Ceci souligne la difficulté d'interprétation de résultats parfois publiés sur les effets d'une carence en zinc à court terme, par exemple 11 jours pour Emery et coll. 1990 (96), et une semaine pour Gordon et coll. 1980 (97).

Dans cette étude, la comparaison des résultats obtenus pour les rats PF, avec ceux des témoins AL, nous permet d'évaluer l'influence de la restriction calorique sur le bilan. Ainsi, ces 2 lots sont nourris avec le même régime à 100 ppm de zinc, mais les rats PF sont sous-nutris : ils reçoivent la même quantité de nourriture que les animaux carencés qui ont une inappétence due au déficit en zinc. Il est en effet important de prendre en compte la quantité de substrat susceptible d'être peroxydée, celle ci étant plus grande chez les rats AL que chez les rats CZ. Ainsi, malgré un équipement en SOD mieux adapté que pour les 2 autres lots, les rats AL ont le taux de MDA plasmatique le plus élevé.

Chez les rats PF par rapport aux témoins AL, les taux plasmatiques abaissés des vitamines A et E, ainsi que ceux des GPX, sont à relier à la diminution de l'apport alimentaire.

La baisse significative de la SOD érythrocytaire s'explique probablement par une diminution globale de la synthèse protéique due à la restriction calorique.

D'autre part, chez les animaux en pair-feeding, l'effet antiradicalaire de la restriction alimentaire précédemment évoqué, expliquerait le taux de MDA plasmatique abaissé par rapport aux témoins AL, et pourrait également justifier une baisse d'activité de la SOD érythrocytaire par adaptation métabolique à la diminution de production de radicaux libres.

\* Compte tenu des effets métaboliques de la restriction calorique, pour évaluer les conséquences propres de la carence en zinc sur le système de défense antiradicalaire et sur la production de MDA, nous avons comparé les résultats des animaux CZ avec ceux des rats PF. Ces 2 lots reçoivent la même quantité de régime, et ont donc potentiellement une quantité équivalente de substrats peroxydables.

Au terme de 7 semaines de régime I.N.R.A., la SOD érythrocytaire des rats CZ diminue de façon significative, suggérant un effet propre de la carence en zinc sur une enzyme antiradicalaire importante. Or, chez les animaux de ce groupe, le statut en zinc et en cuivre est perturbé, et ces 2 éléments sont indispensables à la fonctionnalité de l'enzyme (Forman et coll. 1973) (28).

Cette baisse d'activité de la SOD s'accorde avec l'augmentation des TBARs plasmatiques, qui, bien que non significative, est observée chez l'animal CZ par rapport à son témoin PF. Ces résultats pourraient suggérer une lipoperoxydation accrue induite par le déficit en zinc.

Toutefois, au cours de l'étude réalisée précédemment à Grenoble, Faure et coll. (1991) (62) ont rapporté des taux de MDA plasmatique plus élevés chez les animaux CZ que chez les rats témoins AL. Nos résultats montrant, chez les rats CZ, une lipoperoxydation moins importante que chez les témoins AL, semblent donc en désaccord avec ces travaux.

Ceci souligne la difficulté d'établir des carences en zinc reproductibles. Ainsi, dans l'expérience de Faure et coll., pour des conditions identiques d'animalerie et de régime, une zincémie moyenne plus basse que dans notre étude a été obtenue chez les rats carencés ( $7,05 \pm 0,2$  vs  $12,5 \pm 1,9 \mu\text{mol/l}$  ; témoins AL à  $23,1 \pm 0,7$  vs  $19,4 \pm 1,9 \mu\text{mol/l}$ ).

Cette carence plus prononcée que dans notre expérience pourrait être suffisante pour entraîner une production accrue de MDA plasmatique. De plus, si dans notre étude une carence en zinc significative a été établie, elle n'est cependant pas aussi prononcée que celles que nous avons obtenues lors des expériences sur macrophages. Ceci pourrait contribuer à la non significativité des comparaisons entre les rats CZ et les rats PF, concernant le MDA pour lequel p est très proche de 0,05, et expliquer l'absence d'abaissement des vitamines par rapport aux rats PF.

En ce qui concerne la vitamine E plasmatique, nos résultats sont en contradiction avec ceux de Bunk et coll. (1989) (55) qui rapportent un abaissement de celle-ci chez les rats CZ par rapport aux témoins PF et AL. Dans nos conditions d'expérience, la production accrue de MDA chez les rats carencés par rapport aux témoins

PF, bien que non significative, ne peut donc pas s'expliquer par un taux de vitamine E abaissé.

Pour ce qui est de la nature des acides gras plasmatiques, elle varie en fonction des lots d'animaux, et donc en fonction des régimes.

Chez l'animal nourri ad libitum, le taux élevé d'acide linoléique observé est à relier à la richesse du régime en huile de maïs. Dans ce lot, l'utilisation et l'incorporation de l'acide arachidonique dans les membranes cellulaires semblent satisfaisantes, comme en témoigne son taux plasmatique abaissé.

Pour les rats PF, le passage de l'acide linoléique à l'acide arachidonique semble se faire correctement, mais il semble que la restriction calorique ait un effet sur l'utilisation et l'incorporation de ce dernier dans les membranes, puisqu'on observe une augmentation de son taux par rapport aux rats AL.

