

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Effets du vin sur les membranes biologiques

Jaworski, Kathy

Award date:
1994

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES N.-D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTE DES SCIENCES**

EFFETS DU VIN SUR LES MEMBRANES BIOLOGIQUES

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences**

biologiques

Kathy Jaworski

1994

EFFETS DU VIN SUR LES MEMBRANES BIOLOGIQUES

Jaworski Kathy

Résumé

Certaines études épidémiologiques suggèrent que la consommation modérée de vin protège jusqu'à un certain point contre les maladies cardiovasculaires. Le mécanisme de ce phénomène n'est pas connu. C'est dans l'optique de ces observations que nous avons recherché l'effet du vin au niveau de deux membranes biologiques: la membrane lysosomale et la membrane des globules rouges humains soumises toutes deux à un système lésant, soit un système producteur de radicaux libres, soit un système enzymatique utilisant la phospholipase C.

Nous avons trouvé que Le vin protège les lysosomes de l'agression des radicaux libres et les globules rouges (non les lysosomes) de l'action de la phospholipase C. Certains composés phénoliques contenus dans le vin (notamment les flavonoïdes) exercent un effet comparable à celui du vin évoqué auparavant. L'effet du vin pourrait donc être dû aux composés phénoliques qu'il contient. Dès lors, nous avons recherché si une relation existait entre la teneur en polyphénols de différents vins et le degré de protection que ceux-ci peuvent apporter aux lysosomes soumis au stress oxydatif et aux globules rouges traités à la phospholipase C.

Quoique l'échantillonnage soit restreint à neufs vins, il semble que les vins les plus riches en polyphénols sont les plus efficaces pour protéger les membranes.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Décembre 1994

Promoteur : S. Wattiaux-De Coninck

A l'issue de cette année académique, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé à l'élaboration de ce travail.

Il m'est difficile d'exprimer en quelques mots ma reconnaissance envers le professeur R. Wattiaux.

C'est grâce à la compétence, au dynamisme naturel et à l'intérêt dont il a fait preuve que j'ai pu mener à bien ces recherches.

Mes remerciements s'adressent également à Madame S. Wattiaux Deconinck pour ses petits conseils judicieux et sa disponibilité en cas "d'accident involontaire" (rendez-vous chez l'ophtalmologue), ainsi qu'à Monsieur Dubois pour le savoir-faire et les conseils pratiques qui réduisent à néant toutes les difficultés.

J'adresse également mes plus vifs remerciements à tous les autres membres du laboratoire de chimie physiologique :

Monsieur Van Dijck (pour ses mini cours d'ordinateur et ses conseils concernant les produits utilisés)

Monsieur Mainferme, Monsieur Jadot, Arlette, Jacqueline Tirion, Marie-France, Marie-Jeanne et Michel Savels pour le soutien qu'ils m'ont apporté durant toute cette année.

Enfin, merci aussi à tous ceux que je n'ai pas cités et qui m'ont aidés de quelque manière que ce soit.

T A B L E D E S M A T I E R E S

INTRODUCTION

I.	IMPORTANCE DES MALADIES CARDIOVASCULAIRES	1
II.	LES FACTEURS DE RISQUE	1
III.	LE PARADOXE FRANCAIS "THE FRENCH PARADOX"	1
III.1.	Définition	1
III.2.	Facteurs proposés pour expliquer le paradoxe français	2
IV.	MECANISMES POSSIBLES D'ACTION DU VIN	3
IV.1.	Action dans l'athérosclérose	3
IV.2.	Action dans l'hémostase	3
IV.3.	Action antioxydante	3
V.	COMPOSITION DU VIN	4
V.1.	Les flavonoïdes (généralités)	5
V.2.	Propriétés générales	5
V.3.	Structure fondamentale	5
V.4.	Les principales classes de flavonoïdes et leurs composés apparentés	6
VI.	LES MEMBRANES BIOLOGIQUES	7
VI.1.	La membrane lysosomale	7
VI.2.	La membrane plasmique érythrocytaire	7
VI.3.	Système lésant les membranes	8
VI.3.1.	<i>Système générateur de radicaux libres oxygénés</i>	8
VI.3.2.	<i>Système enzymatique : la Phospholipase C</i>	9
VI.3.3.	<i>Estimation de l'efficacité du système lésant</i>	10

MATERIELS ET METHODES

I.	FRACTIONNEMENT SUBCELLULAIRE	11
I.1.	Préparation de l'homogénat	11
I.2.	Centrifugation différentielle	11
I.2.1.	<i>Principe</i>	11
I.2.2.	<i>Préparation de la fraction L</i>	12
II.	EXPERIENCES SUR LES MEMBRANES SUBCELLULAIRES	12
II.1.	Principe expérimental	12
II.2.	Substances testées : vins et composés phénoliques	13
II.2.1.	<i>Les vins</i>	13
II.2.2.	<i>Les composés phénoliques</i>	13
II.3.	Effets des radicaux libres	14
II.3.1.	<i>Production radicalaire enzymatique : X-Xo Fe/ADP</i>	14
II.3.2.	<i>Production radicalaire chimique acide ascorbique / Fe Cl₂</i>	15
II.4.	Système enzymatique : la Phospholipase C	16
II.4.1.	<i>Principe théorique</i>	16
II.4.2.	<i>Protocole expérimental</i>	16
III.	EXPERIENCES D'HEMOLYSE SUR GLOBULES ROUGES HUMAINS	17
III.1.	Obtention des globules rouges humains	17
III.2.	Système lésant la membrane des globules rouges : la Phospholipase C	17
III.2.1.	<i>Principe expérimental</i>	17
III.2.2.	<i>Protocole expérimental</i>	17

IV.	LES DOSAGES	18
IV.1.	Dosages enzymatiques	18
<i>IV.1.1.</i>	<i>Dosage de la N-agase (lysosome)</i>	<i>18</i>
<i>IV.1.2.</i>	<i>Dosage de la catalase (peroxysome)</i>	<i>18</i>
<i>IV.1.3.</i>	<i>Dosage de la sulfite cytochrome C réductase (mitochondrie)</i>	<i>19</i>
<i>IV.1.4.</i>	<i>Dosage de la malate déshydrogénase (mitochondrie)</i>	<i>19</i>
<i>IV.1.5.</i>	<i>Dosage de la xanthine oxydase</i>	<i>20</i>
IV.2.	Dosage des composés phénoliques des vins et courbe d'étalonnage de la quercétine	21

PRESENTATION DES RESULTATS

CHAPITRE I.	INFLUENCE DU VIN SUR LES MEMBRANES SUBCELLULAIRES SOUMISES A L'ACTION DES RADICAUX LIBRES	22
I.1.	Effet du système radicalaire enzymatique X-XO Fe/ADP	22
<i>I.1.1.</i>	<i>Effet du vin sur les organites mis en présence du système X-XO Fe/ADP</i>	<i>22</i>
I.2.	Effet du système radicalaire chimique acide ascorbique/Fe Cl₂	23
I.3.	Effet de l'éthanol	23
I.4.	Effet du vin rouge sur l'activité de la xanthine oxydase	24

CHAPITRE II.	INFLUENCE DU VIN SUR LES LYSOSOMES ET LES GLOBULES ROUGES HUMAINS SOUMIS A L'ACTION DE LA PHOSPHOLIPASE C	25
II.1.	Effet de la Phospholipase C sur les globules rouges	25
II.2.	Effet du vin sur l'hémolyse produite par la Phospholipase C	25
II.3.	Effet du vin sur les lysosomes soumis à l'action de la Phospholipase C	26
II.4.	Effet du vin rouge sur l'activité de la Phospholipase C	26
CHAPITRE III.	INFLUENCE DE CERTAINES SUBSTANCES PRESENTES DANS LE VIN SUR LES LYSOSOMES SOUMIS AU SYSTEME X-XO ET LES GLOBULES ROUGES TRAITES PAR LA PHOSPHOLIPASE C	27
III.1.	Effet de la quercétine, de la catéchine, du resvératrol et de l'endotélon sur les lysosomes soumis au système X-XO	27
III.2.	Effet de la quercétine, de la catéchine, du resvératrol et de l'endotélon sur les lysosomes et les globules rouges traités par la Phospholipase C	27
III.2.1.	<i>Lysosomes</i>	27
III.2.2.	<i>Globules rouges</i>	28

CHAPITRE IV.	EFFET COMPARATIF DES DIFFERENTS VINS SUR LA LYSE DES LYSOSOMES INDUITE PAR LE SYSTEME X-XO ET SUR L'HEMOLYSE PROVOQUEE PAR LA PHOSPHOLIPASE C	29
IV.1.	Dosage des composés phénoliques	29
IV.2.	Effet des différents vins sur les lysosomes soumis au système X-XO	29
IV.3.	Effet des différents vins sur l'hémolyse provoquée par la Phospholipase C	30
IV.4	Relation avec la teneur en polyphénols	30
	DISCUSSION DES RESULTATS	31

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

I. IMPORTANCE DES MALADIES CARDIOVASCULAIRES.

Les maladies cardiovasculaires (M.C.V.) sont des affections graves, inégalement réparties à la surface du globe : elles touchent quasiment 1 personne sur 2 dans les pays développés et seulement 1 personne sur 6 dans les pays en voie de développement (Caen, 1992). Ces maladies nous concernent donc particulièrement. Les Etats-Unis, le Royaume-Uni sont par exemple des pays à grand risque vasculaire (Stanford, U.S.A: 182/100.000 hommes/an; Belfast, U.K: 348/100.000 hommes/an; Renaud et De Lorgeril, 1992).

II. LES FACTEURS DE RISQUE.

Certains des facteurs de risque de maladies cardiovasculaires (M.C.V) sont quantifiables, tels que l'hypertension, le tabagisme et le poids excédentaire; d'autres font appel à la mémoire "médicale" des sujets, tels les antécédents familiaux de diabète ou de M.C.V; enfin l'alimentation intervient: en effet, une corrélation positive a été observée entre le risque de maladies cardiovasculaires et la consommation en acides gras et ce dans plusieurs pays développés (Renaud et De Lorgeril, 1992).

III. LE PARADOXE FRANCAIS (the "French Paradox").

III.1. DEFINITION

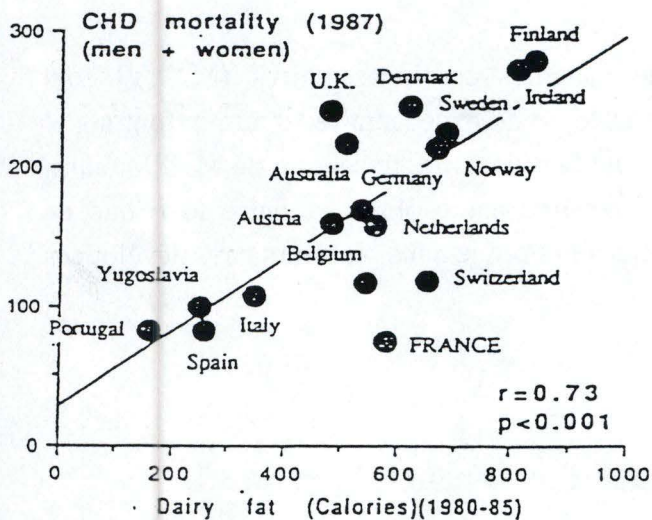
On constate en France, une situation paradoxale: alors que la consommation de graisses saturées, facteur de risque majeur de M.C.V est forte en France et égale à celle des pays d'Europe du Nord, la mortalité par M.C.V y est bien inférieure à celle de ces pays (78/100.000 hommes /an, voir fig. 1 et fig.2, Renaud et de Lorgeril, 1992). Le paradoxe est ainsi défini.

—AGE-STANDARDISED ANNUAL MORTALITY FROM
CHD, AND RELATED RISK FACTORS IN MONICA POPULATIONS
(35-64 YEARS)

MONICA centre	Annual CHD mortality/ 100 000 population		Mean serum cholesterol (mg/dl)*		Mean systolic blood pressure (mm Hg)		Proportion of regular cigarette smokers (%)	
	Men	Women	Men	Women	Men	Women	Men	Women
Japan	33	9
Beijing, China	49	27	163	166	130	129	50	16
Toulouse, France	78	11	230	224	133	128	37	17
Strasbourg, France	102	21	218	216	145	137	34	15
Lille, France	105	20	252	248	139	135	39	11
Switzerland	103	17	248	232	132	126	32	21
Stanford, USA	182	48	209	205	123	124	40	37
Belfast, UK	348	88	232	236	135	132	34	33
Glasgow, UK	380	132	244	248	138	134	52	50

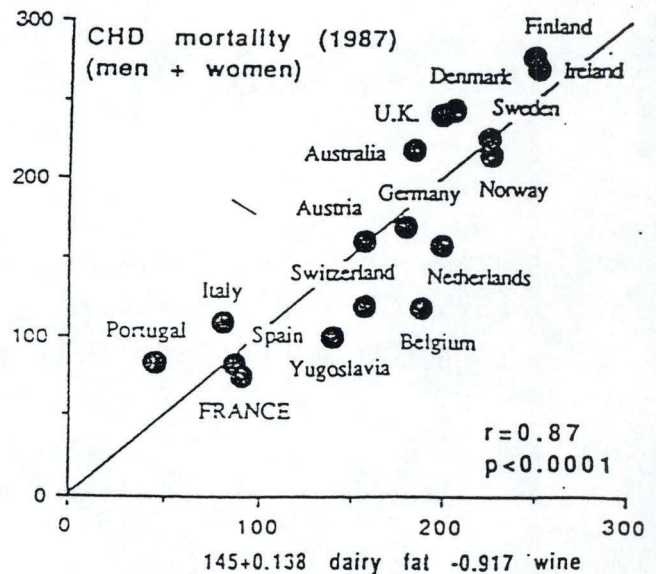
Data from ref 1. *mmol/l serum cholesterol = mg/dl ÷ 38.7.

ADDRESS: INSERM, Nutrition and Vascular Physiopathology
Research Unit (Unit 63), 22 avenue du Doyen Lepine, CP 18,
69675 Bron Cedex, France (S. Renaud, PhD, M. de Lorgeril, MD).
Correspondence to Dr S. Renaud.



—Relation between age-standardised death rate from CHD (mean for men and women)¹ and consumption of dairy fat in countries reporting wine consumption.

Regression equation: $y = 26.3 + 0.27 \text{ dairy fat}$



—Relation between age-standardised death rate from CHD (mean for men and women)¹ and consumption of dairy fat and of wine in countries reporting wine consumption.

Regression equation: $y = 145 + 0.138 \text{ dairy fat} - 0.917 \text{ wine}$.

III.2. FACTEURS PROPOSES POUR EXPLIQUER LE PARADOXE FRANCAIS

Ce paradoxe français pourrait être dû à la consommation régulière de vin (Caen, 1992). En effet, la plupart des enquêtes épidémiologiques démontrent que le vin diminue le risque de M.C.V (Suh et al., 1992; Rimm et al., 1991).

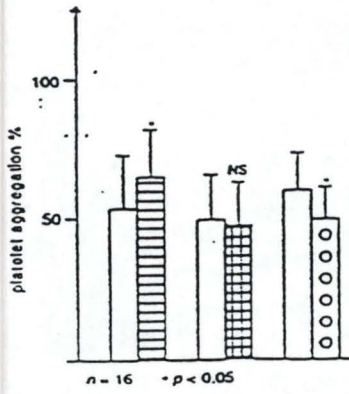
Ainsi, les Français qui consomment le plus de vin ont le moins de maladies cardiaques oblitérantes, en particulier d'infarctus. Ceci s'observe à Toulouse par exemple, où la consommation d'alcool est de 38 g par jour dont 34 g sous la forme de vin (Renaud et De Lorgeril, 1992). Cette éventuelle relation entre le vin et les maladies cardiovasculaires se confirme également dans d'autres pays (Renaud et De Lorgeril, 1992). Dans ce paradoxe, à l'opposé de la France, on trouve le Royaume-Uni: celui-ci présente un risque de M.C.V plus élevé que celui des autres pays et une consommation d'acides gras identique.

Or, la consommation de vin y est relativement faible.

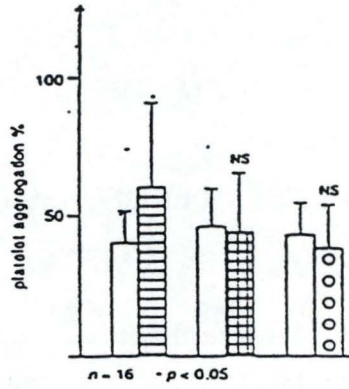
En définitive , 2 facteurs nutritionnels pourraient être liés au risque de M.C.V: les consommations de graisses saturées et de vin qui, respectivement, augmentent et diminuent le risque.

Les études épidémiologiques suggèrent qu'une consommation de vin de 20 - 30 g par jour peut réduire le risque de maladies cardiovasculaires d'au moins 40 %. (Renaud et de Lorgeril, 1992).

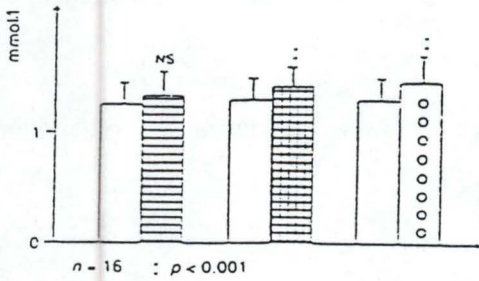
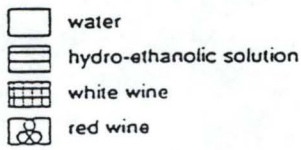
Ces résultats conduisent donc à prôner une consommation modérée de vin dans une optique d'amélioration de la santé publique.



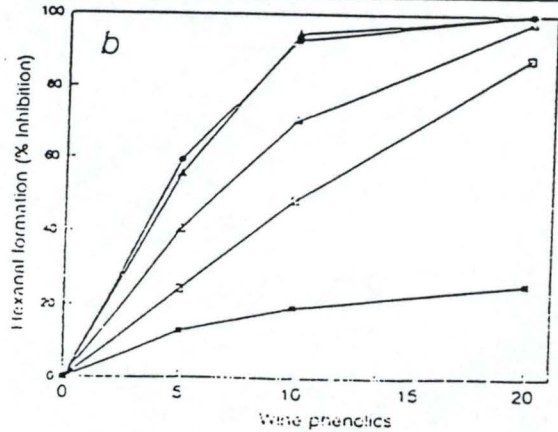
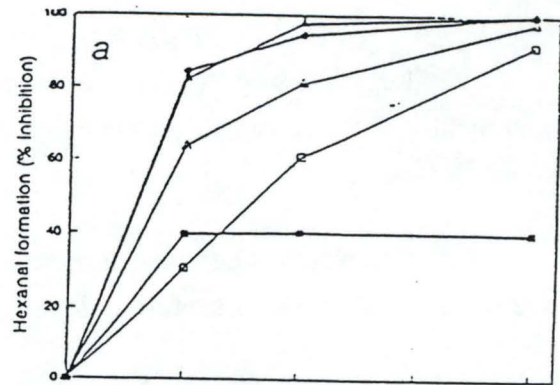
Effect of alcohol, white wine, and red wine on ADP (2uM) induced platelet aggregation.



Effect of alcohol, white wine, and red wine on adrenalin (0,75 mg/ml) induced platelet aggregation.



Effect of alcohol, white wine, and red wine on serum HDL-cholesterol



Inhibition of oxidation of two LDL samples (a and b) by wine phenolics (µmol/L).

Filled squares = α -tocopherol, open squares = phenolic compounds of red wine, open triangles = *trans*-resveratrol, filled triangles = quercetin, filled circles = epicatechin

IV. MECANISMES POSSIBLES D'ACTION DU VIN.

Plusieurs études in vitro ont été réalisées dans ce domaine. Le mécanisme de l'effet protecteur essentiel n'est pas encore identifié.

IV.1. ACTION DANS L'ATHEROSCLEROSE

Un facteur qui pourrait jouer est l'effet du vin sur le H.D.L. cholestérol, en effet, les vins augmentent le taux de H.D.L. sérique. Il est suggéré que 50 % de la réduction du risque de M.C.V. serait dûe aux modifications des H.D.L mais ce point de vue n'est pas partagé par tous (Ghalim,1991). A noter que, certaines études montrent que l'alcool, à consommation modérée, augmente également le taux de H.D.L (Seigneur et al.).

IV.2. ACTION DANS L'HEMOSTASE

Un autre mécanisme possible passerait par la réduction de l'aggrégation plaquettaire. Des études ont montré que le vin rouge diminue l'aggrégation des plaquettes induites par l'A.D.P.