Chez l'animal carencé en zinc comparé à l'animal en pair-feeding, on observe une modification significative des acides gras de la série Omega-6. L'acide linoléique est augmenté et l'arachidonique diminué. Ces résultats reflètent le mauvais fonctionnement de la voie des désaturases, enzymes de conversion du linoléate en arachidonate.

De plus, dans notre expérience, la carence en zinc entraîne une augmentation de l'acide  $\alpha$ -linoléique. Ce résultat n'a pas été décrit à notre connaissance au niveau plasmatique, mais Driscoll et coll. (1991) (98) ont rapporté, dans la carence en zinc, un enrichissement des membranes érythrocytaires en acides gras de la série Omega-3 (C 22:5 et C 22:6) aux dépens des acides gras en C 22 de la série Omega-6.

De même, Faure et coll. (1992) (99) ont montré sur plaquettes de rats carencés en zinc que l'incorporation des acides gras de la série n-3 dans les membranes plaquettaires est augmentée.

La carence en zinc entraînerait donc une compétition entre les séries n-6 et n-3 au profit des Omega-3, plus sensibles à la peroxydation que les Omega-6.

Cependant, cette hypothèse doit rester prudente. En effet, Laganière et coll. (1987) (47) ont rapporté que la carence en zinc modifie la composition en acides gras des membranes de microsomes hépatiques en augmentant leur contenu en acide linoléique (C18:2 n-6), et en diminuant celui en acide docosapentaénoïque (C22:5 n-3).

Les effets de la carence en zinc sur le métabolisme des acides gras seraient donc différents en fonction du type de membrane étudié. De plus, Driscoll et coll. (1991) (98) précisent que ces effets varient aussi suivant l'âge et le sexe du rat, la composition du régime, la durée et la sévérité de la carence.

Malgré la baisse de la SOD érythrocytaire chez le rat CZ, les résultats du bilan des systèmes protecteurs et du MDA, comme ceux de l'étude de captation des LDL par le macrophage, ne nous permettent pas de conclure à un effet délétère de la carence en zinc sur la peroxydation lipidique.

Cependant, cette hypothèse ne peut être écartée car nous devons prendre en compte les limites de nos expérimentations :

- Le modèle animal : Le rat, bien que seul modèle expérimental envisageable dans notre étude, présente des inconvénients.

L'obligation de travailler sur un pool de plasma, l'isolement de LDL à des taux très bas ont nui à la précision de nos résultats.

Comme l'a observé Chapman (1980) (100), compte tenu des variations biologiques inter-individuelles des rats, l'utilisation de pools de plasma risque de masquer la significativité des résultats mais cette démarche reste celle de nombreux auteurs.

- Les inconvénients du pair-feeding : Si les résultats de l'exploration des systèmes de défense antiradicalaire des animaux CZ doivent être comparés à ceux des témoins PF pour les raisons déjà mentionnées, la validité de ces témoins peut être critiquée. En effet, une restriction calorique est imposée à ces derniers. Ils sont donc perpétuellement affamés et consomment leur ration dès que celle-ci leur est donnée, c'est à dire en fin d'après-midi, contrairement aux rats carencés qui s'alimentent pendant la nuit comme tous les rongeurs. Ce mode d'alimentation particulier aux témoins PF n'est sans doute pas sans conséquences métaboliques.

Pour éviter ces différences nutritionnelles, Quarterman et coll. (1972) (101) ont conseillé d'utiliser un système de distribution du régime, permettant de donner en continu aux témoins PF, pendant la période d'alimentation des rats CZ, la même quantité de nourriture que celle consommée la veille par les rats carencés. Ceci permet donc aux différents lots d'animaux d'être dans le même état de jeun au moment du sacrifice, ce qui n'est pas le cas dans notre pair-feeding.

Ce mode d'alimentation des témoins PF donne une meilleure validité aux comparaisons entre les lots mais n'a pas pu être réalisé dans le cadre de notre expérimentation.

De plus, les animaux n'ayant pu, pour des raisons matérielles, être cagés individuellement, seule la consommation moyenne des animaux CZ a pu être déterminée. D'une part, les rats PF n'étaient pas appariés individuellement avec un rat CZ, d'autre part, la quantité de régime consommée n'était pas identique pour chaque rat PF, une hiérarchie s'établissant très vite entre les animaux.

Nous avons tenté de limiter ce dernier inconvénient en cageant les rats PF par 3.

- Le protocole expérimental : Nous avons estimé in vitro la réponse des LDL au stress oxydatif. Dans ces conditions, le comportement identique vis à vis du macrophage des LDL de rat CZ et de leur témoins n'exclue pas une peroxydation accrue des premières in vivo, celles-ci étant vraisemblablement peroxydées dans l'espace sous-endothélial des vaisseaux sanguins (Jürgens et coll. 1987) (10), et donc absentes de la circulation sanguine.

De plus, la sensibilité de la méthode n'est peut-être pas suffisante pour que la susceptibilité accrue à la peroxydation des LDL de rat CZ observée par Faure et coll. (1991) (62) se traduise par une différence significative de leur comportement vis à vis du macrophage, par rapport aux LDL de rats témoins.

Enfin, un plus grand nombre d'animaux et d'expériences permettrait peut-être de confirmer des tendances non significatives sur le plan statistique.

PERSPECTIVES : En l'absence de résultats permettant de conclure à un rôle néfaste de la carence en zinc sur la peroxydation des LDL, deux axes de recherche mériteraient d'être développés :

- l'étude de l'influence de la carence en zinc sur la composition des LDL :

- \* nature des acides gras
- \* teneur en vitamines liposolubles

- développement d'un nouveau modèle animal de carence en zinc mieux adapté à l'étude des lipoprotéines : le lapin serait un modèle de choix compte tenu d'un profil lipoprotéinique proche de celui de l'homme et d'un volume sanguin plus important que le rat.

De plus, il serait nécessaire de compléter l'estimation des marqueurs de la peroxydation par une mesure des hydroperoxydes organiques et des diènes conjugués plasmatiques.

Une étude de la cinétique d'apparition des diènes conjugués, au cours de l'oxydation des LDL par le cuivre in vitro (Esterbauer et coll. 1989) (102), permettrait, par une approche différente, d'estimer la fragilité des LDL dans la carence en zinc. Cette étude serait réalisable au laboratoire de Biochimie A du C.H.U. de Grenoble.

# CONCLUSIONS

Au cours de ce travail, nous avons observé chez le rat carencé en zinc, comparé à son témoin nourri en "pair-feeding", une diminution significative de la SOD érythrocytaire, suggérant une baisse de la protection antiradicalaire.

Cependant, la mesure des autres systèmes antioxydants, comme celle du MDA plasmatique, marqueur de la peroxydation, ainsi que l'étude de la captation des LDL par le macrophage, ne nous permettent pas de conclure que la carence en zinc facilite la peroxydation lipidique.

La non significativité des résultats concernant un effet propre de la carence en zinc, peut être due aux limites de notre protocole expérimental : rat comme modèle animal, inconvénients du pair-feeding, mesures in vitro, sensibilité de la méthode...

Dans nos conditions expérimentales, nous avons montré que chez l'animal carencé, l'estimation de la peroxydation liée au déficit en zinc était rendue difficile par la modulation de production des radicaux libres, due à la restriction calorique.

Ce point nous semble important à souligner car, si le lien entre radicaux libres et restriction calorique a été décrit, celui existant entre radicaux libres, restriction calorique et carence en zinc, n'a pas été rapporté à notre connaissance.

De plus, les effets de la carence en zinc et de l'inappétence sur le métabolisme des A.G.P.I. pourraient permettre une augmentation de la résistance des LDL à l'oxydation, entraînant à leur niveau un appauvrissement en A.G.P.I. à longue chaîne et à grand nombre de doubles liaisons, comme cela est déjà décrit pour certaines membranes.

Cette hypothèse reste cependant à vérifier.

En conclusion, dans nos conditions expérimentales, la carence en zinc à elle seule ne peut suffire à modifier de façon significative les systèmes de protection antioxydante et à induire une modification des LDL telle que leur reconnaissance par les macrophages en soit augmentée.

Nos résultats ne nous autorisent cependant pas à exclure un effet pro-oxydant in vivo de la carence en zinc, en particulier dans des conditions de stress oxydant accru.



CONCLUSIONSMémoire soutenu par Anne SCHMUCK

Selon une étude antérieure (Faure et coll. 1991), la carence en zinc entraînerait une lipoperoxydation accrue, en particulier celle des LDL dont on sait que, modifiées, elles sont captées par le récepteur "scavenger" des macrophages, et participent à la formation des cellules spumeuses.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons, chez le rat Wistar, étudié l'influence de la carence en zinc sur le risque de peroxydation lipidique. Ainsi, nous avons estimé au temps 0, en milieu et en fin de carence, certains composants du système de défense antiradicalaire (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, vitamines A et E), et un marqueur de la peroxydation lipidique (le malondialdéhyde). La nature des acides gras plasmatiques a également été déterminée en fin de carence.

Parallèlement, nous avons voulu estimer les conséquences de la carence en zinc sur la susceptibilité des LDL à la peroxydation.

Pour cela, nous avons isolé, marqué à l'iode 125, et soumis à un stress oxydant in vitro, des LDL de rats carencés en zinc. Nous avons ensuite mesuré leur captation et leur dégradation par les macrophages P388 D<sub>1</sub>, en les comparant à celles de LDL d'animaux non carencés (rats témoins "pair-fed" et témoins "ad libitum").

Nos résultats indiquent que, dans nos conditions expérimentales, la carence en zinc à elle seule ne peut suffire :

- à modifier de façon significative les systèmes de protection antioxydante,
- à induire une modification des LDL telle que leur reconnaissance par le macrophage en soit augmentée.

La non significativité de nos résultats peut être due soit aux limites de nos conditions expérimentales (rat comme modèle animal, inconvénients du "pair-feeding", ...), soit à des effets secondaires protecteurs, inhérents à la carence en zinc, en particulier la restriction alimentaire, connue pour avoir un effet antiradicalaire, et qui pourrait donc masquer un éventuel effet pro-oxydant de la carence en zinc.