On attribue cet effet du vin rouge à certains tannins contenus dans celui-ci et que l'on ne retrouve pas dans le vin blanc.

Le vin blanc n'a d'ailleurs aucun effet significatif.

Par contre, l'alcool provoque une augmentation de l'aggrégation plaquettaire induite par l'A.D.P et l'adrénaline (Seigneur et al.) (voir fig. 5 et 6).

IV.3. ACTION ANTIOXYDANTE

Le vin pourrait avoir des propriétés particulièrement bénéfiques du fait de son contenu en antioxydants. Des études ont en effet démontré que le vin en petite quantité, protège les membranes biologiques de l'attaque des radicaux libres (Caen,1992) et inhibe l'oxydation des L.D.L. catalysée par le cuivre (Frankel et al., 1993).

Notre étude porte en partie sur cette activité antioxydante du vin et plus particulièrement sur les composants du vin qui permettent une telle action.

V. COMPOSITION DU VIN

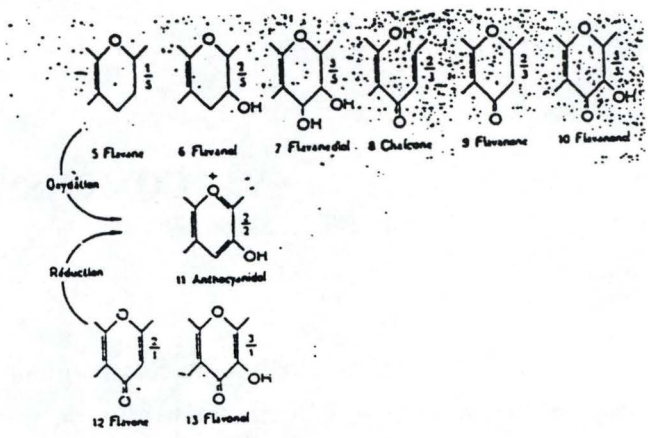
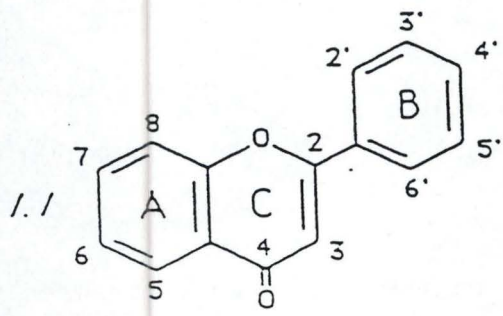
Le vin est un liquide relativement complexe : en plus de son contenu en eau, en alcool et en sucres, il se caractérise par de nombreux constituants dont certains sont surtout présents dans la peau et les pépins de raisins : ce sont les composés phénoliques. Ceux-ci se présentent sous forme de tannins solubles (ils donnent par hydrolyse de l'acide gallique et un ose) ou sous forme de tannins condensés, assemblage de plusieurs molécules fondamentales (Michaud et Masquelier, 1973). Ces derniers sont particulièrement nombreux et diversifiés dans le vin : on y trouve notamment des flavonoïdes appartenant à différentes familles :

- des flavones (ex : lutéoline, diosmétine, chryisine)
- des isoflavones
- des flavonones
- des flavonoles (ex : quercétine, galangine, quercétagine, kaempférol)
- des dihydroflavonoles (ex : taxifoline, fustine)

ainsi que de nombreuses substances qui leur sont apparentées comme les :

- | | | |
|-----------------|---|------------------------------|
| Flavanoïdes | - | flavanol (catéchine) |
| | - | flavannediol (leucocyanidol) |
| | - | flavanone (eriodictyne) |
| Anthocyanidines | - | delPHinidine chloride |
| | - | cyanidine chloride |
| Chalcones | - | butéine |

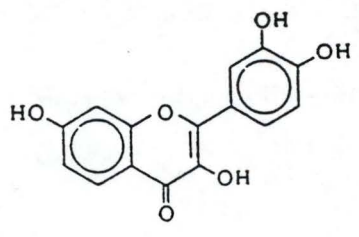
leuchanthocyanines et fractions oligomères procyanidoliques.



1a flavone

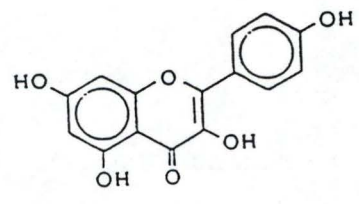
les dérivés flavanes et les dérivés flavones.

Fisetin



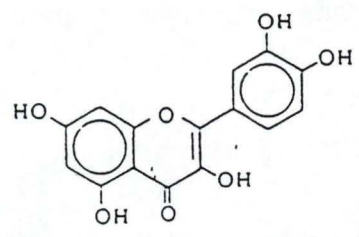
Flavonol

Kaempferol



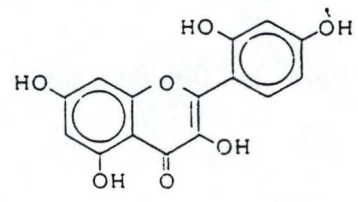
Flavonol

Quercetin



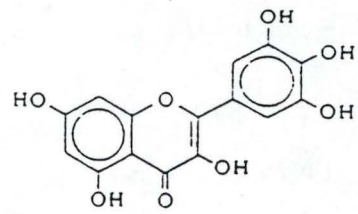
Flavonol

Morin



Flavonol

Myricetin



Flavonol

les dérivés hydroxylés

V.1. LES FLAVONOÏDES (GENERALITES)

Les Flavonoïdes sont des composés naturels d'origine végétale dérivés de la flavone. Ils constituent un des plus grands groupes de dérivés phénols naturels. On en a identifié jusqu'à présent près de 4.000. Dans la plante, ils se retrouvent aussi bien au niveau de la feuille, de l'écorce que de la graine. L'animal ne peut synthétiser ces composés. Tous les flavonoïdes retrouvés chez ce dernier ont une origine végétale.

V.2. PROPRIETES GENERALES

Beaucoup d'entre eux possèdent des vertus gustatives (ils communiquent aux vins une saveur astringente caractéristique).

Ils présentent des activités pharmacologiques diverses : des activités anti-inflammatoires, anti-allergiques, anti-virales, anti-tumorales, inhibitrices d'enzymes (phosphodiesterases, mitochondrie succinate oxydase mitochondriale... (Hodnick and al., 1986).

On les retrouve notamment dans certaines herbes de la médecine orientale (Yuting and al., 1990). Certains flavonoïdes sont fortement antioxydants (ex: la rutine, la quercétine la morine...) et/ou "scavengers" de radicaux libres (ex: la rutine, la naringine, la quercétine...). D'autres encore sont chélateurs d'ions métalliques (ex: la quercétine) ou peuvent montrer des activités prooxydantes (ex: la myricétine), (Miranda and al., 1989).

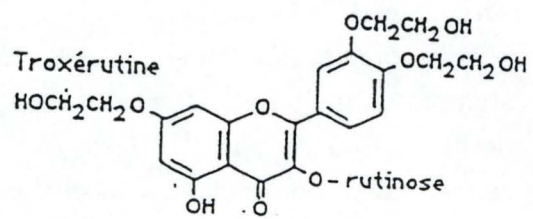
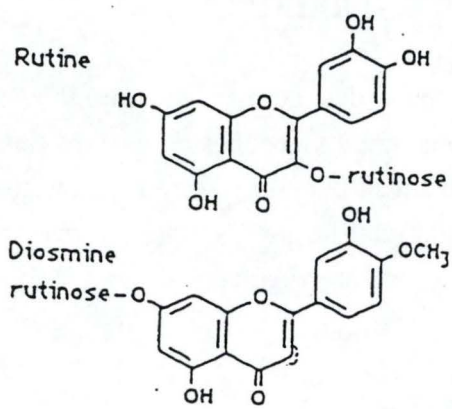
La plupart d'entre eux possèdent des propriétés "tannantes" (Michaud et Masquelier, 1973): ils forment des tannins condensés résultant de la condensation de plusieurs molécules élémentaires. Chacune de ces molécules est constituée d'un noyau fondamental (le 2-Phényl benzo-pyrone) sur lequel viennent se greffer des groupements hydroxyles.

V.3. STRUCTURE FONDAMENTALE

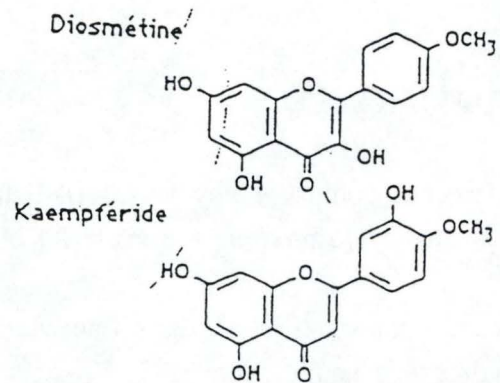
Le noyau fondamental comporte 3 cycles dont 1 hétérocycle oxygéné (cycle pyrone ou cycle C) et 2 autres cycles: un cycle benzène (ou cycle A) et un cycle phényl (ou cycle b).

Chacun de ces 3 cycles intervient dans l'activité générale de la molécule. Les flavonoïdes sont souvent hydroxylés en position 3, 5, 7, 3', 4' et 5'. Selon la position des groupements hydroxyles, on obtient des composés de comportements chimiques différents.

Le C(4) du cycle C existe soit sous la forme méthylène (CH₂) et donne les flavanes, flavanols et flavanones soit sous la forme carbonyle (C=O) et donne les flavones, flavonols et flavonones. Ces derniers constituent le groupe que l'on désigne plus généralement sous le nom de flavonoïdes.



les dérivés glycosylés



les dérivés méthoxy

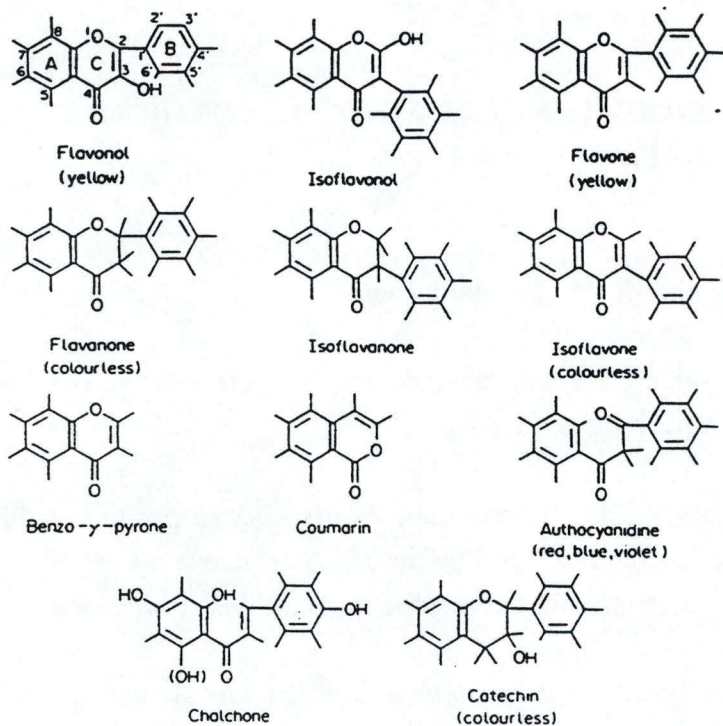
V.4. LES PRINCIPALES CLASSES DE FLAVONOÏDES ET LEURS COMPOSES APPARENTES

On peut diviser les flavonoïdes en:

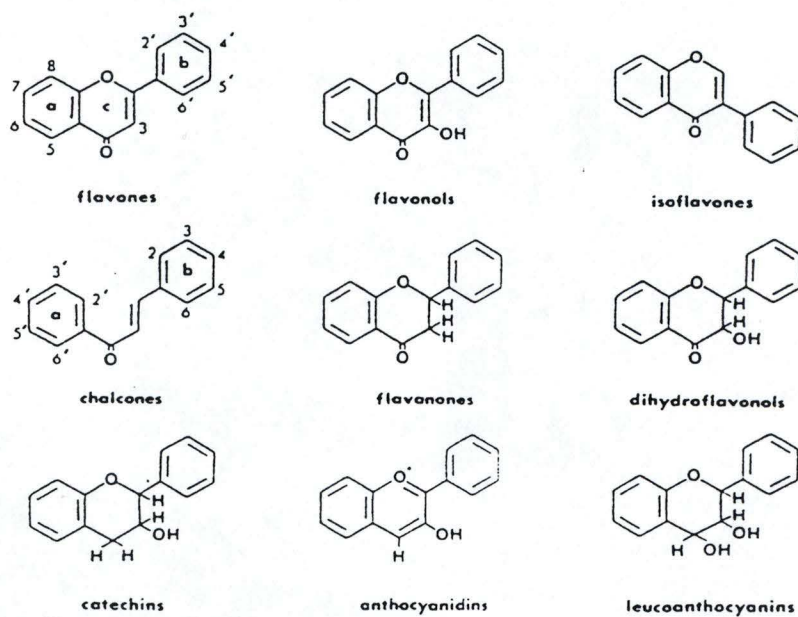
- dérivés hydroxylés (présence de groupements OH). ex. la fisétine, le kaempférol, la quercétine, la morine, la myricétine
- dérivés glycosylés (le lien glycosylique est localisé en position 3 ou 7 et les sucres sont généralement le L-rhamnose, le D-glucose, le galactose ou encore le rutinose).
ex. la rutine, la diosmine, la troxérutine qui sont des rutinosides
- dérivés méthoxy (présence de groupements-OCH₃) ex. le kaempféride, la diosmétine.

On trouve également les isoflavonoïdes (selon que le cycle phénolique est attaché au noyau pyrone en c(3) pour les isoflavonoïdes ou en c(2) pour les flavonoïdes.

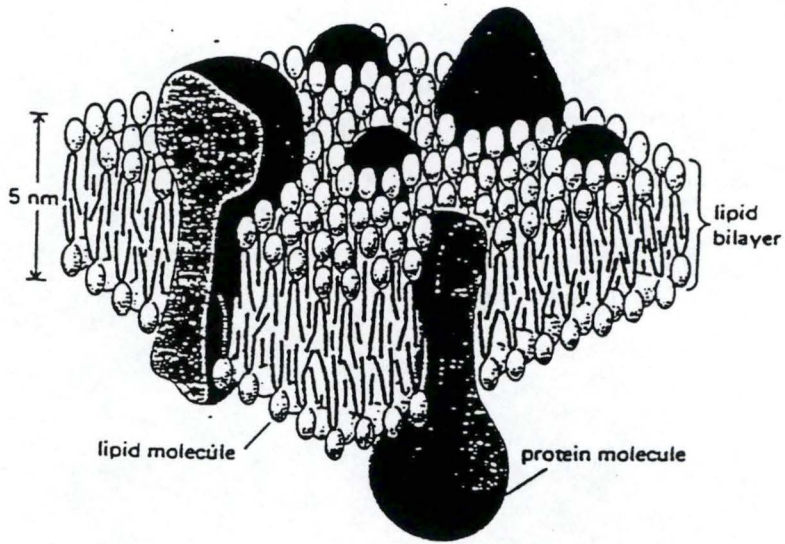
Certains composés sont étroitement associés aux flavonoïdes de par leurs propriétés biologiques, ex: les anthocyanidines (qui présentent un cycle C ouvert); les tannins catéchiques (le cycle C étant un flavanal) et les leucoanthocyanines.



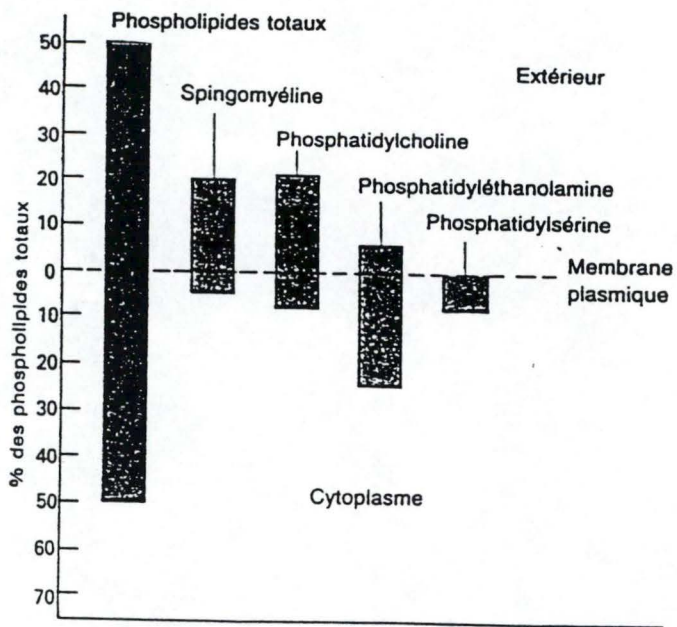
les isoflavonoïdes et les flavonoïdes



les principales classes de flavonoïdes et leurs composés apparentés.



Structure tridimensionnelle d'une membrane biologique (Alberts et al., 1989)



Distribution des phospholipides sur les deux faces de la membrane érythrocytaire. Les valeurs sont exprimées en pourcentages des lipides membranaires totaux. À noter que chaque face contient 50% des phospholipides totaux. [Voir J.E. Rothman et J. Lenard, 1977, *Science* 195:743].

VI. LES MEMBRANES BIOLOGIQUES.

La membrane lysosomale et la membrane plasmique des G.R. sont les 2 principales membranes sur lesquelles reposent nos études; comme toute membrane, elles sont constituées d'une bicouche lipidique au sein de laquelle s'insèrent diverses protéines.

VI.1. LA MEMBRANE LYSOSOMALE

On y retrouve les principaux phospholipides (sphingomyélines, phosphatidylcholines, phosphatidylinositols, phosphatidyléthanolamines,...), des glycolipides en quantité modérée (plus précisément des glycosphingolipides) et du cholestérol.

Les protéines en général fortement glycosylées (Schneider et al., 1978) sont, pour la plupart, des protéines intégrales dont la partie oligosaccharidique tapisse l'intérieur de l'organite. L'abondance en acide sialique au niveau de la portion terminale de la chaîne oligosaccharidique assure au lysosome une charge de surface négative. Cela permettrait un hypothétique rôle de protection des liaisons chimiques de la membrane contre les hydrolases lysosomales. Les protéines de cette membrane sont impliquées dans le maintien du PH intralysosomal et dans le transfert des métabolites.

VI.2. LA MEMBRANE PLASMIQUE ERYTHROCYTAIRE

Elle est constituée de \pm 50 % de lipides dont les principaux sont la phosphatidylcholine, la phosphatidyléthanolamine, la phosphatidylsérine (50 % des lipides de la membrane).

La sphingomyéline représente 18 % des phospholipides et le cholestérol 23 %.

Des protéines sont également présentes (glycophorine, protéine de la bande 3...)

Les oligosaccharides se trouvent essentiellement à la face externe, liés aux protéines et aux lipides formant le glycocalyx.

VI.3. SYSTEMES LESANT LES MEMBRANES

Dans notre travail, nous avons recherché l'action du vin "in vitro" sur l'effet lésant des membranes produit par certains systèmes.

VI.3.1. Système générateur de radicaux libres oxygénés.

Un radical libre consiste, par définition, en une espèce chimique capable de mener une existence indépendante, contenant un ou plusieurs électron(s) non apparié(s) et étant, dès lors, très réactionnelle (Halliwell and Gutteridge, 1985).

Les dérivés toxiques de l'oxygène sont produits à partir de la réduction monovalente de l' O_2 . Ces molécules sont l'anion superoxyde ($O_2^{\circ-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (OH°).

Ils sont impliqués dans un grand nombre de pathologies, de maladies cardiovasculaires dégénératives comme le cancer, de maladies inflammatoires.

Ils peuvent être formés en de nombreux sites subcellulaires comme le réticulum endoplasmique (cytoch. p-450), les mitochondries (ubiquinones et flavoprotéines), membrane plasmique (NADPH oxidase), le cytoplasme (xanthine oxidase, aldéhyde oxidase) (Fisher, 1988).