Vu, le Doyen de la Faculté,

J. ROCHAT

Le Président du Jury  
(Nom et signature)

P. A M ROUSSEL

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le

LE PRESIDENT DE L'UNIVERSITE

J. FOURIER

A. NEMOZ

D. CORDARY

Vice-Président

# **BIBLIOGRAPHIE**

- 1- HALLIWELL B.  
Current status review : Free radicals, reactive oxygen species and human disease : a critical evaluation with special reference to atherosclerosis.  
Br J Exp Path, 1989, 70 : 737-757.
- 2- FONTECAVE M., PIERRE J.L.  
Activation et toxicité de l'oxygène. Principes des thérapeutiques antioxydantes.  
Bull Soc Chim Fr, 1991, 128 : 505-520.
- 3- SIES H.  
Oxydative stress : From basic research to clinical application.  
Am J Med, 1991, 91 (suppl 3C) : 31S-38S.
- 4- CRYSTAL R.G.  
Introduction.  
Am J Med, 1991, 91 (suppl. 3C) : 1S-13S.
- 5- HALLIWELL B.  
Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease : an overview.  
Methods in Enzymol, 1990, 186 : 1-85.
- 6- CAREW T.E., SCHWENKE D.C., STEINBERG D.  
Antiatherogenic effect of probucol unrelated to its hypocholesterolemic effect : evidence that antioxydants in vivo can selectively inhibit low density lipoprotein degradation in macrophage-rich fatty streaks and slow the progression of atherosclerosis in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit.  
Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84 : 7725-7729.
- 7- PALINSKI W., ROSENFELD M.E., YLÄ-HERTTUALA S, GURTNER G.C., SOCHER S.A., BUTLER S.W., PARTHASARATHY S., CAREW T.E., STEINBERG D., WITZTUM J.L.  
Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo.  
Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86 : 1372-1376.
- 8- YLÄ-HERTTUALA, PALINSKI W., ROSENFELD M.E., PARTHASARATHY S., CAREW T.E., BUTLER S., WITZTUM J.L., STEINBERG D.  
Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man.  
J Clin Invest, 1989, 84 : 1086-1095.
- 9- PARTHASARATHY S., FONG L.G., QUINN M.T., STEINBERG D.  
Oxidative modification of LDL : Comparison between cell-mediated and copper-mediated modification.  
Eur Heart J, 1990, 11 (suppl. E) : 83-87.

- 10- JÜRGENS G., HOFF H.F., CHISOLM G.M., ESTERBAUER H.  
Modification of human serum low density lipoprotein by oxidation. Characterisation and pathophysiological implications.  
Chem Phys Lipids, 1987, 45 : 315-336.
- 11- STEINBERG D., PARTHASARATHY S., CAREW T.E., KHOO J.C., WITZTUM J.L.  
Beyond cholesterol. Modification of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity.  
N Eng J Med, 1989, 320 : 915-924.
- 12- LUC G., DOUSTE-BLAZY P., FRUCHART J.C.  
Le cholesterol : d'où vient-il, comment circule-t-il, où va-t-il ?  
Rev Prat, 1989, 39 : 1011-1017.
- 13- ESTERBAUER H., QUEHENBERGER O., JÜRGENS G.  
Effect of peroxidative conditions on human plasma low-density lipoproteins.  
in : Eicosanoids, lipid peroxidation and cancer.  
Nigam et al. (Eds.), Berlin Heidelberg,  
1988 : 203-213.
- 14- KELLEY J.L.  
Macrophage scavenger receptor(s) for modified low density lipoproteins.  
Prog Lipid Res, 1991, 30 : 231-235.
- 15- KODAMA T.K., FREEMAN M., ROHRER L., ZABRECKY J., MATSUDAIRA P.,  
KRIEGER M.  
Type I macrophage scavenger receptor contains  $\alpha$ -helical and collagen-like coiled coils.  
Nature, 1990, 343 : 531-535.
- 16- ROHRER L., FREEMAN M., KODAMA T., PENMAN M., KRIEGER M.  
Coiled-coils fibrous domains mediate ligand binding by macrophage scavenger receptor type II.  
Nature, 1990, 343 : 570-572.
- 17- GOLDSTEIN J.L., HO Y.K., BASU S.K., BROWN M.S.  
Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition.  
Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76 : 333-337.
- 18- HENRIKSEN T., MAHONEY E.M., STEINBERG D.  
Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells : recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins.  
Proc Natl Acad Sci USA, 1981, 78 : 6499-6503.
- 19- HEINECKE J.W., BAKER L., ROSEN H., CHAIT A.  
Superoxide-mediated modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells.  
J Clin Invest, 1986, 77 : 757-761.

- 20- PARTHASARATHY S., PRINTZ D.J., BOYD D., JOY L., STEINBERG D.  
Macrophage oxidation of low density lipoprotein generates a modified form recognized by the scavenger receptor.  
Arteriosclerosis, 1986, 6 : 505-510.
- 21- SPARROW C.P., PARTHASARATHY S., STEINBERG D.  
A macrophage receptor that recognizes oxidized low density lipoprotein but not acetylated low density lipoprotein.  
J Biol Chem, 1989, 264 : 2599-2604.
- 22- ARAI K., KITA T., YOKODE M., NARUMIYA S., KAWAI C.  
Multiple receptors for modified low density lipoprotein in mouse peritoneal macrophages :  
Different uptake mechanisms for acetylated and oxidized low density lipoproteins.  
Biochem Biophys Res Commun, 1989, 159 : 1375-1382.
- 23- KOTTKE B.A.  
Role of macrophages in lipid metabolism.  
J Cardiovasc Pharmacol, 1987, 10 ( Suppl.9 ) : S7-S10.
- 24- ZHANG H., BASRA H.J.K., STEINBRECHER U.P.  
Effects of oxidatively modified LDL on cholesterol esterification in cultured macrophages.  
J Lipid Res, 1990, 31 : 1361-1369.
- 25- QUINN M.T., PARTHASARATHY S., FONG L.G., STEINBERG D.  
Oxidatively modified low density lipoproteins : a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis.  
Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84 : 2995-2998.
- 26- MOREL D.W., HESSLER J.R., CHISOLM G.M.  
Low density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipid.  
J Lipid Res, 1983, 24 : 1070-1076.
- 27- STEINBRECHER U.P., ZHANG H., LOUGHEED M.  
Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis.  
Free Rad Biol Med, 1990, 9 : 155-168.
- 28- FORMAN H.J., FRIDOVITCH I.  
On the stability of bovine superoxide dismutase.  
J Biol Chem, 1973, 248 : 2645-2649.
- 29- DEBY C., PINCEMAIL J.  
Toxicité de l'oxygène, radicaux libres et moyens de défense.  
Presse Med, 1986, 15 : 1468-1474.

- 30- PROCTOR P.H., REYNOLDS E.S.  
Free radicals and disease in man.  
Physiol Chem Phys, 1984, 16 : 175-195.
- 31- CHAZAN J.B., SZULC M.  
Radicaux libres et vitamine E.  
Cah Nutr Diet, 1987, 22 : 66-76.
- 32- SATO K., NIKI E., SHIMASAKI H.  
Free radical-mediated chain oxidation of low density lipoprotein and its synergistic inhibition by vitamin E and vitamin C.  
Arch Biochem Biophys, 1987, 199, 279 : 402-405.
- 33- HALLIWELL B., GUTTERIDGE M.C.  
The antioxidants of human extracellular fluids.  
Arch Biochem Biophys, 1990, 280 : 1-8.
- 34- KRINSKY N.I.  
Antioxydant functions of carotenoids.  
Free Rad Biol Med, 1989, 7 : 617-635.
- 35- THOMAS J.P., BACHOWSKI G.J., GIROTTI A.W.  
Inhibition of cell membrane lipid peroxidation by cadmium- and zinc- metallothioneins.  
Biochim Biophys Acta, 1986, 884 : 448-461.
- 36- THORNALLEY P.J., VASAK M.  
Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress.  
Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxile radicals.  
Biochim Biophys Acta, 1985, 827 : 36-44.
- 37- ARNAUD J., FAVIER A.  
Le zinc.  
in : CHAPPUIS P. Les oligoéléments en médecine et biologie. Ed Lavoisier Tec & Doc, Paris,  
1991 : 347-397
- 38- Mc CLAIN C.J., KASARSKIS J.R., ALLEN J.J.  
Functional consequences of zinc deficiency.  
Prog Food Nutr Sci, 1985, 9 : 185-226.
- 39- BRAY T.M., BETTGER W.J.  
The physiological role of zinc as an antioxydant.  
Free Radic Biol Med, 1990, 8 : 281-291.

- 40- ANONYME.  
Role of zinc in enzyme regulation and protection of essential thiol groups.  
Nutr Rev, 1986, 44 : 309-311.
- 41- SEARLE A.J.F., TOMASI A.  
Hydroxy free radical production in iron-cysteine solutions and protection by zinc.  
J Inorg Biochemistry, 1982, 17 : 161-166.
- 42- SZEBENI J., ESKELSON C.D., CHVAPIL M.  
The effect of zinc on iron-induced lipid peroxidation in different lipid systems including liposomes and micelles.  
Physiol Chem Phys, 1988, 20 : 205-211.
- 43- PETERSON D.A., GERRARD J.M., PELLER J., RAO G.H.R., WHITE J.G.  
Interaction of zinc and arachidonic acid.  
Prostaglandins and Medicine, 1981, 6 : 91-99.
- 44- CHVAPIL M.  
New aspects in the biological role of zinc : a stabiliser of macromolecules and biological membranes.  
Life Sci, 1973, 13 : 1041-1049.
- 45- BETTGER W.J., O'DELL B.D.  
A critical physiological role of zinc in the structure and function of biomembranes.  
Life Sci, 1981, 28 : 1425-1438.
- 46- BETTGER W.J., FISH T.J., O'DELL B.L.  
Effect of copper and zinc status of rats on erythrocyte stability and superoxide dismutase activity.  
Proc Soc Exp Biol Med, 1978, 158 : 279-282.
- 47- GIROTTI A.W., THOMAS J.P., JORDAN J.E.  
Inhibitory effect of zinc II on free radical lipid peroxidation in erythrocyte membranes.  
J Free Radic Biol Med, 1985, 1 : 395-401.
- 48- JEFFERY E.H.  
The effect of zinc on NADPH oxidation and monooxygenase activity in rat hepatic microsomes.  
Molec Pharmacol, 1983, 23 : 467-473.
- 49- CHVAPIL M., RYAN J.N., ELIAS S.L., PENG Y.M.  
Protective effect of zinc on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats.  
Exp Mol Pathol, 1973, 19 : 186-196.