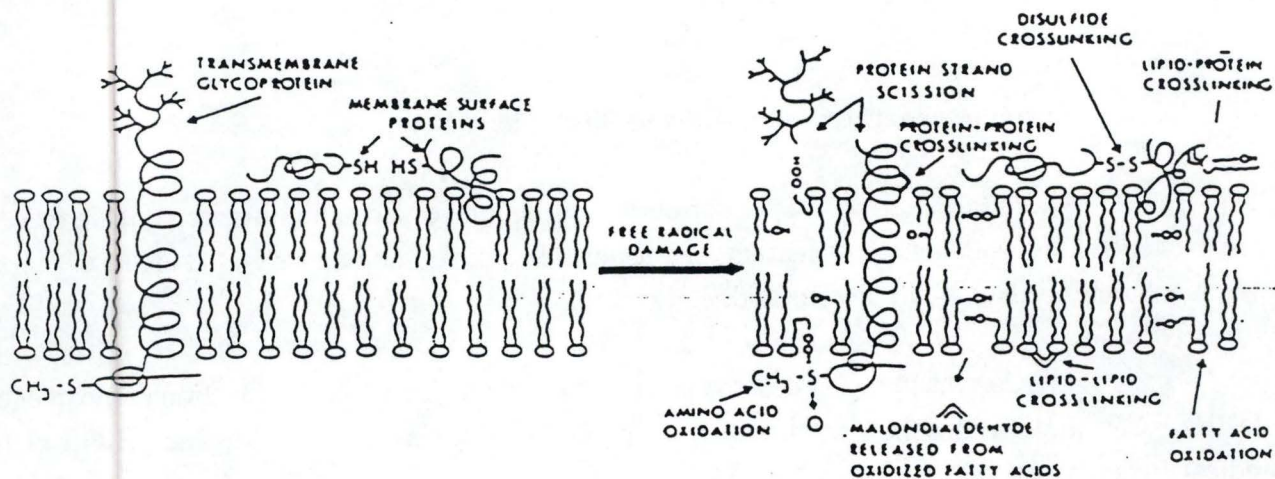
Les $O_2^{\circ-}$ sont peu réactionnels, ils sont toutefois plus redoutables lorsqu'ils se dismutent en H_2O_2 .

Contrairement aux $O_2^{\circ-}$, H_2O_2 est capable de traverser les membranes et d'agir ainsi bien loin du site de formation, sa toxicité est accrue suite à sa capacité de produire en présence de Fe^{2+} , des OH° via la réaction de Fenton. Ceux-ci sont très réactionnels. Ils agissent immédiatement à leur endroit de production cellulaire avec toute sorte de molécules organiques (Pryon, 1976).

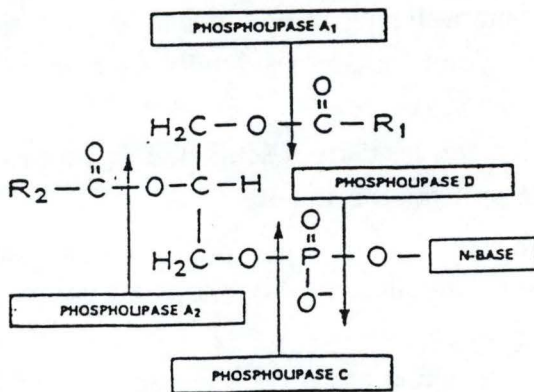
Normalement, les dérivés actifs de l' O_2 formés intracellulairement sont neutralisés par les mécanismes de protection cellulaire.

Il existe essentiellement 2 types de mécanisme :

- des moyens de protection primaires qui empêchent la propagation des radicaux libres via des systèmes enzymatiques (catalase, SOD, glutathion peroxidase) ou via l'action de molécules de faible P.M. (α -tocoPHérol, vit. C, ascorbate).
- des moyens de protection secondaire qui réparent les dégâts causés (lipases, protéases, polymérase).



Conséquences des attaques radicalaires sur les divers constituants des membranes biologiques.
(Freeman and Crapo, 1982)



Sites de l'activité hydrolytique des phospholipases sur un substrat phospholipidique.

L'action des dérivés nocifs de l'O₂ ne s'observe que lors d'un déséquilibre entre la génération de ceux-ci et les mécanismes de protection.

Nous avons choisi de tester leur action sur les membranes biologiques. En effet, ces membranes riches en acides gras polyinsaturés et en protéines constituent une cible de choix pour les radicaux.

- attaque radicalaire sur les lipides :

Ces dérivés toxiques provoquent la peroxidation lipidique : il s'agit d'une cascade de réaction oxydative en chaîne conduisant à la désorganisation de la membrane.

- attaque radicalaire sur les protéines :

les protéines membranaires peuvent subir de profondes modifications suite à l'attaque radicalaire. Cela dépendra de la composition en a.a. de la protéine (les a.a. comprenant des groupements SH sensibles aux radicaux libres et des résidus insaturés), du rôle des a.a., de l'activité et de la conformation de la protéine.

Les dégâts causés par ces radicaux libres dépendront surtout de l'intensité de l'attaque radicalaire et de la possibilité de réparation de la cellule.

VI.3.2. Système enzymatique : la phospholipase C.

Nous avons soumis la membrane lysosomale et la membrane plasmique des G.R. à l'action de la phospholipase C.

L'enzyme agit essentiellement au niveau de certains phospholipides membranaires.

Sur la phosphatidylcholine, la phospholipase C attaque la liaison ester en position 3 du phospholipide donnant naissance à un 1,2-diacylglycérol et phosphorylcholine.

VI.3.3. Estimation de l'efficacité du système lésant

Pour estimer l'effet des systèmes sur la membrane lysosomale, nous avons mesuré l'activité libre d'un de ses enzymes, la N-acétylglucosaminidase.

Cette notion s'explique de par le phénomène de latence enzymatique : la présence d'une membrane intacte empêche normalement tout contact enzyme-substrat, alors qu'une détérioration de celle-ci permet ce contact, l'activité de l'enzyme augmente.

L'activité libre donne ainsi la proportion d'enzymes accessibles à leurs substrats, elle fournit par conséquent de précieux renseignements sur l'intégrité de la membrane de l'organite.

La proportion d'organites endommagés au sein d'une fraction s'estime par l'activité libre de cette fraction.

Pour la membrane des globules rouges, nous avons déterminé le degré d'hémolyse.

MATERIELS ET METHODES

I. FRACTIONNEMENT SUBCELLULAIRE

I.1. PREPARATION DE L'HOMOGENAT.

Nous avons utilisé les rats Wistar d'un poids moyen de 250 gr. Ceux-ci ont été mis à jeun la veille de l'expérience. L'animal est tué, le foie est prélevé, pesé, découpé en morceaux et broyé à l'aide d'un homogénéiseur coaxial de Potter.

Le milieu d'homogénéisation est la saccharose 0,25 M isotonique glacé. On homogénéise 3 fois. L'homogénat obtenu (dilution 1/10) contient tous les constituants subcellulaires.

I.2. CENTRIFUGATION DIFFERENTIELLE.

1.2.1. Principe

Cette technique permet de séparer les différents organites principalement d'après leur taille.

L'homogénat est soumis à des champs centrifuges croissants suivant le schéma de fractionnement, décrit par de Duve et al. (1955). Il est représenté sur la figure suivante. Celui-ci permet l'obtention de 5 fractions, chacune enrichie en organites spécifiques.

La fraction N contient essentiellement des noyaux, des débris cellulaires, des cellules intactes ayant résisté à l'homogénéisation ainsi que des vésicules dérivées de la membrane plasmique.

La fraction M, appelée fraction mitochondriale lourde, est enrichie en mitochondries mais contient également une certaine quantité de lysosomes et peroxysomes.

La fraction L, appelée fraction mitochondriale légère, est plus particulièrement riche en lysosomes et peroxysomes (contient encore des mitochondries).

La fraction P, appelée fraction microsomiale, renferme essentiellement des fragments du réticulum endoplasmique de la membrane plasmique et de l'appareil de golgi.

La fraction S, appelée fraction soluble, contient tous les éléments non sédimentés lors des étapes précédentes.

Nos expériences sont réalisées sur des fractions L.

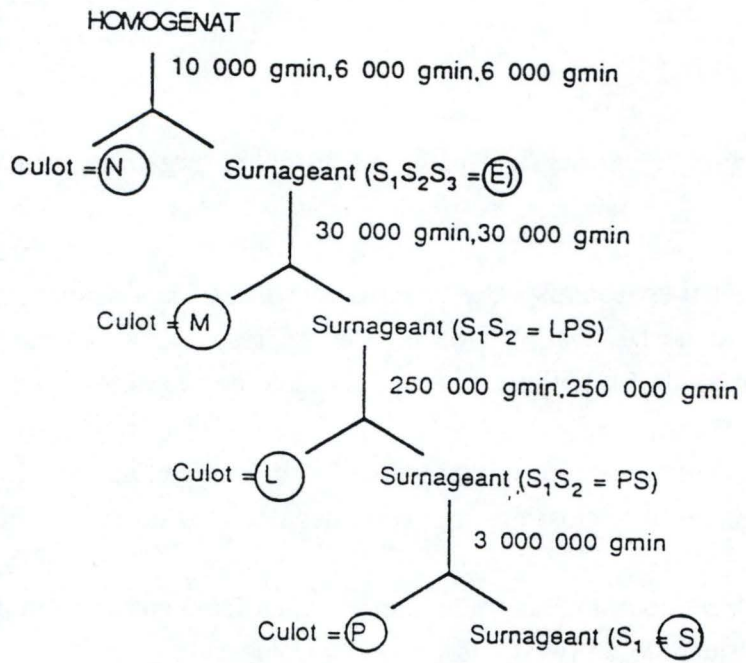


Schéma de fractionnement du foie en centrifugation différentielle d'après de Duve et. al. (1955).

I.2.2. Préparation de la fraction L

L'homogénat est centrifugé à 12.500 rpm pendant 3 minutes 2 secondes (2 fois).

Le culot contient la fraction NM. Le surnageant obtenu, est centrifugé à 25.000 rpm pendant 6 minutes 42 secondes (2 fois).

Le culot contient la fraction L, qui est homogénéisée 5 fois au petit Potter. Elle est portée à une dilution de 1/2 (500 mg de tissu dans 1 ml de saccharose).

Remarque : Nous avons utilisé le centrifugeuse Beckman et le rotor conique de type 40.

II. EXPERIENCES SUR LES MEMBRANES SUBCELLULAIRES

II.1. PRINCIPE EXPERIMENTAL

Une fraction L est incubée pendant des temps déterminés, soit en présence d'un système générateur de radicaux libres, soit en présence d'un système enzymatique utilisant la phospholipase C. Ces conditions expérimentales sont lésantes pour les organites (lysosomes, mitochondries, peroxyosomes).

Outre le système lésant, les tests renferment un des vins ou un des composés phénoliques à une certaine concentration.

Les contrôles sont réalisés par ajout d'eau (pour les vins) ou par ajout de DMSO (pour les composés phénoliques) de même concentration.

L'état des lysosomes est estimé en mesurant l'activité libre de la N-acétylglucosaminidase (N-agase).

L'état des peroxyosomes est estimé en mesurant l'activité libre de la catalase.

L'état des mitochondries est estimé en mesurant, d'une part, l'activité libre de la sulfite cytochrome C réductase (membrane externe) et, d'autre part, l'activité libre de la malate déshydrogénase (membrane interne).

Ces activités sont exprimées en % de l'activité totale de l'enzyme obtenue par lyse des organites sous l'effet d'un détergent (triton X - 100).

II.2. SUBSTANCES TESTEES : VINS ET COMPOSES PHENOLIQUES

Les vins sont neutralisés avec du Na OH et conservés en chambre froide. Ils sont dilués dans l'H₂O le jour de l'expérience.

Les composés phénoliques sont conservés sous forme de poudre et dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) le jour de l'expérience.

Le travail se réalise ainsi sur des préparations L fraîches du jour.

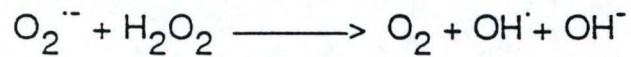
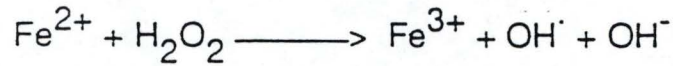
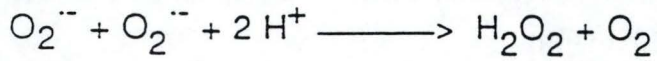
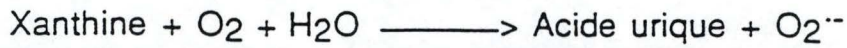
II.2.1. Les vins

- le vin n° 1 (vin rouge Juliéna Beaujolais)
- le vin n° 2 (vin rouge Mercurey)
- le vin n° 3 (vin rouge Bordeaux supérieur)
- le vin n° 4 (vin rouge Côte de Provence)
- le vin n° 5 (vin blanc de Bourgogne)
- le vin n° 6 (vin rouge roumain)
- le vin n° 7 (vin rosé)
- le vin n° 8 (vin blanc Sauvignon)
- le vin n° 9 (vin rouge Bordeaux supérieur)

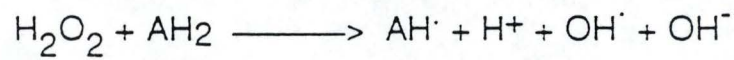
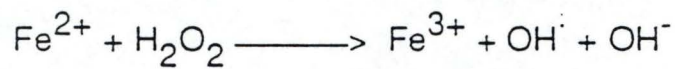
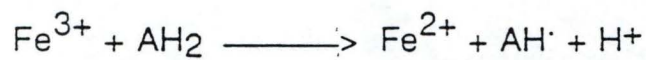
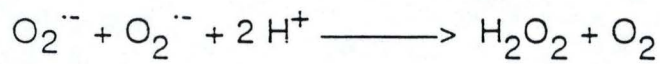
II.2.2. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques testés dans nos expériences lysosomales sont :

- la quercétine (ou 3, 5, 7, 3', 4' - pentahydroxyflavone)
- la catéchine (ou 3, 5, 7, 3', 4' - pentahydroxyflavane)
- l'endotélon (oligomères procyanidoliques)
- le resvératrol (ou 3, 4', 5 - trihydroxystilbène)



Production de OH[·] à partir du système XIXO Fe/ADP.



Production de OH[·] à partir du système acide ascorbique/FeCl₂.

II.3. EFFETS DES RADICAUX LIBRES

II.3.1. Production radicalaire enzymatique : X/XO - Fe/ADP

II.3.1.1. Principe théorique

La xanthine oxydase est responsable de la formation d' $O_2^{\circ-}$ par transformation de la xanthine en acide urique en présence d' O_2 et d' H_2O .

Les H_2O_2 (formés suite à la dismutation de $O_2^{\circ-}$) en présence de $O_2^{\circ-}$ et de Fe^{2+} (complexé à l'ADP pour éviter la formation de $Fe(OH)_3$ précipitable) permettent la formation de OH° suite à la réaction de Fenton.

II.3.1.2. Protocole expérimental

Une fraction L (dilution 20) est incubée à 37° C pendant un temps déterminé dans une solution composée de :

- tampon TRIS-HCL 10 mM PH 8
- saccharose 0,25 M
- vins adéquatement dilués dans de l'eau ou composés phénoliques adéquatement dilués dans du DMSO (tests) soit H_2O pour les vins ou DMSO pour les composés phénoliques (témoin ou contrôle).
- xanthine 250 μ M.
- $Fe Cl_3$ 0,2 mM/ADP 2 mM.
- xanthine oxydase 16 mu / 1 ml.

II.3.2 Production radicalaire chimique acide ascorbique / Fe Cl₂

II.3.2.1. Principe théorique

L'acide ascorbique peut, dans certaines circonstances, produire des radicaux libres. L'oxydation de l'acide ascorbique favorise la formation de OH° par la réduction du Fe³⁺ en Fe²⁺. Il y a donc :

- formation de O₂^{o-} lors de l'oxydation du Fe²⁺ en Fe³⁺
- dismutation de O₂^{o-} en H₂O₂
- production de OH° par la réaction de Fenton

L'acide ascorbique permet donc la réduction du Fe³⁺ en Fe²⁺.

II.3.2.2. Protocole expérimental

Une fraction L (dilution 20) est incubée pendant un temps déterminé dans une solution composée de:

- tampon TRIS-HCL 10 mM PH 8
- saccharose 0,25 M
- vins adéquatement dilués dans de l'eau (tests) soit H₂O (témoin ou contrôle).
- Fe Cl₂ 10μM
- acide ascorbique 0,2 mM.

II.4. SYSTEME ENZYMATIQUE : LA PHOSPHOLIPASE C.

II.4.1. Principe théorique

La phospholipase C est une enzyme agissant sur les phospholipides membranaires. L'enzyme coupe la liaison ester en position 3 du phospholipide, libérant le groupement alcool - phosphate du diacylglycérol. Cela se traduit par une perte de la latence enzymatique.

II.4.2. Protocole expérimental

Une fraction L (dilution 20) est incubée pendant 20 minutes dans une solution composée de:

- tampon TRIS-HCL 50 mM PH 7,4
- saccharose 0,25 M
- Ca Cl₂ 5 mM
- vins adéquatement dilués dans de l'eau ou composés phénoliques adéquatement dilués dans du DMSO (tests) soit H₂O pour les vins ou DMSO pour les composés phénoliques (témoin ou contrôle).
- phospholipase C (0,025 u/ml).

III. EXPERIENCES D'HEMOLYSE SUR G.R. HUMAINS

III.1. OBTENTION DES G.R. HUMAINS

Le sang humain (décrassé) nous est fourni par la Croix Rouge de Namur sous emballage de perfusion. Celui-ci, prélevé stérilement, est centrifugé à ± 1.000 rpm. Le milieu de centrifugation est le Na Cl glacé 9 %. Après la centrifugation, le surnageant est éliminé. Le culot est lavé par recentrifugation à ± 1.000 rpm. Le sang ainsi obtenu est porté à une dilution 40 (dans le saccharose 0,25 M).

III.2. SYSTEME LESANT LA MEMBRANE DES G.R. : LA PHOSPHOLIPASE C

III.2.1. Principe expérimental

Les G.R. sont incubés pendant 40 minutes en présence d'un système lésant enzymatique utilisant la phospholipase C.

Outre le système lésant, les tests renferment le vin, préalablement dilué dans l'eau, ou les composés phénoliques, préalablement dissous dans du DMSO.

Les contrôles et témoins sont réalisés par ajout d'eau pour les vins ou de DMSO pour les composés phénoliques, de même concentration.

L'état des G.R. est estimé en mesurant la quantité d'hémoglobine libérée. Cette quantité d'hémoglobine est exprimée en % de la quantité d'hémoglobine totale libérée obtenue par lyse des G.R. sous l'effet d'un détergent (triton X - 100 à 10 %).

III.2.2. Protocole expérimental

Le sang (dilution 1/160) est incubé à 37° C pendant 40 minutes dans une solution composée de :

- tampon TRIS-HCL 50 mM PH 7,4
- saccharose 0,25 M
- Ca Cl₂ 5 mM
- vins adéquatement dilués dans de l'eau ou composés phénoliques adéquatement dilués dans du DMSO (tests) soit H₂O pour les vins ou DMSO pour les composés phénoliques (témoin ou contrôle).
- phospholipase C (0,025 u/2ml).

IV. LES DOSAGES

IV.1. DOSAGES ENZYMATIQUES

IV.1.1. Dosage de la N - acétylglucosaminidase [(N - agase) (lysosomes)]

La N - agase est un enzyme marqueur des lysosomes.

L'enzyme est mis en présence, pendant 10 minutes, dans un milieu contenant du:

- P-nitrophényl-N-acétyl-β D glucosaminide 4 mM
- tampon citrate-Na OH 0,1 M PH 5
- saccharose 0,25 M
- triton X-100 0,1 % (lecture de l'activité totale).

La réaction enzyme - substrat est arrêtée au moyen de TCA 2,75 %. Après centrifugation, le surnageant recueilli est ajouté au révélateur (tampon glycine carbonate, 0,15 M PH 10 et Na OH 0,5 M). L'absorbance est mesurée à 400 nm par colorimétrie du PNO₂ en milieu alcalin.

IV.1.2. Dosage de la Catalase (peroxysomes)

La catalase est un enzyme de référence des peroxysomes. Elle constitue un des mécanismes de protection cellulaire contre les radicaux libres, neutralisant l'H₂O₂.



L'activité de l'enzyme est très élevée, c'est pourquoi on la mesure à 0° C.

L'enzyme est mis en présence d'un milieu contenant :

- du tampon imidazol 20 mM PH 7
- de l'albumine bovine 1 mg / ml
- du saccharose 0,25 M
- de l'H₂O₂) 1,263 mM.

La réaction enzyme-substrat est arrêtée au moyen d'oxysulfate de titane (TiOSO₄) qui colore spécifiquement l'H₂O₂ en jaune. L'absorbance est mesurée à 420 nm par colorimétrie.