- 50- CLARKE I.S., LUI E.M.K.  
Interaction of metallothionein and carbon tetrachloride on the protective effect of zinc on hepatotoxicity.  
Can J Physiol Pharmacol, 1986, 64 : 1104-1110.
- 51- CHVAPIL M., PENG Y.M., ARONSON A.L., ZUKOSKI C.  
Effects of zinc on lipid peroxidation and metal content in some tissues of rats.  
J Nutr, 1974, 104 : 434-443.
- 52- MATSUBARA J., SHIDA T., ISHIOKA K., EGAWA S., INADA T., MACHIDA K.  
Protective effect of zinc against lethality in irradiated mice.  
Environ Res, 1986, 41 : 558-567.
- 53- DAR M.S., TOWNSEND S.M., WOOLLES W.R.  
Protective effect of zinc against ethanol toxicity in mice.  
J Toxicol Env Health, 1986, 18 : 41-48.
- 54- BETTGER W.J., REEVES P.G., SAVAGE J.E., O'DELL B.D.  
Interaction of zinc and vitamin E in the chick  
Proc Soc Exp Biol Med, 1980, 163 : 432-436.
- 55- BUNK M.J., DNISTRIAN A.M., SCHWARTZ M.K., RIVLIN R.S.  
Dietary zinc deficiency decreases plasma concentrations of vitamin E.  
Proc Soc Exp Biol Med, 1989, 190 : 379-384.
- 56- BRAY T.M., KUBOW S., BETTGER W.J.  
Effect of dietary zinc on endogenous free radical production in rat lung microsomes.  
J Nutr, 1986, 116 : 1054-1060.
- 57- HAMMMERMUELLER J.D., BRAY T.M., BETTGER W.J.  
Effects of zinc and copper deficiency on microsomal NADPH-dependent active oxygen generation in rat lung and liver.  
J Nutr, 1987, 117 : 894- 901.
- 58- GÜNTHER T., HÖLLRIEGL V.  
Lipid peroxidation in mitochondria and microsomes from adults and fetal rat tissues. Effect of Zn deficiency, Fe, and Salicylate.  
Biol Trace Elem Res, 1989, 22 : 165-177.
- 59- TAYLOR C.G., BETTGER W.J., BRAY T.M.  
Effects of dietary zinc or copper deficiency on the primary free radical defense system in rats.  
J Nutr, 1988, 118 : 613-621.



- 60- TAYLOR C.G., TOWNER R.A., BRAY T.M.  
NMR imaging study on the effect of dietary zinc deficiency and hyperoxia on free radical-induced damage in rat lung.  
Proc Can Fed Biol Soc, 1989, 32 : 73 abstr.  
in : BRAY T.M., BETTGER W.J.  
The physiological role of zinc as an antioxidant.  
Free Radic Biol Med, 1990, 8 : 281-291.
- 61- COUDRAY C., BOUCHER F., RICHARD M.J., ARNAUD J., DE LEIRIS J., FAVIER A.  
Zinc deficiency, ethanol, and myocardial ischemia affect lipoperoxidation in rats.  
Biol Trace Elem Res, 1991, 30 : 103-117.
- 62- FAURE P., ROUSSEL A.M., RICHARD M.J., FOULON T., GROSLAMBERT P., HADJIAN A., FAVIER A.  
Effect of an acute zinc depletion on rat lipoprotein distribution and peroxidation.  
Biol Trace Elem Res, 1991, 28 : 135-146.
- 63- CUNNANE S.C.  
Role of zinc in lipid and fatty acid metabolism and in membranes.  
Prog Food Nutr Sci, 1988, 12 : 151-188.
- 64- CUNNANE S.C., HORROBIN D.F., MANKU M.S.  
Essential fatty acid in tissue phospholipids and triglycerides of the zinc-deficient rat.  
Proc Soc Exp Biol Med, 1984, 177 : 441-446.
- 65 CUNNANE S.C.  
Evidence that adverse effects of zinc deficiency on essential fatty acid composition in rats are independent of food intake.  
Br J Nutr, 1988, 59 : 273-278.
- 66- CUNNANE S.C., AINLEY C.C., KEELING P.W.N., THOMPSON R.P.H., CRAWFORD M.A.  
Diminished phospholipid incorporation of essential fatty acids in peripheral blood leucocytes from patients with Crohn's disease : Correlation with zinc depletion.  
J Am Coll Nutr, 1986, 5 : 451-458.
- 67- HAVEL R.J., EDER H.A., BRAGDON J.H.  
The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum.  
J Clin Invest, 1955, 34 : 1345-1353.
- 68- RADDING C.M., STEINBERG D.  
Studies on the synthesis and secretion of serum lipoproteins by rat liver slices.  
J Clin Invest, 1960, 39 : 1560-1569.

- 69- PETERSON G.L.  
A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable.  
Anal Biochem, 1977, 83 : 346-356.
- 70- GAMBERT P., FARNIER M., BOUZERAND C., ATHIAS A., LALLEMANT C.  
Direct quantification of serum high density lipoprotein subfractions separated by gradient gel electrophoresis.  
Clin Chim Acta, 1988, 172 : 183-190.
- 71- MC FARLANE A.S.  
Efficient trace-labelling of proteins with iodine.  
Nature, 1958, 182 : 53.
- 72- BILHEIMER D.W., EISENBERG S., LEVY R.I.  
The metabolism of very low density lipoprotein proteins I. Preliminary in vitro and in vivo observations.  
Biochim Biophys Acta, 1972, 260 : 212-221.
- 73- KOLAROVIC L.R., FOURNIER N.C.  
A comparison of extraction methods for the isolation of phospholipids from biological sources.  
Anal Biochem, 1986, 156 : 244-250.
- 74- VIA D.P., PLANT A.L., CRAIG I.F., GOTTO A.M., SMITH L.C.  
Metabolism of normal and modified low-density lipoproteins by macrophage cell lines of murine and human origin.  
Biochim Biophys Acta, 1985, 833 : 417-428.
- 75- KRAEMER F.B., TAVANGAR K., GANDJEI R.K., KIRLEW K., BEHR S.R.  
Effect of activation on lipid and lipoprotein metabolism in murine macrophages.  
Arteriosclerosis, 1990, 10 : 8-16.
- 76- ARNAUD J., FORTIS I., BLACHIER S., KIA D., FAVIER A.  
Simultaneous determination of retinol, alpha-tocopherol and beta-carotene in serum by isocratic high-performance liquid chromatography.  
J Chromatogr, 1991, 572 : 103-116.
- 77- GUNZLER W.A., KREMERS H., FLOHE L.  
An improved coupled test procedure for glutathion peroxidase in blood.  
Z Klin Chem Klin Biochem, 1974, 12 : 444-448.
- 78- MARKLUND S., MARKLUND G.  
Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase.  
Eur J Biochem, 1974, 47 : 469-474.



- 79- RICHARD M.J., ARNAUD J., JURKOVITZ C., HACHACHE T., MEFTAH H., LAPORTE F., FORET M., FAVIER A., CORDONNIER D.  
Trace element and lipid peroxidation abnormalities in patients with chronic renal failure.  
*Nephron*, 1991, 57 : 10-15.
- 80- FOLCH J.M., LEES M., SLOANE-STANLEY G.H.  
A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues.  
*J Biol Chem*, 1957, 226 : 497-509.
- 81- MORRISSON W.R., SMITH L.M.,  
Preparation of fatty acid methyl esters and dimethyl acetates from lipids with boron fluoride methanol.  
*J Lipid Res*, 1964, 5 : 600-608.
- 82- OSCHRY Y., EISENBERG S.  
Rat plasma lipoproteins : re-evaluation of a lipoprotein system in an animal devoid of cholesteryl ester transfer activity.  
*J Lipid Res*, 1982, 23 : 1099-1106.
- 83- KOGA S., HORWITZ D.L., SCANUS A.M.  
Isolation and properties of lipoproteins from normal rat serum.  
*J Lipid Res*, 1969, 10 : 577-588.
- 84- KOKKONEN J.O., KOVANEN P.T.  
Low density lipoprotein degradation by rat mast cells. Demonstration of extracellular proteolysis caused by mast cell granules.  
*J Biol Chem*, 1985, 260 : 14756-14763.
- 85- INNERARITY T.L., PITAS R.E., MALHLEY R.W.  
Binding of Arginine-rich (E) apoprotein after recombination with phospholipid vesicles to the low density lipoprotein receptors of fibroblasts.  
*J Biol Chem*, 1979, 254 : 4186-4190.
- 86- STEINBRECHER U.P., PARTHASARATHY S., LEAKE D.S., WITZTUM J.L., STEINBERG D.  
Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids.  
*Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81 : 3883-3887.
- 87- BROWN M.S., GOLDSTEIN J.L.  
Lipoprotein metabolism in the macrophage : implications for cholesterol deposition in atherosclerosis.  
*Annual Rev Biochem*, 1983, 52 : 223-261.

- 88- PARTHASARATHY S., YOUNG S.G., WITZTUM J.L., PITTMAN R.C., STEINBERG D.  
Probucol inhibits oxidative modification of low density lipoprotein.  
J Clin Invest, 1986, 77 : 641-644.
- 89- MOMCILOVIC B., BELONGE B., SHAH B.G.  
Suitability of young rat tissue for a zinc bioassay.  
Nutr Rep Int, 1975, 1 : 445-452.
- 90- TURNLUND J.R., WADA L., KING J.C., KEYES W.R., ACORD L.L.  
Copper absorption in young men fed adequate and low zinc diets.  
Biol Trace Elem Res, 1988, 17 : 31-41.
- 91- SPADY D.K., WOOLLETT L.A.  
Interaction of dietary saturated and polyunsaturated triglycerides in regulating the processes that determine plasma low density lipoprotein concentrations in the rat.  
J Lipid Res, 1990, 31 : 1809-1819.
- 92- NAGELKERKE J.F., HAVEKES L., VAN HINSBERG V.W.M., VAN BERKEL T.J.C.  
In vivo catabolism of biologically modified LDL.  
Arteriosclerosis, 1984, 4 : 256-264.
- 93- YU B.P.  
Free radicals and modulation by dietary restriction.  
Age and Nutrition, 1991, 2 : 84-89.
- 94- MASORO E.J., SHIMOKAWA I., YU B.P.  
Retardation of the aging processes in rats by food restriction.  
Ann NY Acad Sci, 1991, 62 : 337-352.
- 95- LAGANIERE S., YU B.P.  
Anti-lipoperoxidation action of food restriction.  
Biochem Biophys Res Commun, 1987, 145 : 1185-1191.
- 96- EMERY M.P., BROWNING J.D., O'DELL B.L.  
Impaired hemostasis and platelet function in rats fed low zinc diets based on egg white protein.  
J Nutr, 1990, 120 : 1062-1067.
- 97- GORDON P.R., O'DELL B.L.  
Rat platelet aggregation impaired by short-term zinc deficiency.  
J Nutr, 1980, 110 : 2125-2129.
- 98- DRISCOLL E.R., BETTGER W.J.  
The effect of dietary zinc deficiency on the lipid composition of the rat erythrocyte membrane.  
Lipids, 1991, 26 : 459-466.