IV.1.3. Dosage de la Sulfite cytochrome C réductase (mitochondries)

La sulfite cytochrome C réductase est localisée dans l'espace intermembranaire mitochondrial. L'activité libre de cet enzyme peut nous renseigner sur l'intégrité de la membrane mitochondriale externe.

L'enzyme est mis en présence d'un milieu contenant du :

- tampon TRIS-HCL 0,1 M PH 8,5
- saccharose 0,25 M
- K CN $4 * 10^{-4}$ M
- Cytochrome C 0,05 mM (lecture du blanc)
- sulfite 0,3 mM (lecture de l'activité libre)
- triton X-100 0,2 % (lecture de l'activité totale).

La réduction du cytochrome C est mesurée par une augmentation de l'absorbance à 550 nm.

IV.1.4. Dosage de la Malate déshydrogénase (mitochondries)

La malate déshydrogénase est localisée dans la matrice mitochondriale (également dans le cytoplasme). L'activité libre de cet enzyme peut nous renseigner sur l'intégrité de la membrane mitochondriale interne.

L'enzyme est mis en présence d'un milieu contenant du :

- tampon TRIS-HCL 25 mM PH 7,4
- saccharose 0,25 M
- oxaloacétate 0,25 mM (lecture du blanc)
- NADH 0,15 mM (lecture de l'activité libre)
- triton X-100 0,1 % (lecture de l'activité totale)

L'oxydation du NADH en NAD⁺ est mesurée par une diminution de l'absorbance à 340 nm

IV.1.5. Dosage de la Xanthine oxydase

La xanthine oxydase transforme la xanthine en acide urique, utilisant l'O₂.



L'enzyme (16 mu/3ml) est incubé dans un milieu contenant du :

- tampon TRIS-HCL 0,1 M PH 8,1
- substance adéquatement diluée (vin) ou H₂O (contrôle)
- xanthine 60 μ .

La production d'acide urique est mesurée par une augmentation de l'absorbance à 292 nm.

IV.1.6. Dosage de la Phospholipase C

La phospholipase C agit sur la phosphatidylcholine (lécithine), libérant la phosphocholine et le 1,2-diacylglycérol.

L'enzyme (25 mu) est incubé à 37° C pendant 20 minutes sous agitation dans un milieu contenant du :

- TRIS-HCL 53 mM PH 7,3
- CaCl₂ 6,66 mM
- phosphatidylcholine 2,67 mM
- phosphatase alcaline $5 * 10^{-4}$ u

La réaction est arrêtée par addition de SDS 10,31 %.

La mesure du phosphate est réalisée par addition d'acide ascorbique 10 % et de molybdate d'ammonium 0,42 %. L'absorbance est mesurée à 650 nm par colorimétrie de l'acide phosphomolybdeux.

Un résumé des conditions expérimentales utilisées pour les dosages enzymatiques ainsi que les références bibliographiques décrivant ces méthodes de façon détaillée se trouve ci-contre.

IV.2. DOSAGE DES COMPOSES PHENOLIQUES DES VINS ET COURBE D'ETALONNAGE DE LA QUERCETINE

Le vin est porté à une concentration initiale de 5 %.

La quercétine est portée à une concentration initiale de 10^{-3} M.

A partir de ces concentrations initiales, différentes dilutions sont réalisées et mises en présence de TCA 6 %.

Après une centrifugation de \pm 5 minutes à la Janetzski, le contenu en phénols du surnageant recueilli est déterminé par le réactif de Folin à 588 nm.

RESUME DES CONDITIONS EXPERIMENTALES UTILISEES POUR LES DOSAGES ENZYMATIQUES

ENZYME	SUBSTRAT	CONC.	Ph	MESURE	REFERENCES
N-acétylglucosaminidase	P-nitrophényl-N-acétyl- BD glucosaminide	4 mM	5	Colorimétrie du PNO ₂ (400 nm)	Vaes, 1966
Catalase	Substrat SC	1,263 mM	7	Colorimétrie de l'H ₂ O ₂ (420 nm)	Baudhuin et Coll, 1964
Sulfite cytochrome C réductase	Cytochrome C Sulfite	0,05 mM 0,3 mM	8,5	Réduction du cytochrome C (550 nm)	S. Wattiaux – Deconinck et R. Wattiaux
Malate déshydrogénase	Oxaloacétate NADH	0,25 mM 0,15 mM	7,4	Oxydation du NADH en NAD ⁺ (340 nm)	
Xanthine oxydase	Xanthine	60 UM	8,1	Production d'acide urique (292 nm)	Della Corte et Stirpe, 1972
Phospholipase C	Phosphatidylcoline (lécithine ou dimyristoyl)	2,67 mM	7,3	Colorimétrie de l'acide phosphomolybdeux	Oshaka, A. and Sugahara, T. 1968 J. Biochem. Tokyo, 64, 335-345

PRESENTATION DES RESULTATS

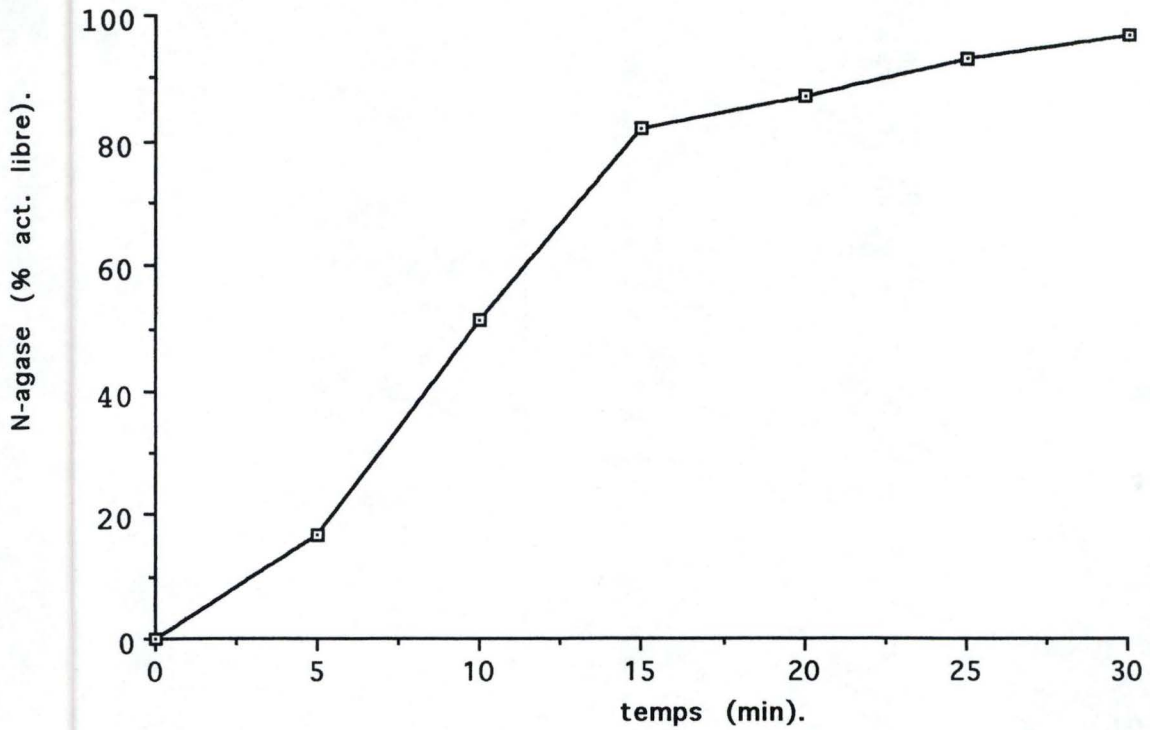


Fig 1: Effet du système X-XO / Fe-ADP sur la membrane lysosomale en fonction du temps. Une fraction L est incubée en présence du système X-XO / Fe-ADP suivant la méthode décrite dans le chapitre 2.

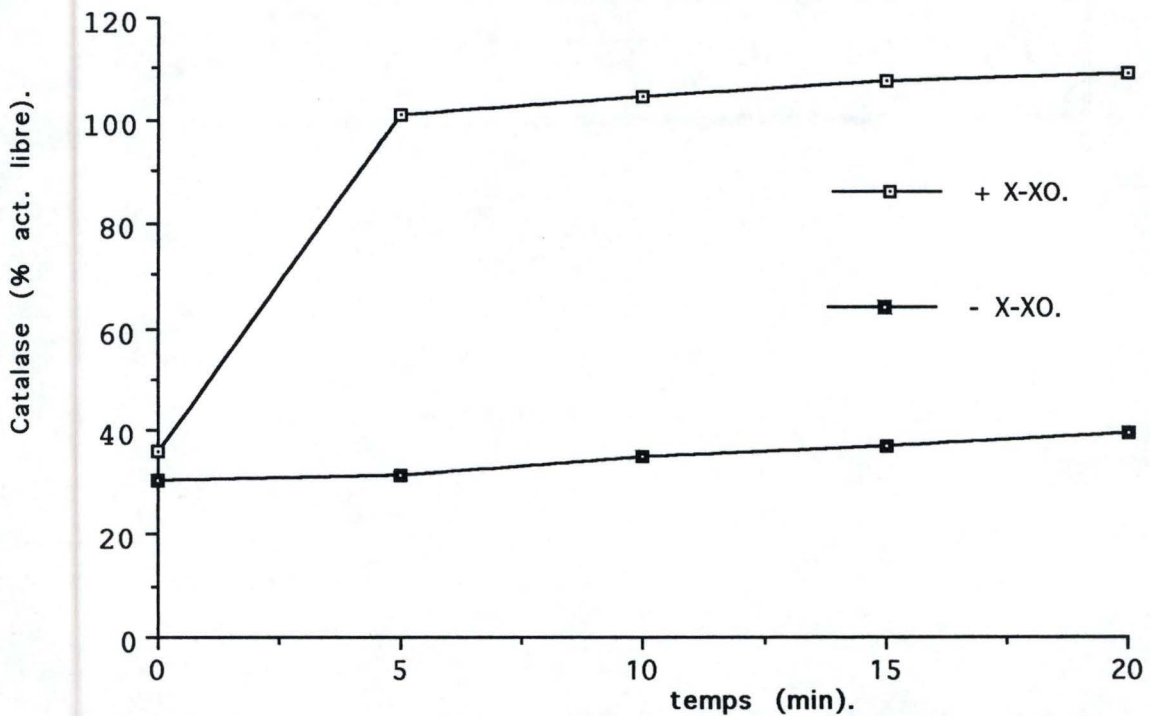


Fig 2: Effet du système X-XO / Fe-ADP et effet de la température sur la membrane peroxysomale en fonction du temps. Une fraction L est incubée en présence du système X-XO / Fe-ADP suivant la méthode décrite dans le chapitre 2.

C H A P I T R E I.

INFLUENCE DU VIN SUR LES MEMBRANES SUBCELLULAIRES SOUMISES A L'ACTION DES RADICAUX LIBRES

I.1. EFFET DU SYSTEME RADICALAIRE ENZYMATIQUE X-XO / Fe-ADP

Nous avons soumis différentes structures subcellulaires à un système producteur de radicaux libres, constitué de xanthine oxydase et de xanthine. Les altérations de la membrane des organites ont été mises en évidence par la mesure d'enzymes latents, présents dans ces structures.

Les résultats obtenus sont présentés aux figures 1-4. On peut constater que tant les lysosomes que les peroxysomes et les mitochondries sont sensibles au stress oxydatif.

En effet, les activités libres de la N-agase (lysosomes), de la catalase (peroxysomes), de la sulfite cytochrome C réductase (espace intermembranaire des mitochondries) et de la malate déshydrogénase (matrice mitochondriale) augmentent très fortement au cours d'une incubation en présence du système X-XO / Fe-ADP.

Les membranes entourant ces organites ont donc leurs perméabilités fortement altérées sous l'influence des radicaux libres oxygénés.

I.1.1. Effet du vin sur les organites mis en présence du système X-XO / FeADP

I.1.1.1. *Vin rouge*

Des expériences semblables à celles décrites ci-dessus ont été réalisées en ajoutant des concentrations croissantes de vin rouge (Bordeaux supérieur) au milieu d'incubation. Comme le montrent les figures 5-8, le vin rouge protège d'une façon très efficace les membranes lysosomales, peroxysomales et mitochondriales de l'effet lésant dû au système générateur de radicaux libres.

Certaines différences sont toutefois observables entre les structures subcellulaires étudiées; la protection la plus efficace semble être apportée aux lysosomes, en effet, l'action des radicaux libres est pratiquement totalement neutralisée lorsque l'incubation a lieu en présence de vin à 0,5 %.

A l'autre extrême se place la membrane mitochondriale interne dont une protection marquée est obtenue à une concentration en vin de 0,2 % sans que rien ne change pour des concentrations plus élevées en vin rouge.

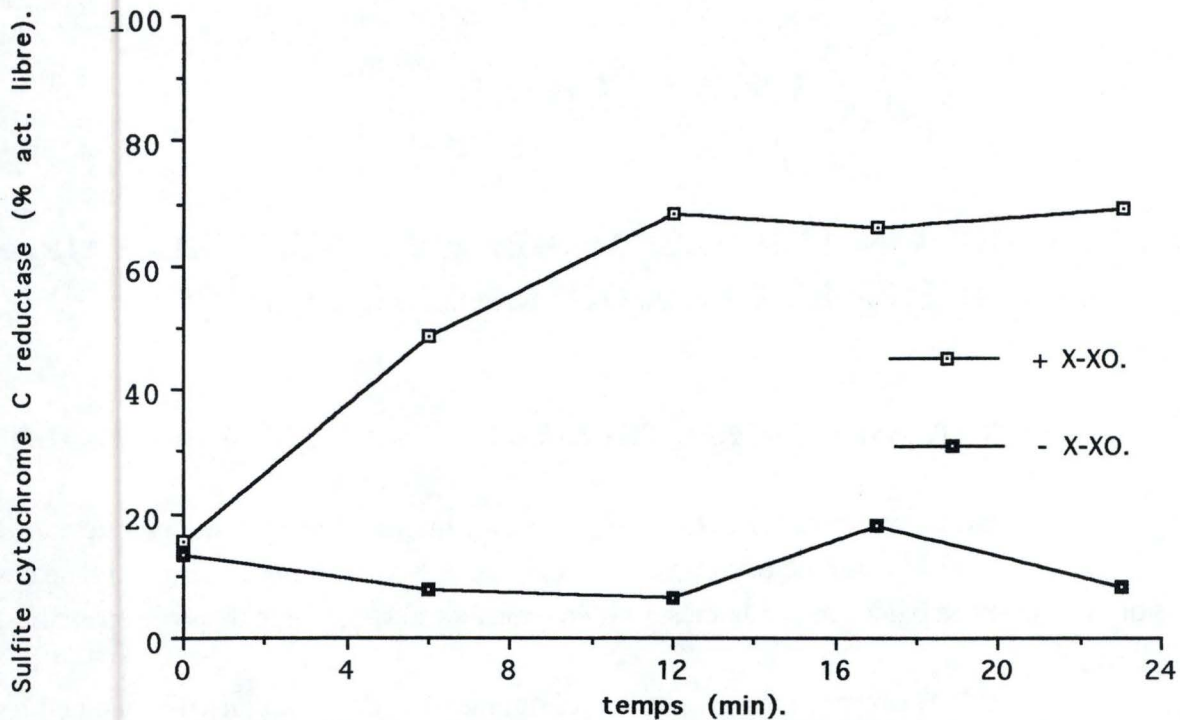


Fig 3: Effet du système X-XO / Fe-ADP et effet de la température sur la membrane mitochondriale externe en fonction du temps. Une fraction L est incubée en présence du système X-XO / Fe-ADP suivant la méthode décrite dans le chapitre 2.

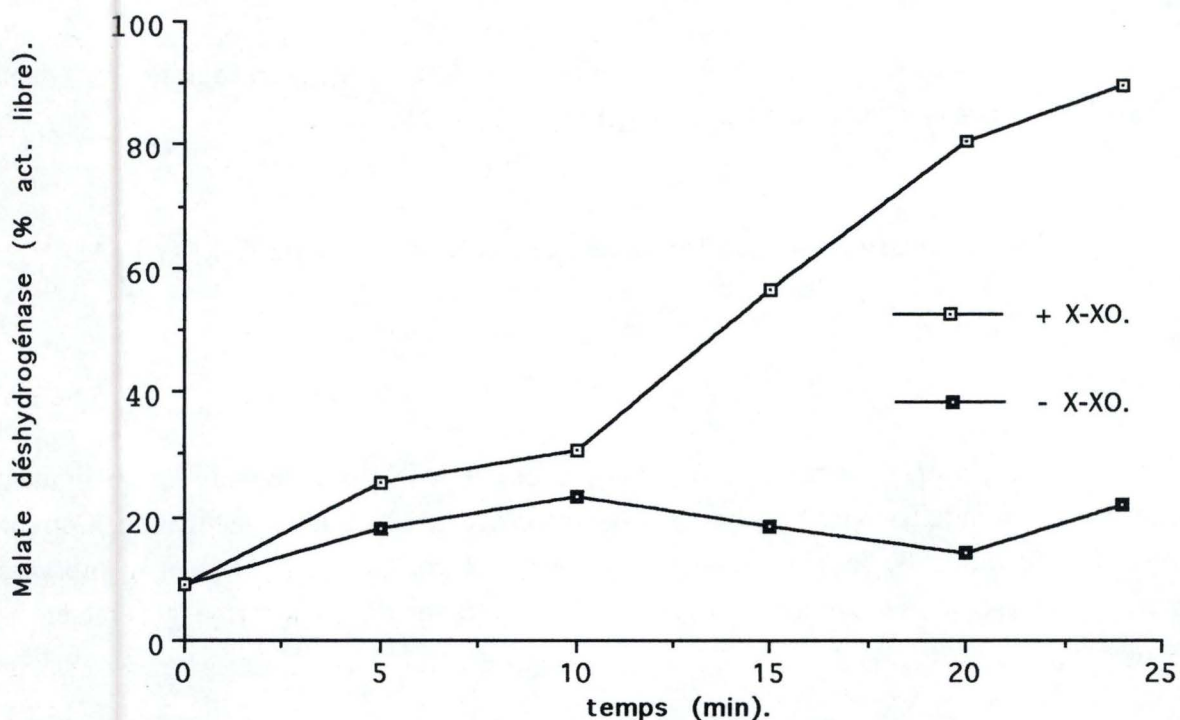


Fig 4: Effet du système X-XO / Fe-ADP et effet de la température sur la membrane mitochondriale interne en fonction du temps. Une fraction L est incubée en présence du système X-XO / Fe-ADP suivant la méthode décrite dans le chapitre 2.

I.1.1.2. Vin blanc

Comme l'illustre les figures 9-11, le vin blanc est totalement inefficace, même à des concentrations de 2 %, pour protéger les membranes peroxysomales et mitochondriales de l'action des radicaux libres.

Le vin blanc a un effet protecteur sur la membrane lysosomale mais à des concentrations beaucoup plus élevées que les concentrations efficaces en vin rouge.

I.2. EFFET DU SYSTEME RADICALAIRE CHIMIQUE ACIDE ASCORBIQUE / Fe Cl₂

Des expériences en nombre plus limité, concernant uniquement les lysosomes, ont été réalisées avec un système chimique générateur de radicaux libres oxygénés; acide ascorbique-Fe Cl₂.

La figure 12 montre bien que la membrane lysosomale est perméabilisée lorsque les lysosomes sont incubés en présence du système acide ascorbique / Fe Cl₂. En effet, l'activité libre de la N-agase augmente très nettement au cours du temps d'incubation.

Le vin rouge (figure 13) exerce un effet protecteur sur la membrane lysosomale comparable à l'action que l'on observe lors de l'utilisation du système enzymatique.

I.3. EFFET DE L'ETHANOL

Un constituant majeur du vin est l'éthanol. Il est par conséquent possible que les effets que nous venons de décrire proviennent de ce composé.

La figure 14 illustre comment évolue l'activité libre de la N-agase lorsque des lysosomes sont incubés en présence du système X-XO / Fe ADP ou du système acide ascorbique / Fe Cl₂; l'éthanol étant ajouté en concentrations croissantes dans le milieu d'incubation. Il est à noter que les concentrations d'éthanol utilisées correspondent à celles qui doivent être associées aux concentrations de vins utilisées dans les expériences précédentes (en supposant un contenu en éthanol du vin de 10 %).

Le système membranaire utilisé est celui des lysosomes.

L'éthanol ne modifie absolument pas l'augmentation d'activité libre résultant de l'incubation des lysosomes en présence des systèmes enzymatiques ou chimiques, producteurs de radicaux libres.

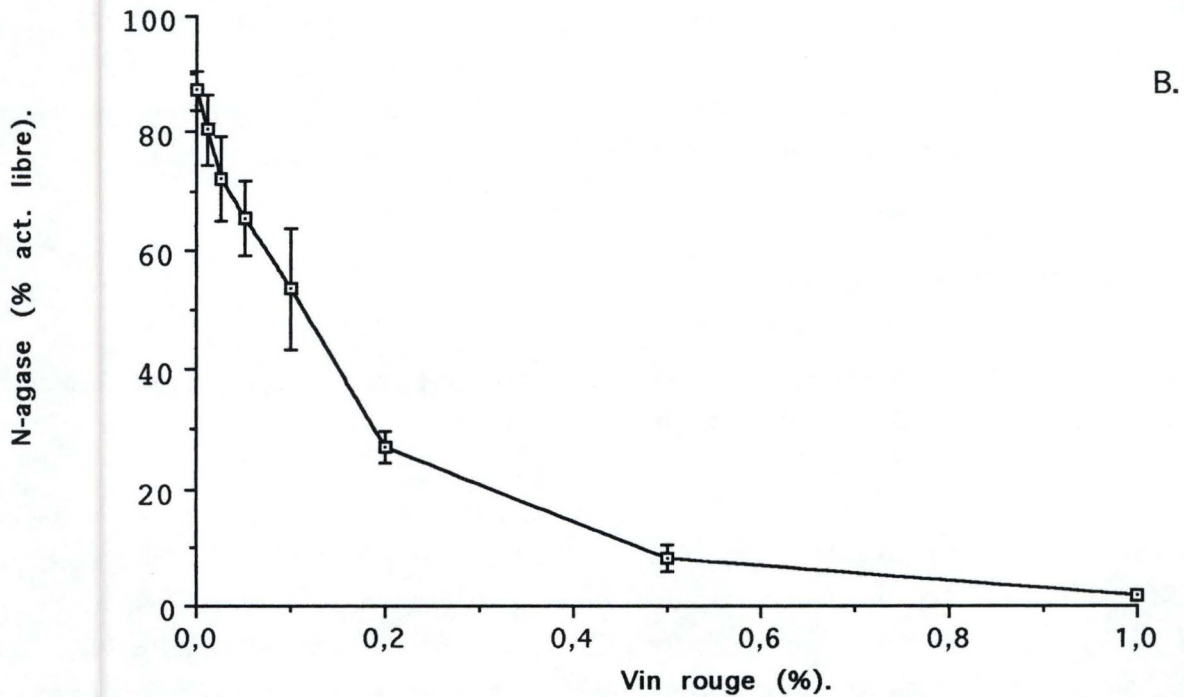
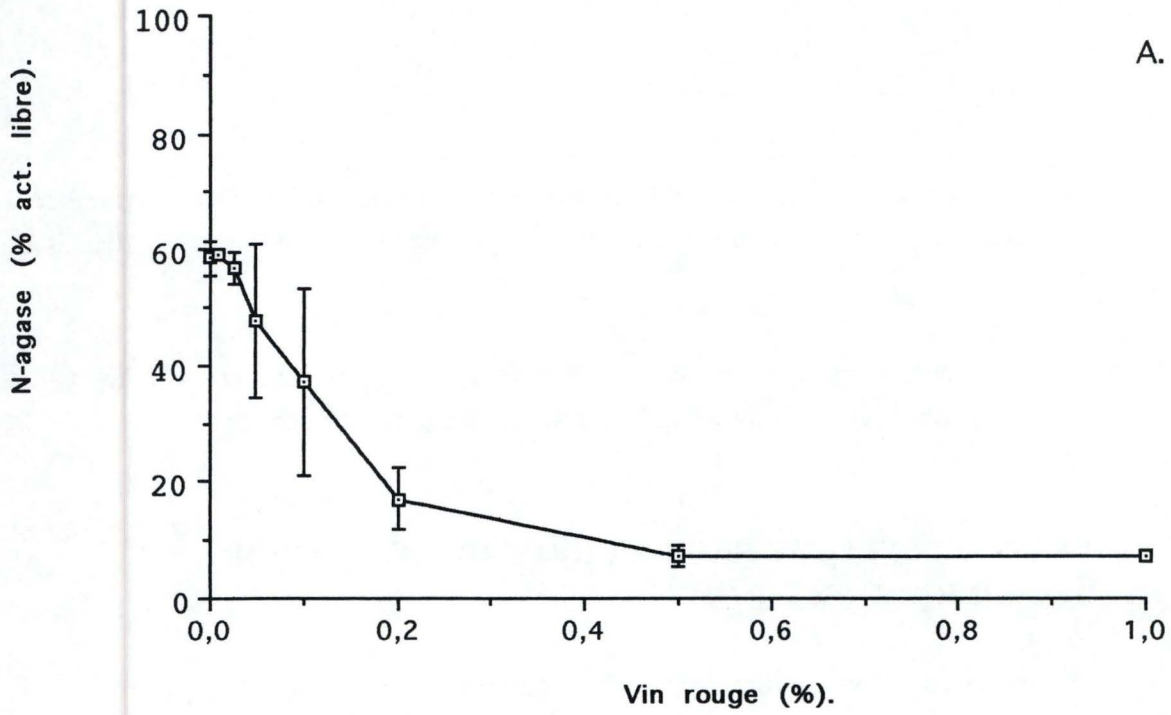


Fig 5: Effet du système X-XO / Fe - ADP sur la membrane lysosomale pendant 10 min (A) et 20 min (B) en présence de vin rouge.

Valeur moyenne(n=3) accompagnée de son écart-type.

I.4. EFFET DU VIN ROUGE SUR L'ACTIVITE DE LA XANTHINE OXYDASE

L'inhibition par le vin rouge de l'altération des structures subcellulaires causée par le système X-XO pourrait évidemment être due à une simple inactivation de l'enzyme par le vin.

La figure 15 montre qu'il n'en pas pas ainsi. Elle rapporte les résultats de mesures de l'activité enzymatique de la xanthine oxydase réalisées en déterminant l'acide urique produit au cours de la réaction. Il est clair que la xanthine oxydase n'est pas inhibée par le vin rouge dans la gamme des concentrations utilisées dans les expériences décrites dans ce chapitre.

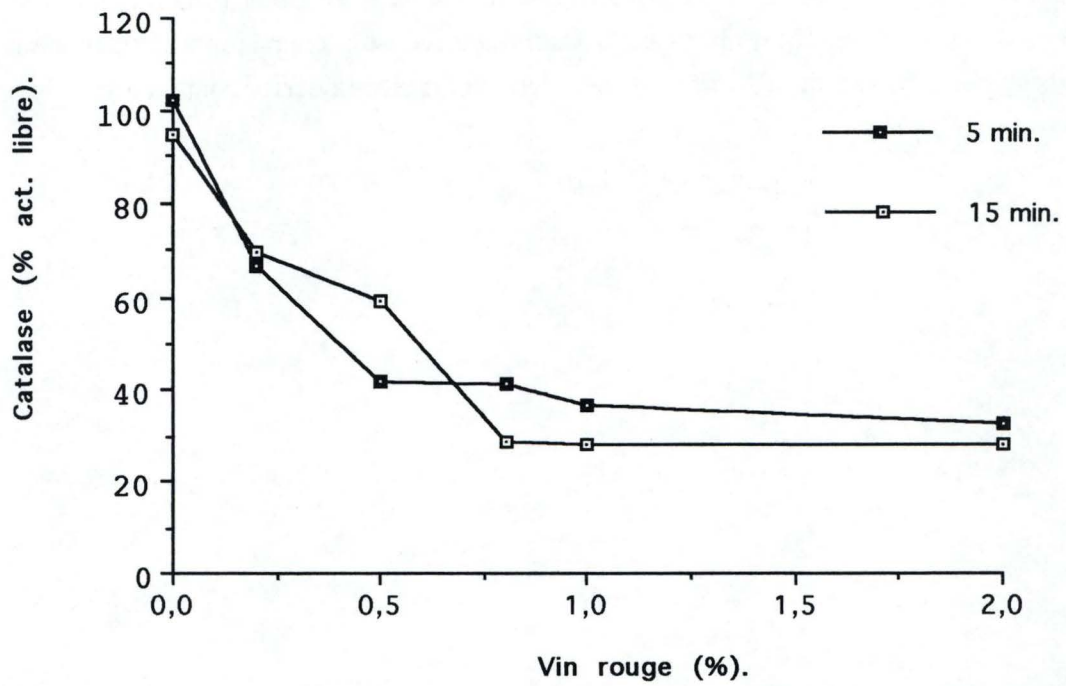


Fig 6: Effet du système X-XO / Fe-ADP sur la membrane peroxysomale en présence de vin rouge.

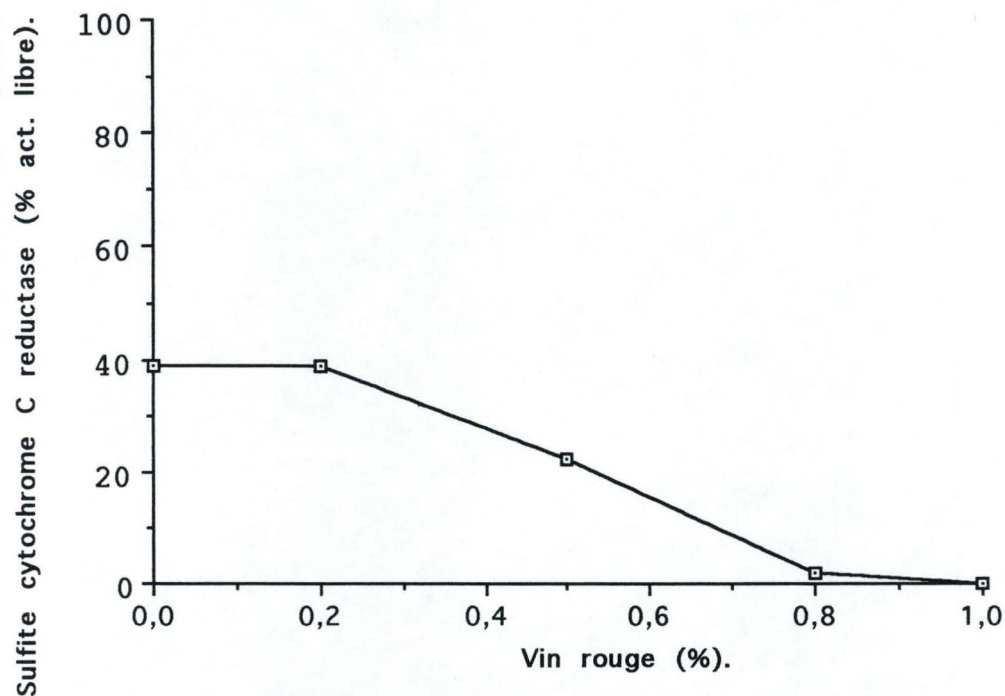


Fig 7: Effet du système X-XO / Fe-ADP sur la membrane mitochondriale externe pendant 5 min en présence de vin rouge.

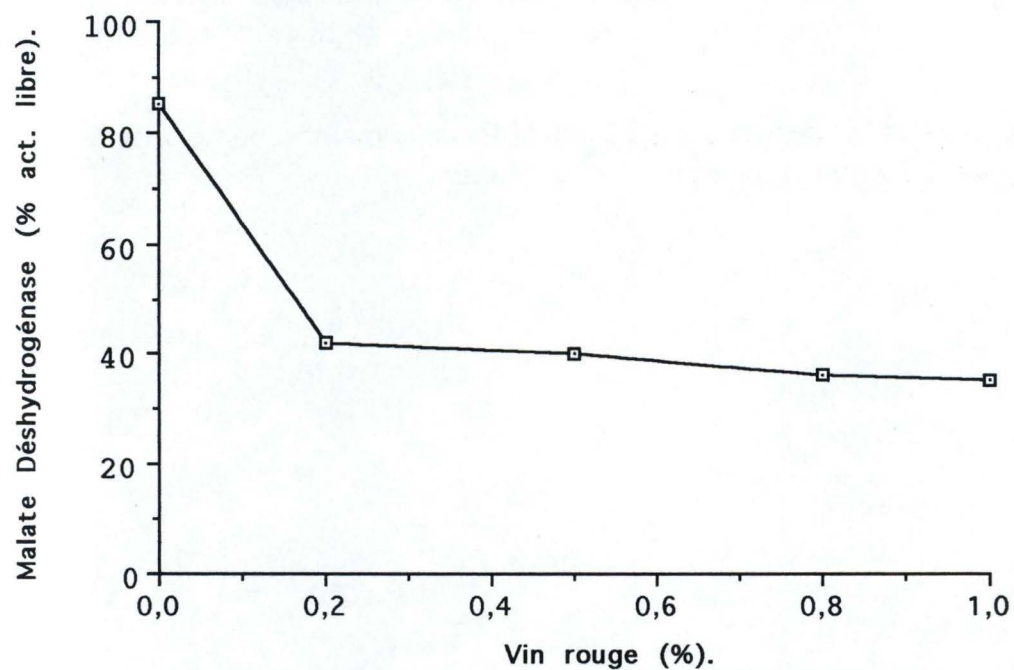


Fig 8: Effet du système X-XO / Fe-ADP sur la membrane mitochondriale interne pendant 20 min en présence de vin rouge.

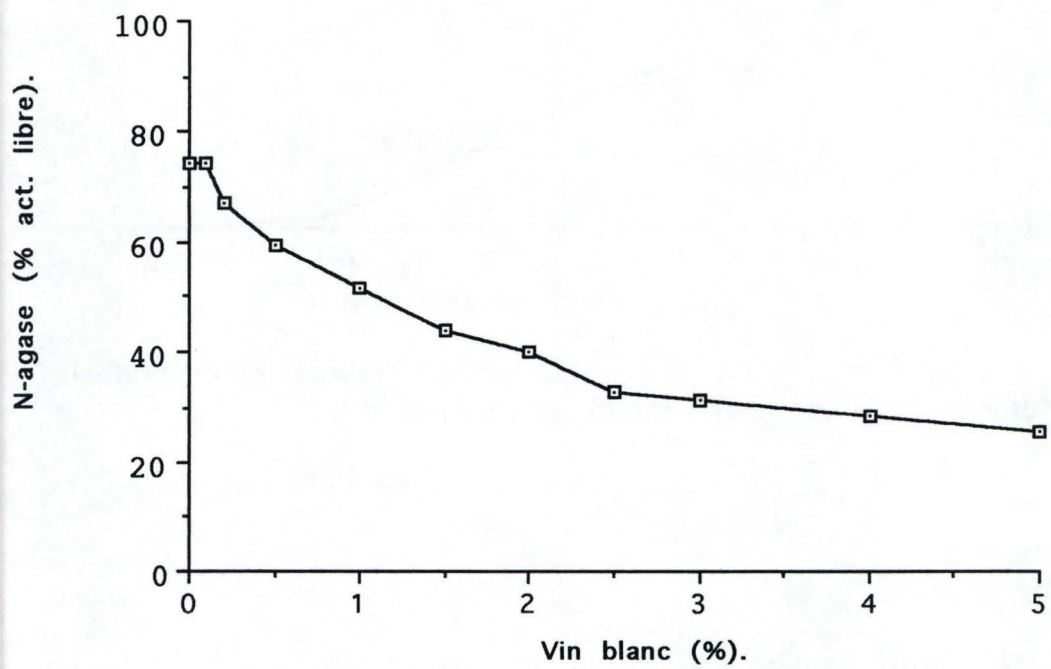


Fig 9: Effet du système X-XO / Fe-ADP sur la membrane lysosomale pendant 20 min en présence de vin blanc.

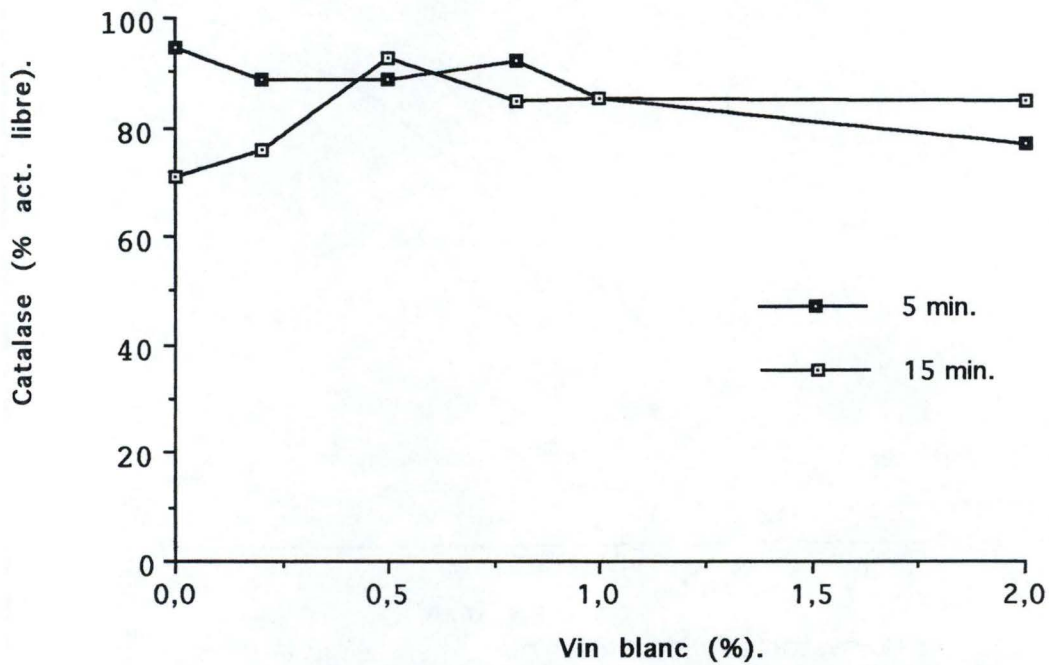


Fig 10: Effet du système X-XO / Fe-ADP sur la membrane peroxysomale en présence de vin blanc.

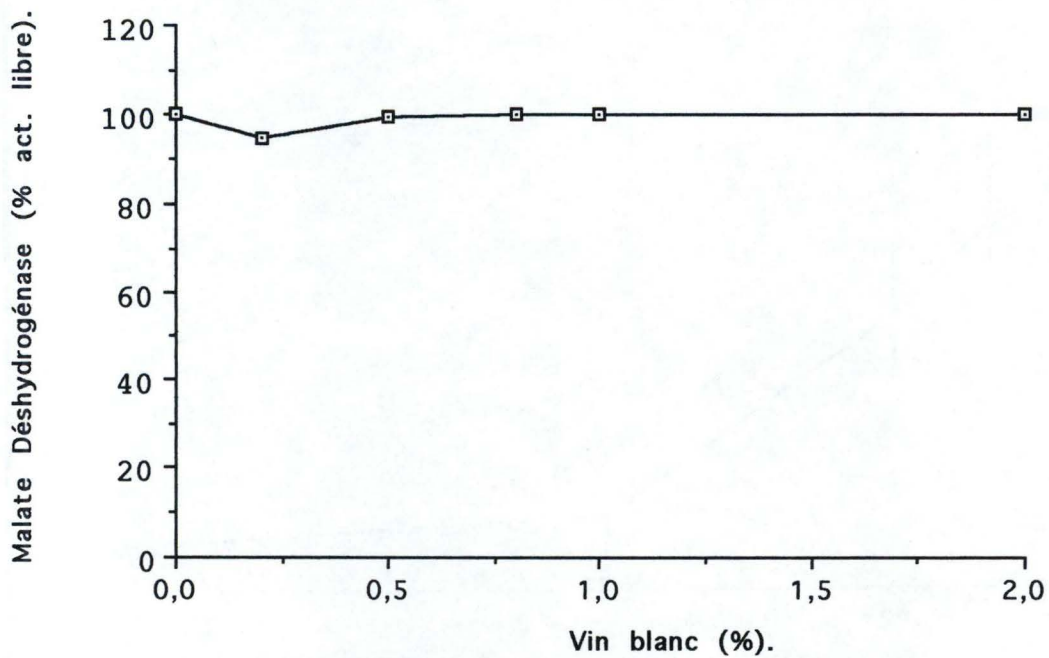


Fig 11: Effet du système X-XO / Fe-ADP sur la membrane mitochondriale interne pendant 20 min en présence de vin blanc.