- 99- FAURE P., BLACHE D., FAVIER A., ROUSSEL A.M.  
Effects of a long term zinc-deficient diet on the evolution of rat platelet aggregation :  
consequences on platelet arachidonate metabolism and fatty acid distribution.  
Soumis à comité de lecture, 1992.
- 100-CHAPMAN M.J.  
Animal lipoproteins : chemistry, structure, and comparative aspects.  
J Lipid Res, 1980, 21 : 789-853.
- 101-QUATERMAN J., FLORENCE E.  
Observation on glucose tolerance and plasma levels of free fatty acids and insulin in the zinc-  
deficient rat.  
Br J Nutr, 1972, 28 : 75-79.
- 102-ESTERBAUER H., STRIEGL G., PUHL H., ROTHENEDER M.  
Continuous monitoring of in vitro oxidation of human LDL.  
Free Radic Res Commun, 1989, 6 : 67-75.



CONCLUSIONS

Mémoire soutenu par Anne SCHMUCK

Selon une étude antérieure (Faure et coll. 1991), la carence en zinc entraînerait une lipoperoxydation accrue, en particulier celle des LDL dont on sait que, modifiées, elles sont captées par le récepteur "scavenger" des macrophages, et participent à la formation des cellules spumeuses.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons, chez le rat Wistar, étudié l'influence de la carence en zinc sur le risque de peroxydation lipidique. Ainsi, nous avons estimé au temps 0, en milieu et en fin de carence, certains composants du système de défense antiradicalaire (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, vitamines A et E), et un marqueur de la peroxydation lipidique (le malondialdéhyde). La nature des acides gras plasmatiques a également été déterminée en fin de carence.

Parallèlement, nous avons voulu estimer les conséquences de la carence en zinc sur la susceptibilité des LDL à la peroxydation.

Pour cela, nous avons isolé, marqué à l'iode 125, et soumis à un stress oxydant in vitro, des LDL de rats carencés en zinc. Nous avons ensuite mesuré leur captation et leur dégradation par les macrophages P388 D<sub>1</sub>, en les comparant à celles de LDL d'animaux non carencés (rats témoins "pair-fed" et témoins "ad libitum").

Nos résultats indiquent que, dans nos conditions expérimentales, la carence en zinc à elle seule ne peut suffire :

- à modifier de façon significative les systèmes de protection antioxydante,
- à induire une modification des LDL telle que leur reconnaissance par le macrophage en soit augmentée.

La non significativité de nos résultats peut être due soit aux limites de nos conditions expérimentales (rat comme modèle animal, inconvénients du "pair-feeding",...), soit à des effets secondaires protecteurs, inhérents à la carence en zinc, en particulier la restriction alimentaire, connue pour avoir un effet antiradicalaire, et qui pourrait donc masquer un éventuel effet pro-oxydant de la carence en zinc.

Vu, le Doyen de la Faculté,

J. ROCHAT

Le Président du Jury  
(Nom et signature)

R. A M ROUSSEL

VU ET PERMIS D'IMPRIMER  
Grenoble, le 9 juin 1992  
LE PRESIDENT DE L'UNIVERSITE  
J. FOURIER

p/o

A. NEMOZ

D. CORDARY

Vice-Président

## RESUME

Plusieurs études ont montré que la carence en zinc pourrait favoriser la peroxydation lipidique, en particulier dans des conditions de stress oxydant accru.

Afin de préciser l'influence de la carence en zinc sur la peroxydation lipidique chez le rat Wistar, nous avons déterminé l'évolution, au cours de la carence, de certains composants du système de défense antiradicalaire, et d'un marqueur de la peroxydation lipidique. La nature des acides gras plasmatiques a été déterminée en fin de carence.

Parallèlement, après adaptation des différentes techniques à notre modèle animal, nous avons estimé les conséquences de la carence en zinc sur la susceptibilité des LDL à la peroxydation, en mesurant leur captation et leur dégradation par les macrophages P388 D<sub>1</sub>, avant et après oxydation de ces LDL in vitro.

Nos résultats indiquent, que dans nos conditions expérimentales, la carence en zinc à elle seule ne peut suffire :

- à modifier de façon significative les systèmes de protection antioxydante,
- à induire une modification des LDL telle que leur captation par le macrophage en soit augmentée.

Ceci pourrait s'expliquer en partie par l'effet antiradicalaire de la restriction alimentaire inhérente à la carence en zinc.

---

## MOTS-CLES

Carence en zinc - Peroxydation lipidique - Rat - Défenses antiradicalaires -  
LDL oxydées - Macrophages -

---