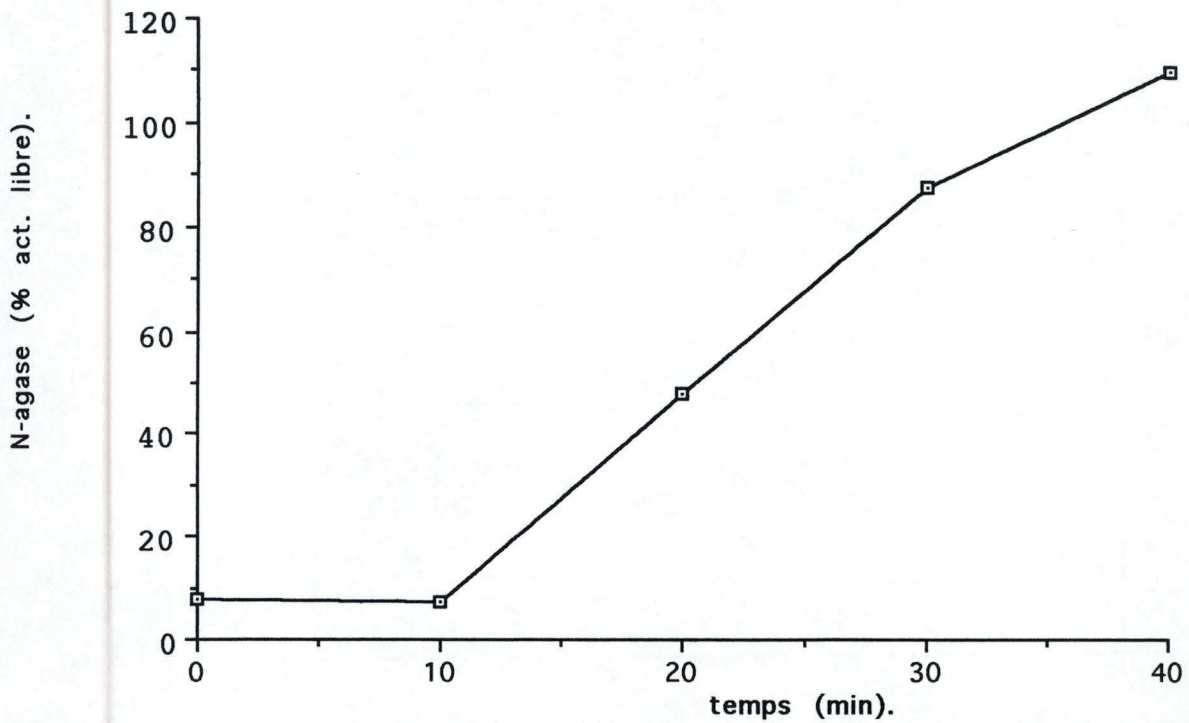


Fig 12: Effet du système Acide ascorbique / Fe Cl₂ sur la membrane lysosomale en fonction du temps. Une fraction L est incubée en présence du système Acide ascorbique / Fe Cl₂ suivant la méthode décrite dans le chapitre 2.

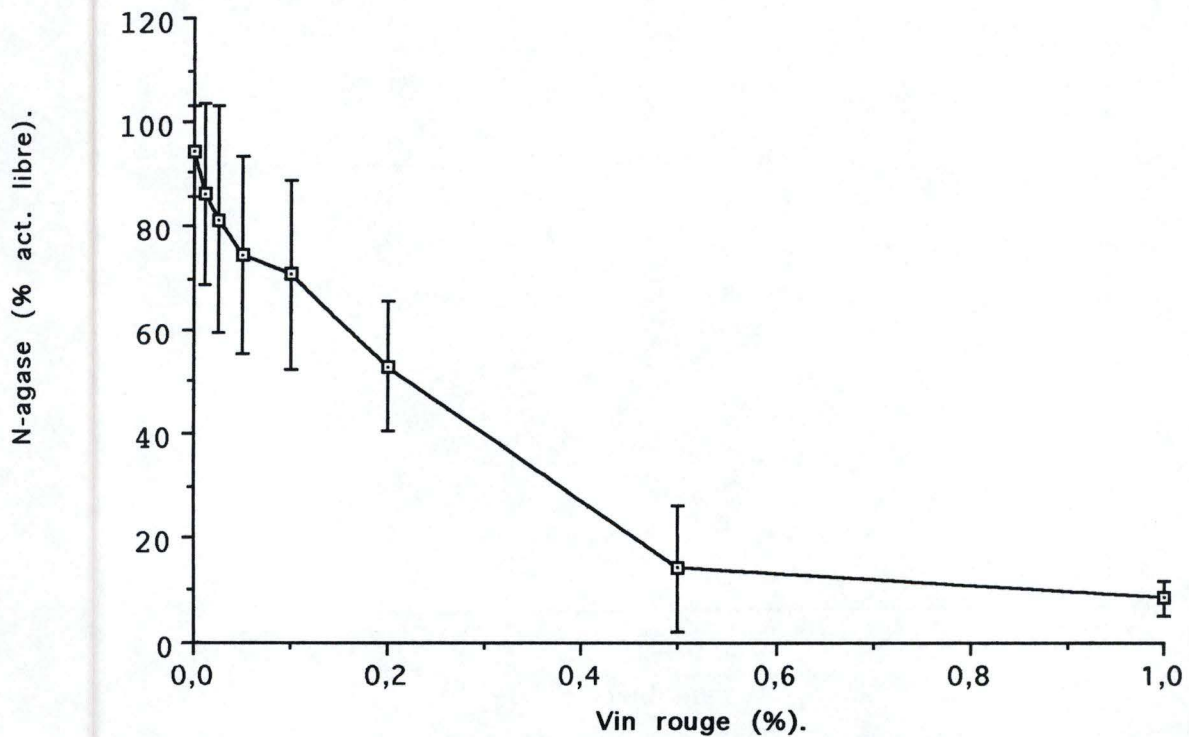


Fig 13: Effet du système Acide ascorbique / Fe Cl₂ sur la membrane lysosomale pendant 30 min en présence de vin rouge.

Valeur moyenne (n=3) accompagnée de son écart-type.

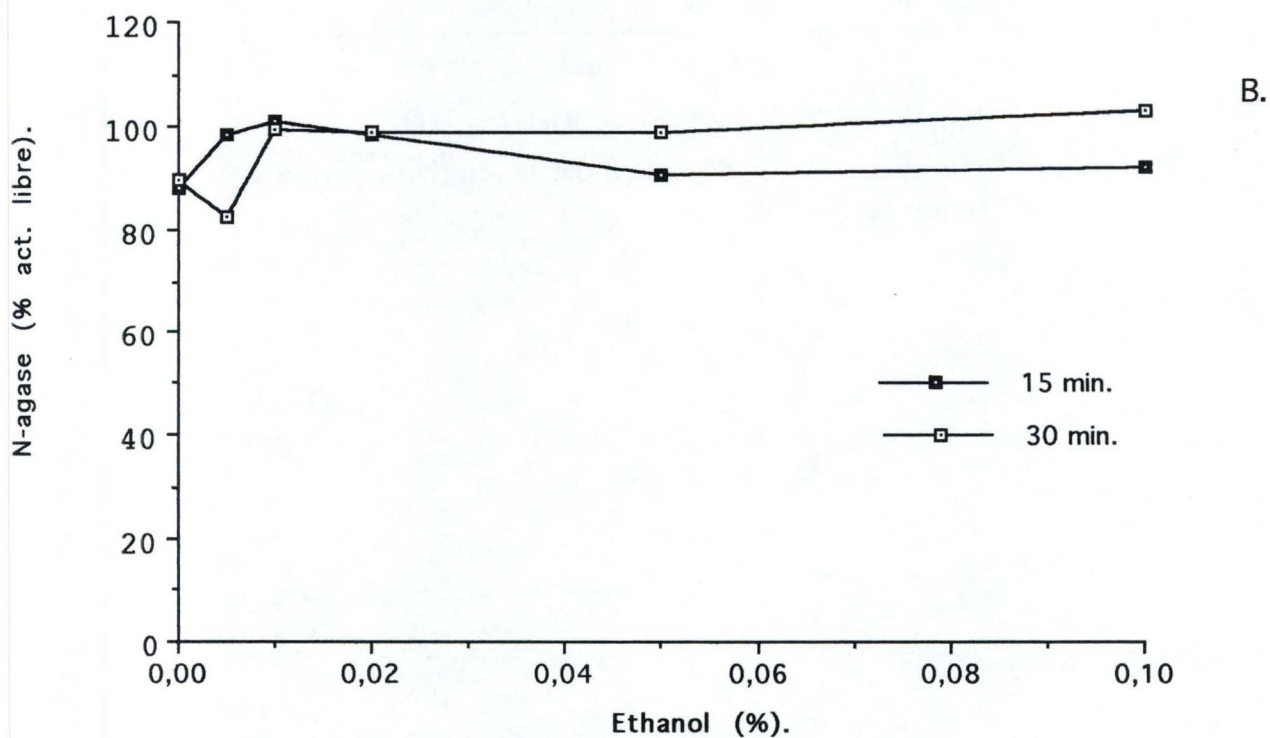
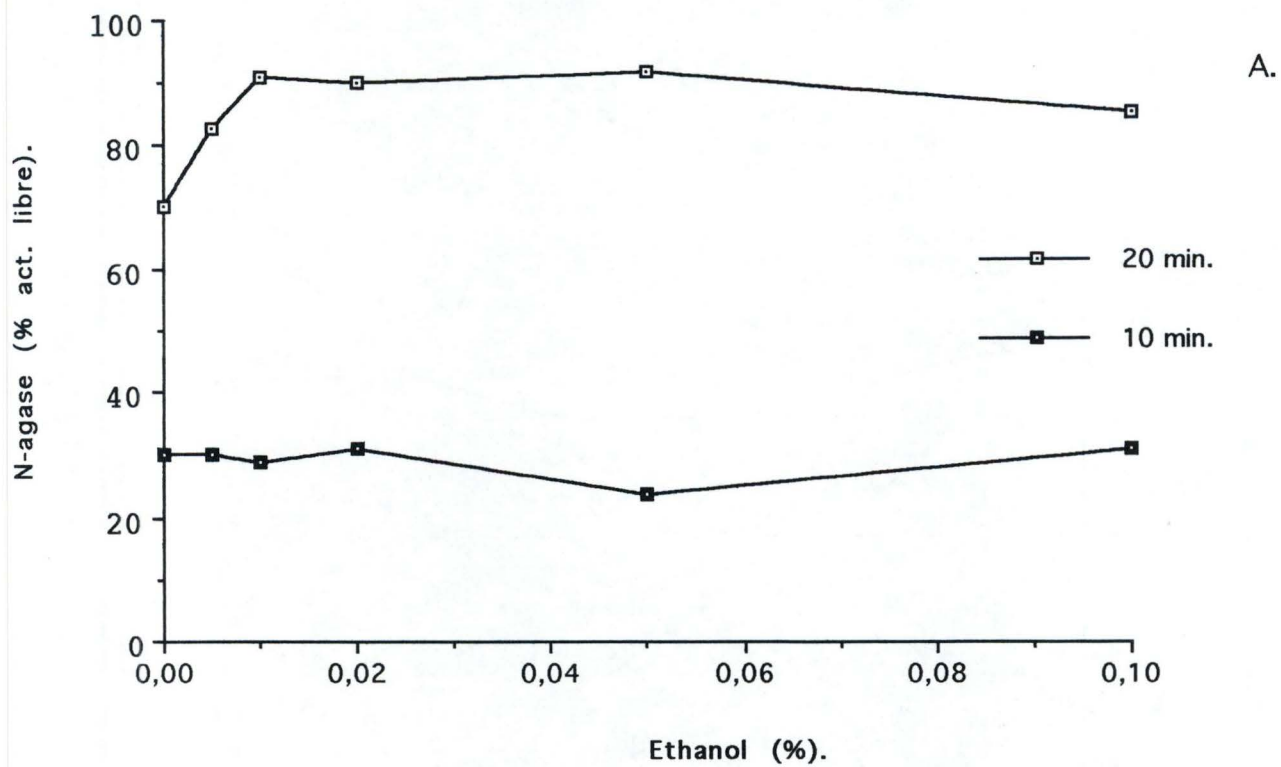


Fig 14: Effet du système X-X0 / Fe-ADP (A) et effet du système Acide ascorbique / Fe Cl₂ (B) sur la membrane lysosomale en présence d'éthanol.

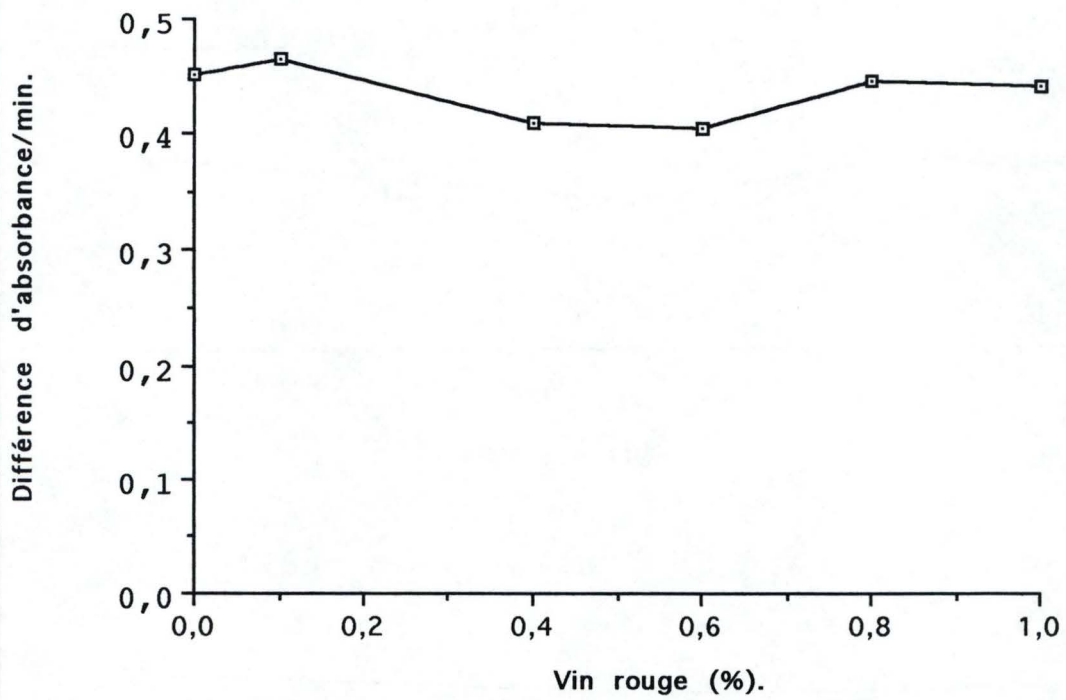
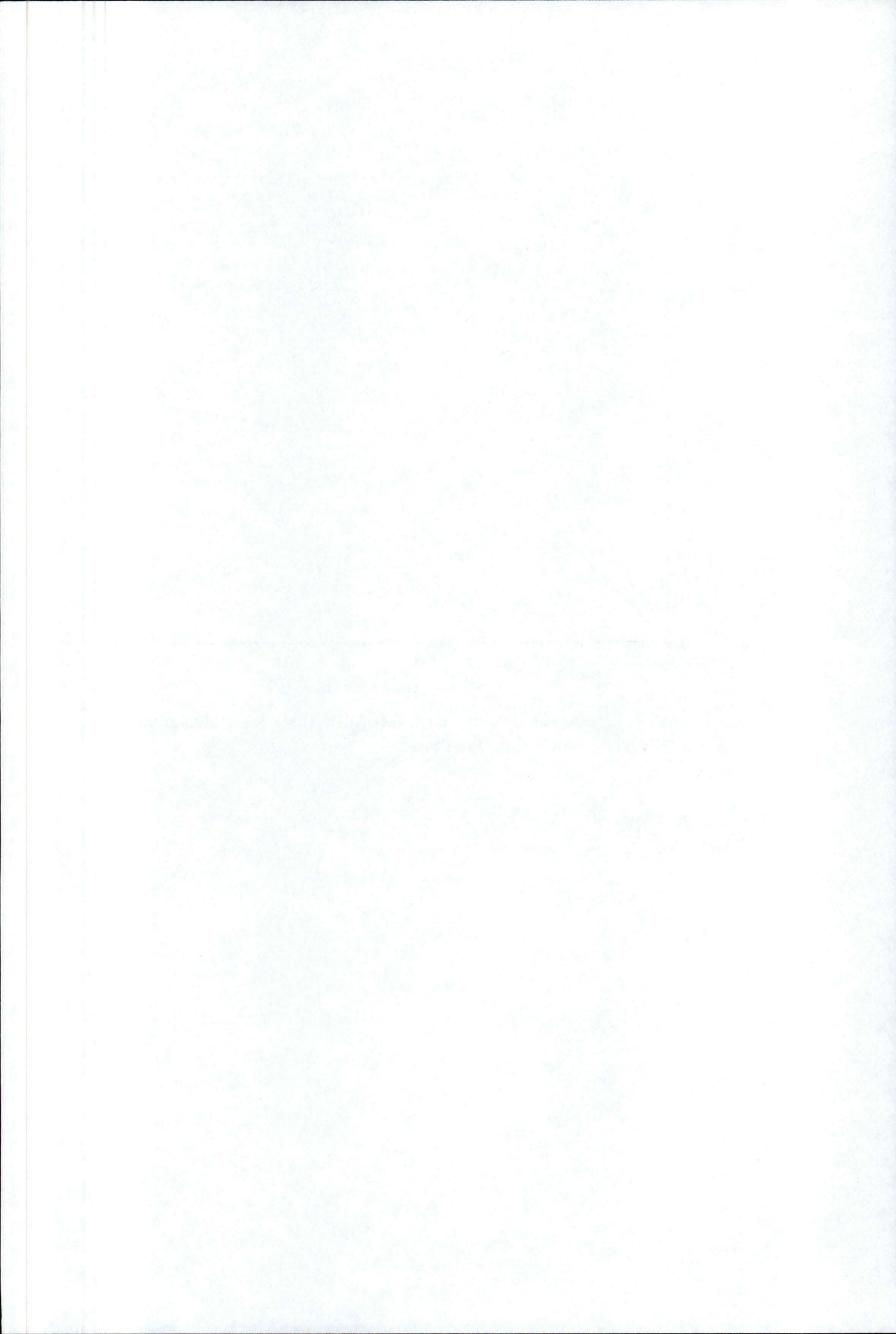


Fig 15: Production d'acide urique par la Xanthine oxydase en présence de vin rouge.



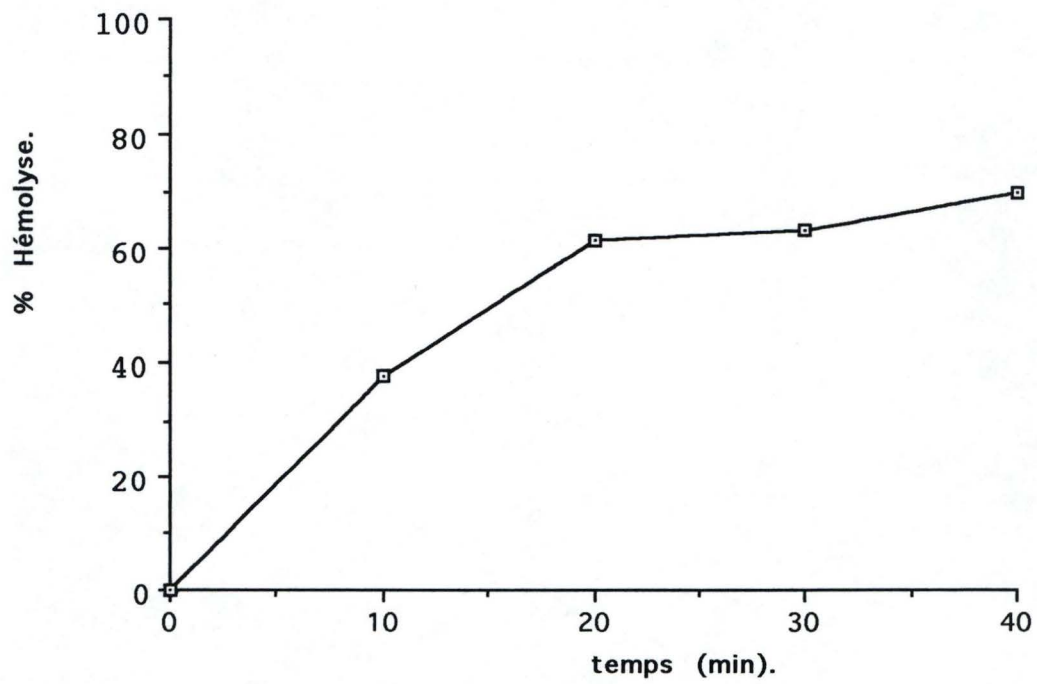


Fig 16: Effet de la Phospholipase C (0,025 u) sur les globules rouges humains en fonction du temps.

C H A P I T R E I I .

INFLUENCE DU VIN SUR LES LYSOSOMES ET LES GLOBULES ROUGES HUMAINS SOUMIS A L'ACTION DE LA PHOSPHOLIPASE C

Les phospholipases, la phospholipase C en particulier, sont capables d'altérer les membranes biologiques en hydrolysant les phospholipides qui les constituent.

Nous avons recherché si le vin était capable de jouer un rôle protecteur de membrane dans ce système d'agression de celles-ci tout différent de celui que nous avons utilisé dans les expériences précédentes. Les systèmes membranaires auxquels nous nous sommes adressés sont les globules rouges et les lysosomes. La réponse des globules nous renseignera sur le compostement d'une membrane plasmique, celle des lysosomes sur celui d'une endomembrane.

II.1. EFFET DE LA PHOSPHOLIPASE C SUR LES GLOBULES ROUGES

L'état de la membrane plasmique est apprécié par le degré d'hémolyse. La figure 16 illustre l'hémolyse produite par une incubation des globules rouges en présence de phospholipase C pendant des temps croissants.

Comme attendu, la phospholipase C induit une hémolyse progressive qui peut atteindre 80 % après plusieurs dizaines de minutes de traitement.

II.2. EFFET DU VIN SUR L'HEMOLYSE PRODUITE PAR LA PHOSPHOLIPASE C

Il est rapporté à la figure 17. Manifestement, le vin rouge est capable de contrecarrer l'action hémolytique de la phospholipase C et ce à des concentrations inférieures à 1 %. Par contre, comme il est indiqué à la figure 18, le vin blanc n'est pratiquement pas efficace, aucun effet antihémolytique significatif n'est observé dans la gamme des concentrations que nous avons utilisées.

L'éthanol n'est pas responsable de l'effet du vin (figure 19).

L'hémolyse provoquée par la phospholipase C n'est pas affectée par l'addition d'éthanol dans le milieu d'incubation à des concentrations comparables à celles présentes dans le vin lors de nos expériences.

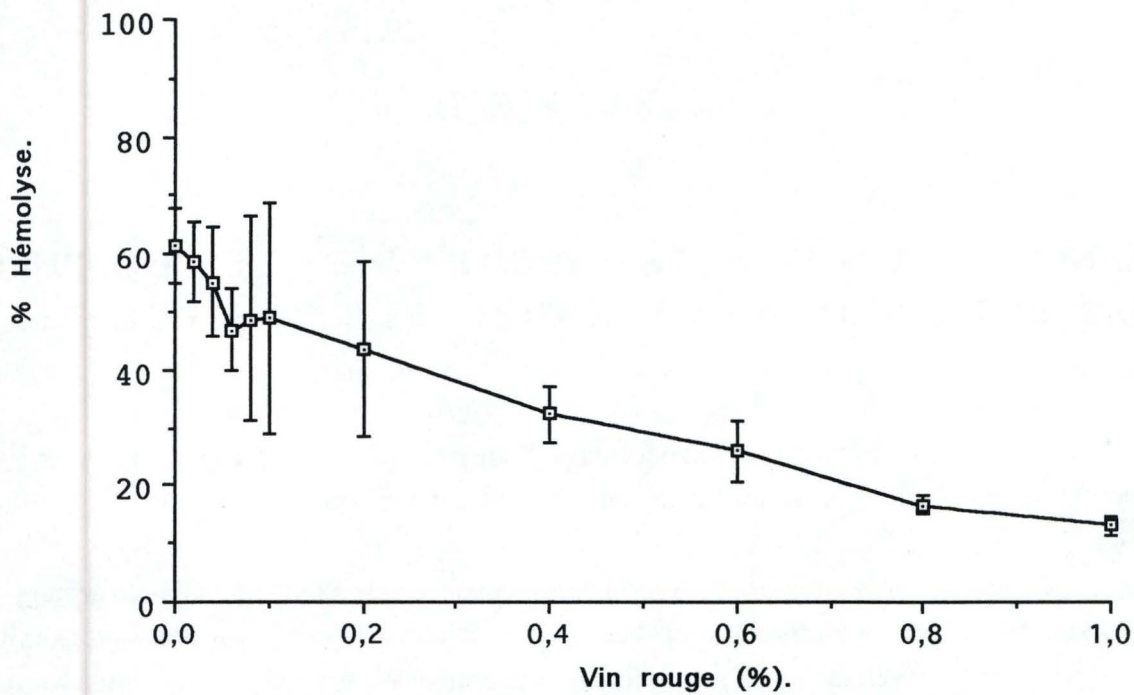


Fig17: Effet de la Phospholipase C sur les globules rouges humains pendant 40 min en présence de vin rouge.

Valeur moyenne (n=3) accompagnée de son écart-type.

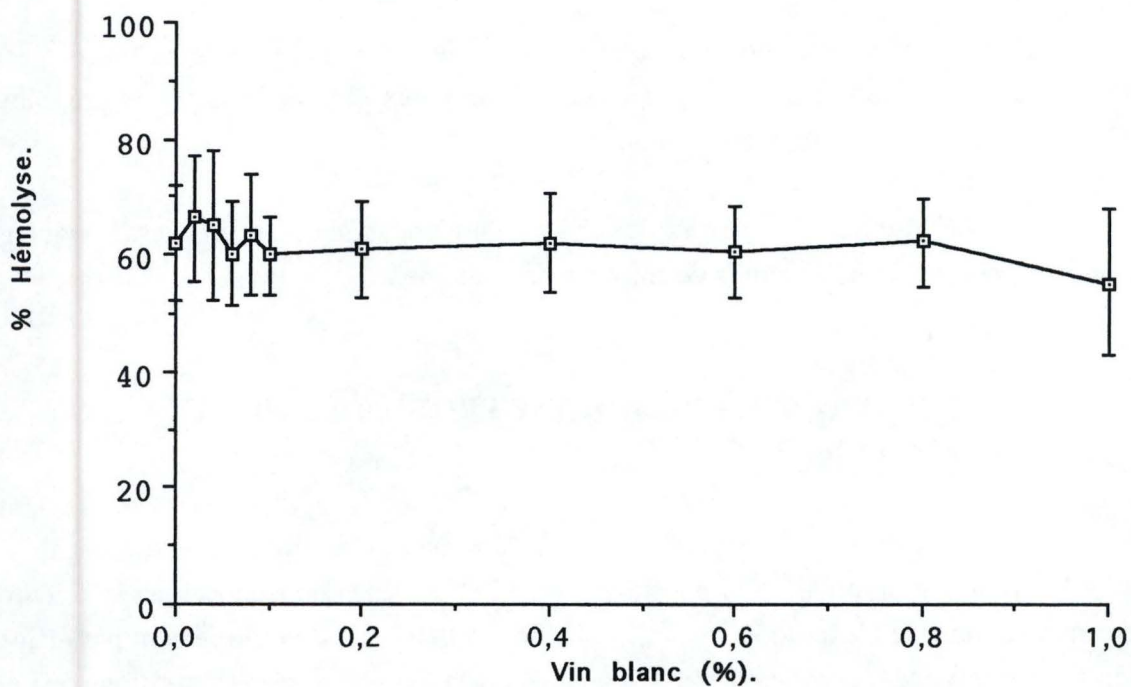


Fig 18: Effet de la Phospholipase C sur les globules rouges humains pendant 40 min en présence de vin blanc.

Valeur moyenne (n=3) accompagnée de son écart-type.

II.3. EFFET DU VIN SUR LES LYSOSOMES SOUMIS A L'ACTION DE LA PHOSPHOLIPASE C

La phospholipase C provoque une augmentation marquée de l'activité libre de la N-agase (figure 20) traduisant l'altération de la membrane lysosomale provoquée par cette phospholipase. Le vin rouge n'exerce pas d'effet significatif sur cette lyse des lysosomes comme le montre la figure 21.

II.4. EFFET DU VIN ROUGE SUR L'ACTIVITE DE LA PHOSPHOLIPASE C

Nous avons déterminé si le vin n'avait pas une action inhibitrice sur l'activité enzymatique de la phospholipase C. le substrat est constitué d'un mélange de phosphatidylcholines (lécithines).

Les résultats sont représentés à la figure 22 et montrant une bonne activité hydrolytique de la phospholipase C que nous utilisons.

La présence de vin rouge dans l'essai enzymatique n'affecte pas l'activité de l'enzyme (figure 23).

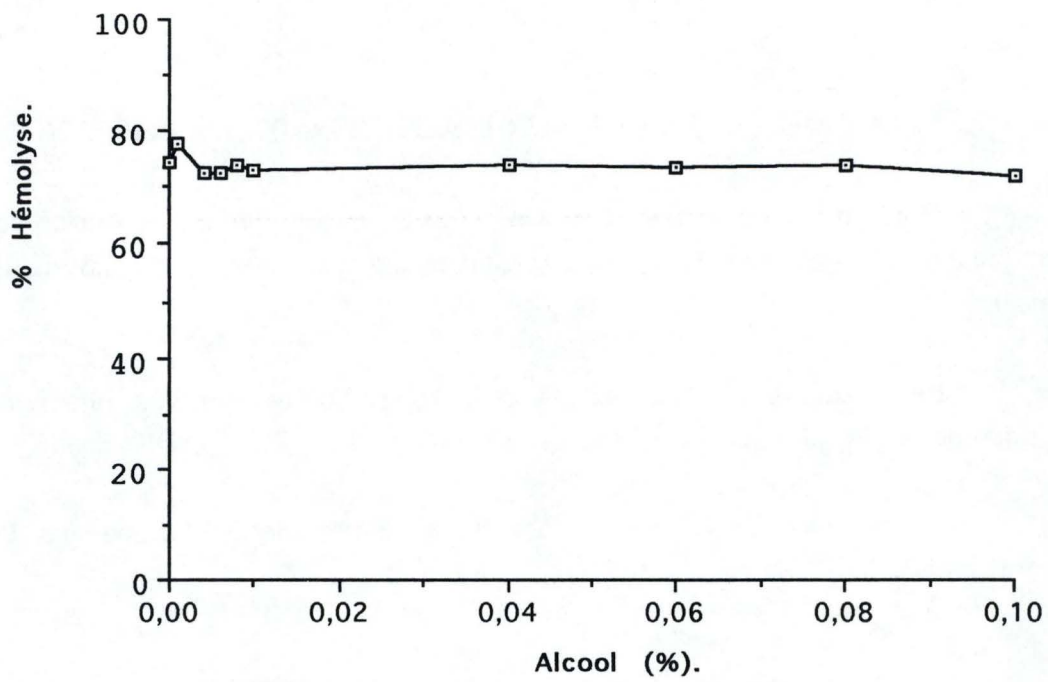


Fig 19: Effet de la Phospholipase C sur les globules rouges humains pendant 40 min en présence d'éthanol.

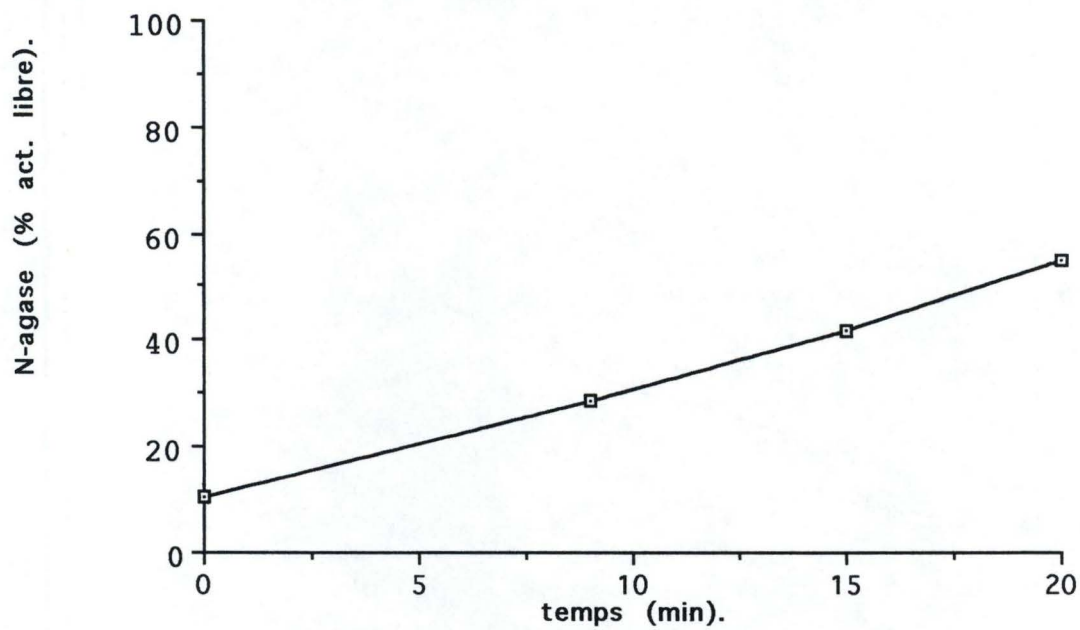


Fig 20: Effet de la Phospholipase C (0,025 u) sur la membrane lysosomale en fonction du temps.

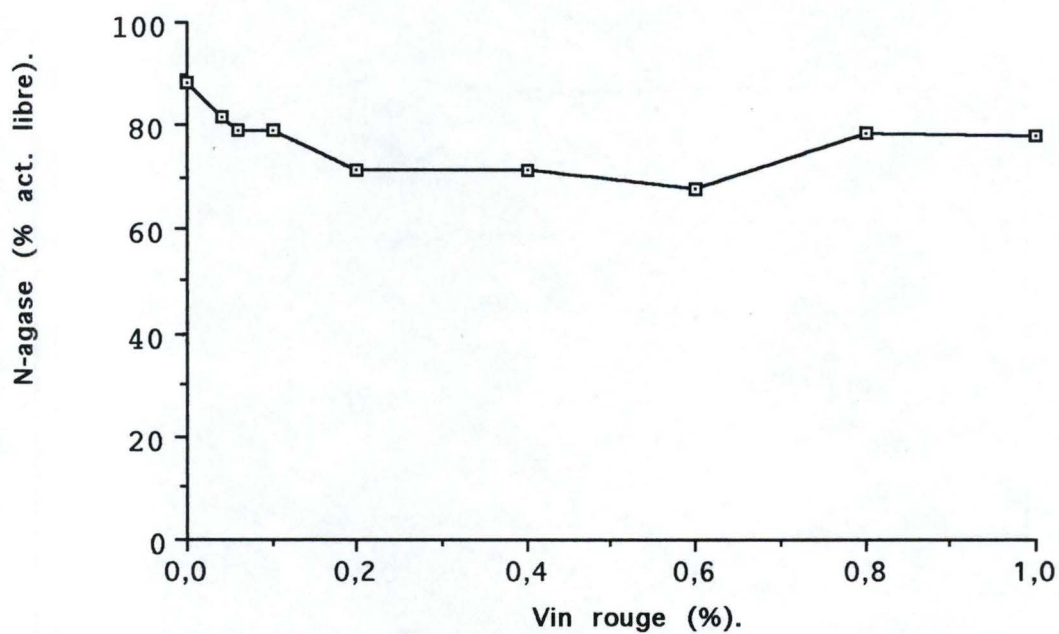


Fig 21: Effet de la Phospholipase C sur la membrane lysosomale pendant 15 min en présence de vin rouge.

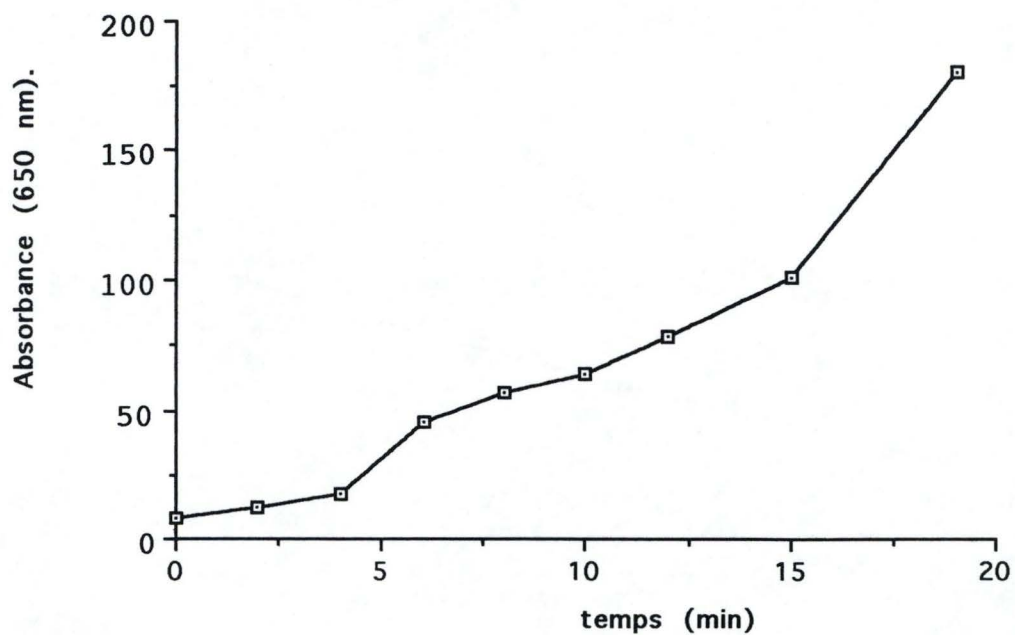


Fig 22: Hydrolyse de la Phosphatidylcholine (lécithine) par la Phospholipase C en fonction du temps.

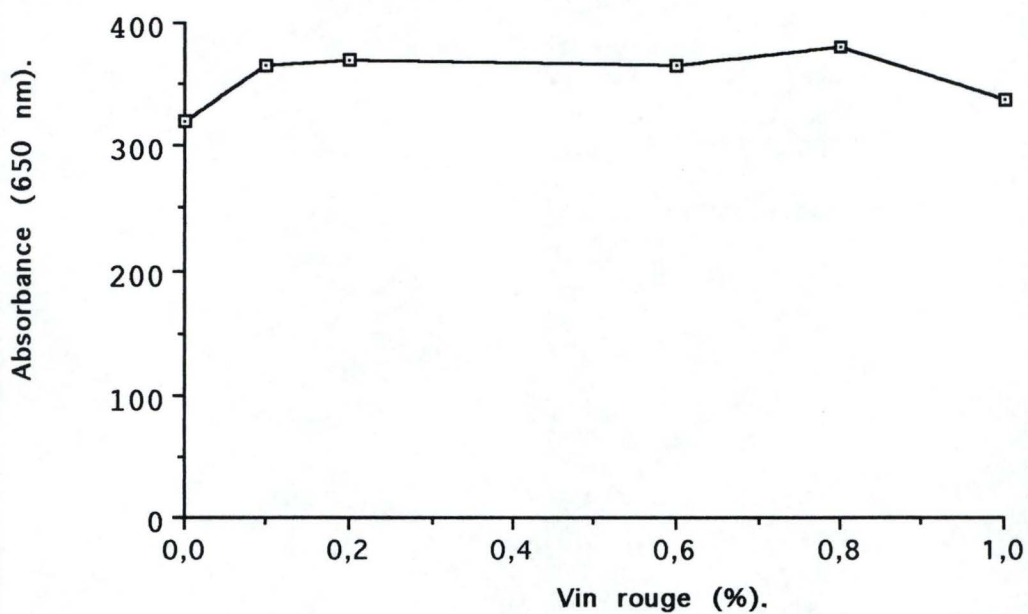


Fig 23: Hydrolyse de la Phosphatidylcholine (lécithine) par la Phospholipase C pendant 15 min, en présence de vin rouge.

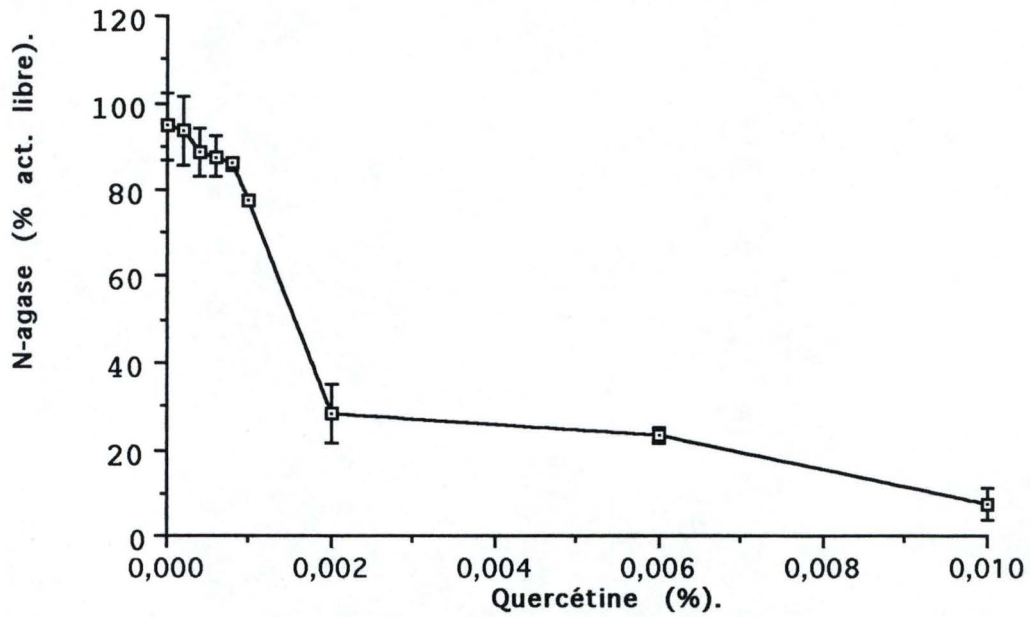


Fig 24: Effet du système X-XO / Fe-ADP sur la membrane lysosomale pendant 20 min, en présence de quercétine. Valeur moyenne (n=3) accompagnée de son écart-type.

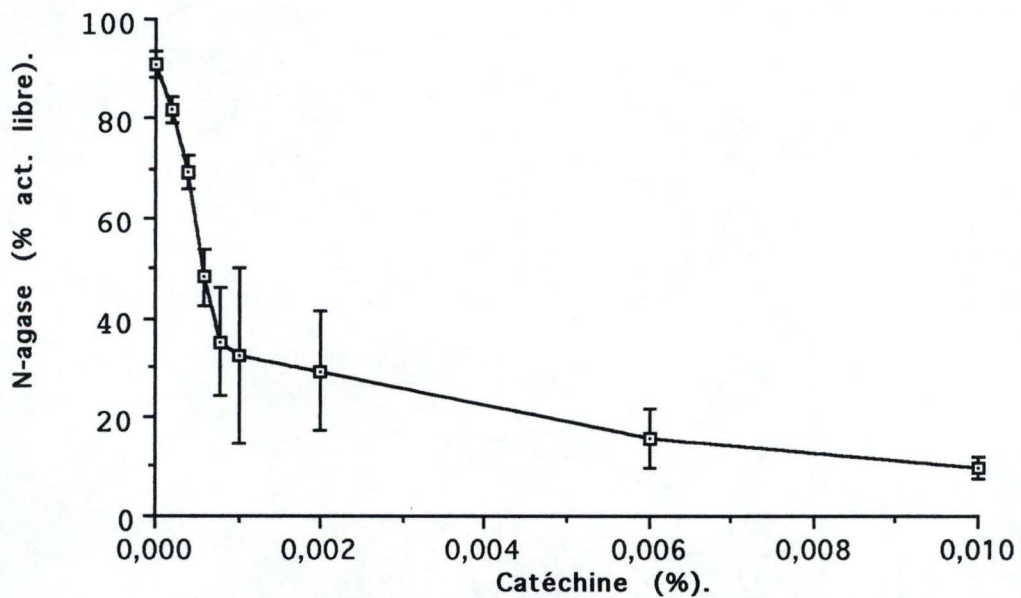


Fig 25: Effet du système X-XO / Fe-ADP sur la membrane lysosomale pendant 20 min, en présence de catéchine. Valeur moyenne (n=3) accompagnée de son écart-type.

C H A P I T R E I I I .

INFLUENCE DE CERTAINES SUBSTANCES PRESENTES DANS LE VIN SUR LES LYSOSOMES SOUMIS AU SYSTEME X-XO ET LES GLOBULES ROUGES TRAITES PAR LA PHOSPHOLIPASE C

Le vin contient un très grand nombre de composés dont des substances phénoliques du type flavonoïdes et substances apparentées. Nous avons recherché si des représentants caractéristiques de ces substances étaient capables d'exercer un effet semblable à celui du vin lors de l'altération des lysosomes par le système X-XO et l'hémolyse des globules rouges par la phospholipase C. Notre choix s'est porté sur la quercétine, la catéchine et le resvératrol qui sont présents, surtout les deux premiers, en quantité appréciable dans certains vins (Frankel et al., 1993 - Siemann and Creasy, 1992) et l'endotélon, un oligomère procyanidolique (2 à 3 catéchines) extrait du vin et utilisé en thérapeutique vasculaire : il augmente la résistance des vaisseaux et diminue leur perméabilité (Laparra, 1978 - Godeau and al., 1985 - Agache, 1981).

III.1. EFFET DE LA QUERCETINE, DE LA CATECHINE, DU RESVERATROL ET DE L'ENDOTELON SUR LES LYSOSOMES SOUMIS AU SYSTEME X-XO / Fe-ADP

Les résultats sont présentés aux figures 24-27. Manifestement, les 4 composés phénoliques provenant du vin inhibent l'altération des lysosomes induite par le système producteur des radicaux libres oxygénés. La quercétine est la moins efficace des substances testées, les trois autres ont des effets comparables.

III.2. EFFET DE LA QUERCETINE, DE LA CATECHINE, DU RESVERATROL ET DE L'ENDOTELON SUR LES LYSOSOMES ET LES GLOBULES ROUGES TRAITES PAR LA PHOSPHOLIPASE C

III.2.1. Lysosomes

Seul l'endotélon est capable de s'opposer à l'action lésante de la phospholipase C sur la membrane lysosomale comme l'illustre la figure 34, par contre, ni la quercétine, ni la catéchine, ni le resvératrol ne manifestent d'effet protecteur, du moins dans une même zone de concentrations utilisées (figures 32, 33 et 35).

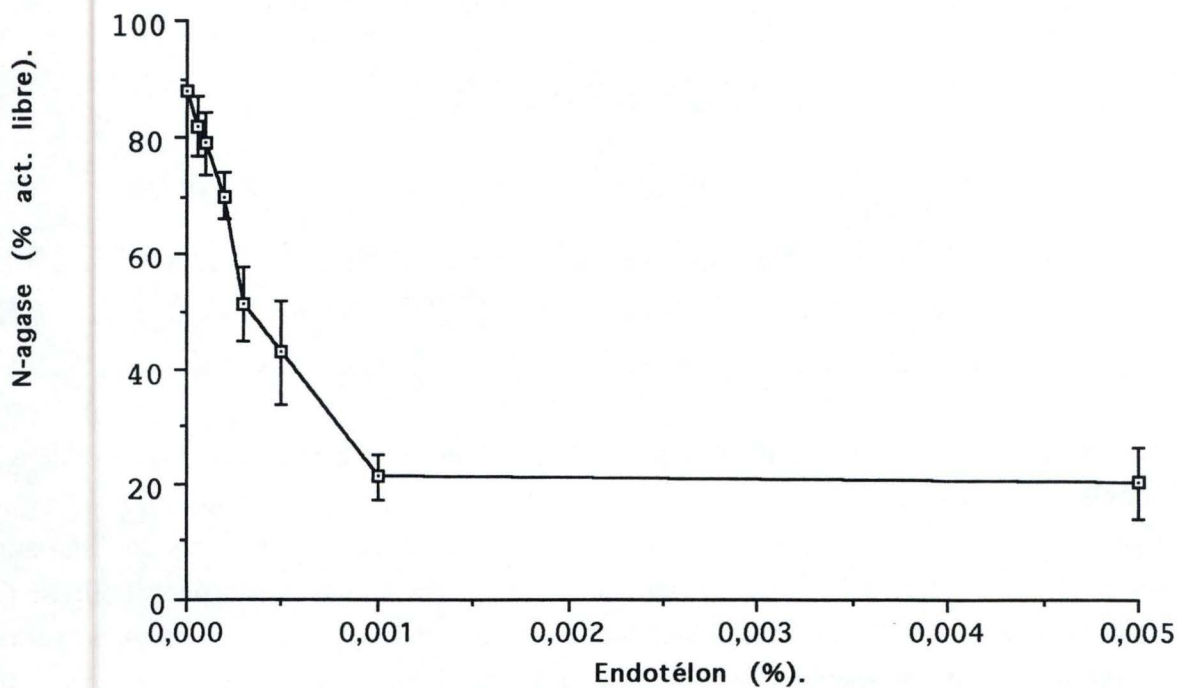


Fig 26: Effet du système X-XO / Fe-ADP sur la membrane lysosomale pendant 20 min, en présence d'endotélon.
Valeur moyenne (n=3) accompagnée de son écart-type.

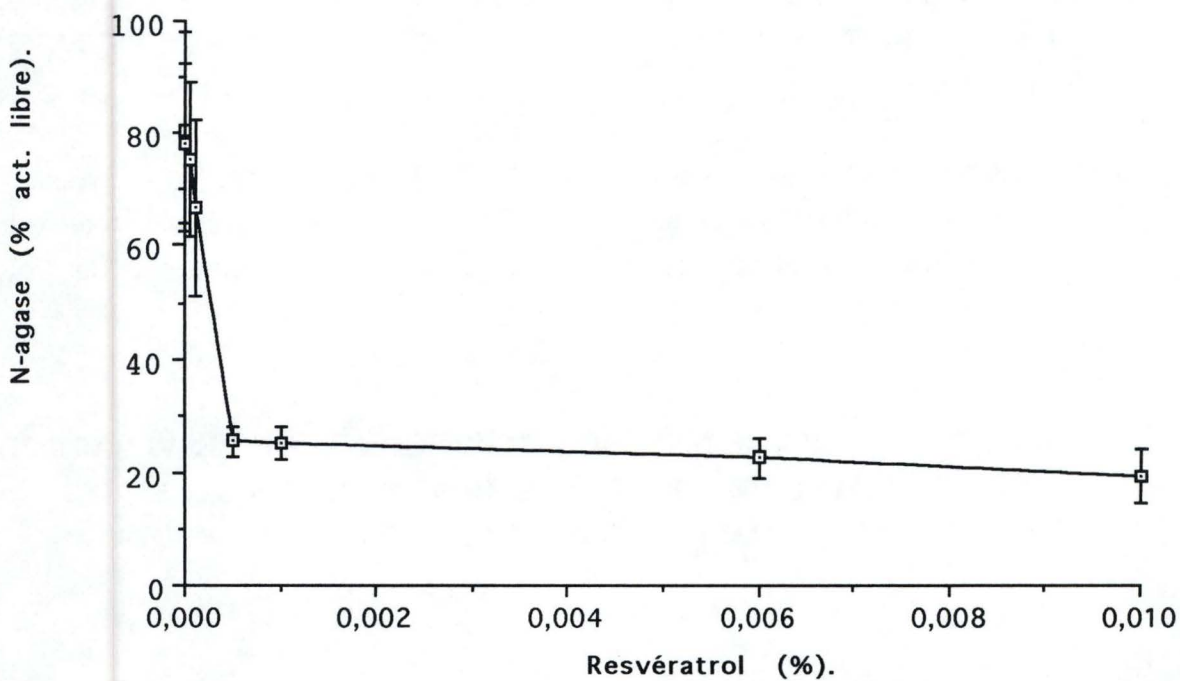


Fig27: Effet du système X-XO / Fe-ADP sur la membrane lysosomale pendant 20 min, en présence du resvératrol.
Valeur moyenne (n=3) accompagnée de son écart-type.

III.2.2. Globules rouges

Quercétine et endotélon inhibent l'effet de la phospholipase C sur les globules rouges (figure 28 et figure 30) mais les concentrations efficaces sont très différentes pour les deux substances. Pour obtenir un effet maximum, la quercétine doit être à une concentration au moins 10 fois supérieure à celle de l'endotélon.

Ni la catéchine, ni le resvératrol ne sont capables d'inhiber l'hémolyse produite par la phospholipase C (figure 29 et figure 31).

Vu l'effet prononcé de l'endotélon, nous avons recherché s'il ne s'agissait pas d'une action directe sur l'enzyme, comme le montre la figure 36, l'hydrolyse de la lécithine par la phospholipase C n'est pas influencée par la présence d'endotélon.

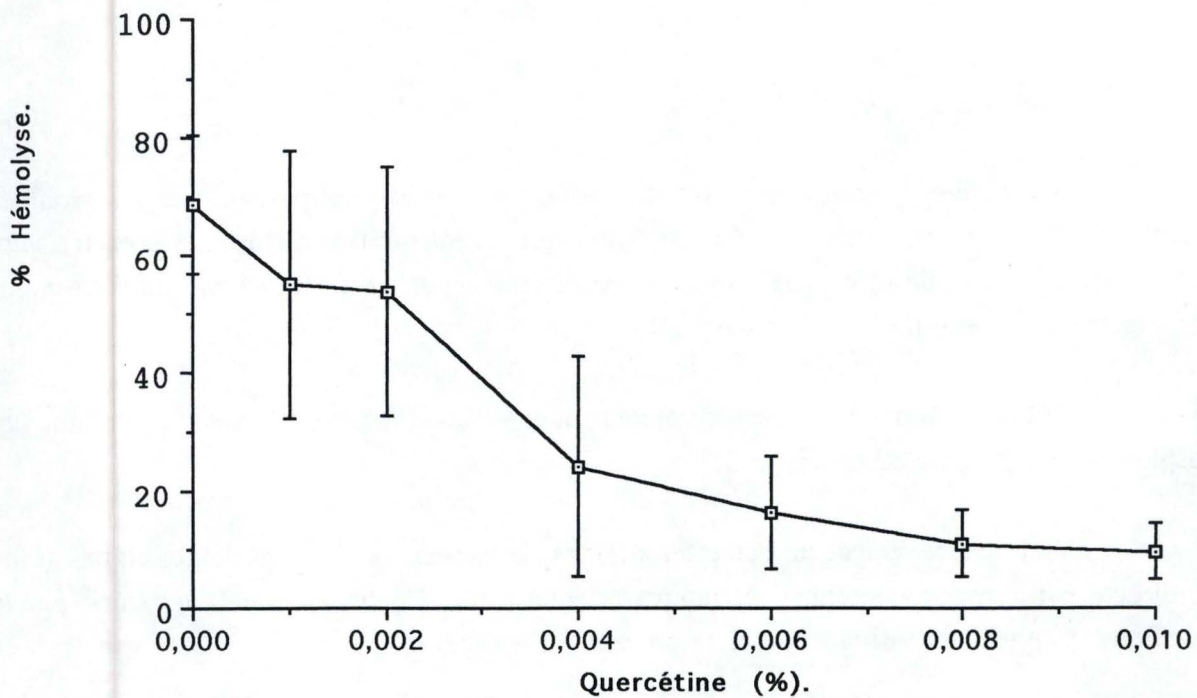


Fig 28: Effet de la Phospholipase C sur la membrane des globules rouges humains pendant 40 min, en présence de quercétine.

Valeur moyenne (n=3) accompagnée de son écart-type.

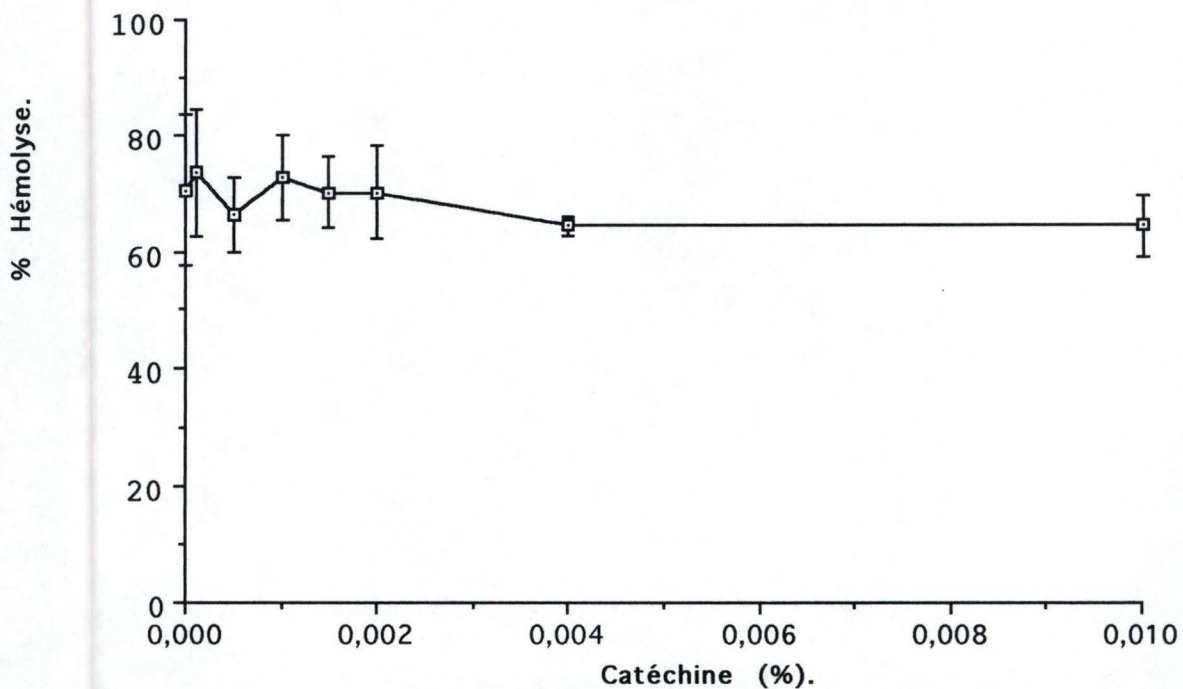


Fig 29: Effet de la Phospholipase C sur la membrane des globules rouges humains pendant 40 min, en présence de catéchine.

Valeur moyenne (n=3) accompagnée de son écart-type.

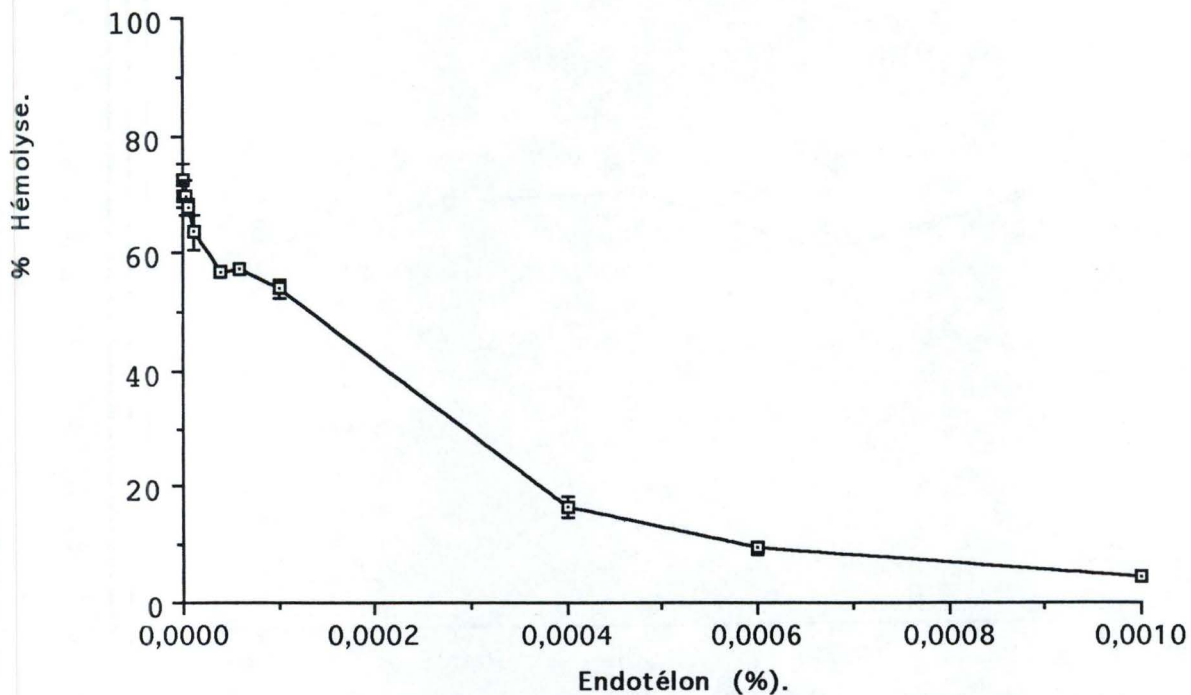


Fig 30: Effet de la Phospholipase C sur la membrane des globules rouges humains pendant 40 min, en présence d'endotélon.
Valeur moyenne (n=3) accompagnée de son écart-type.

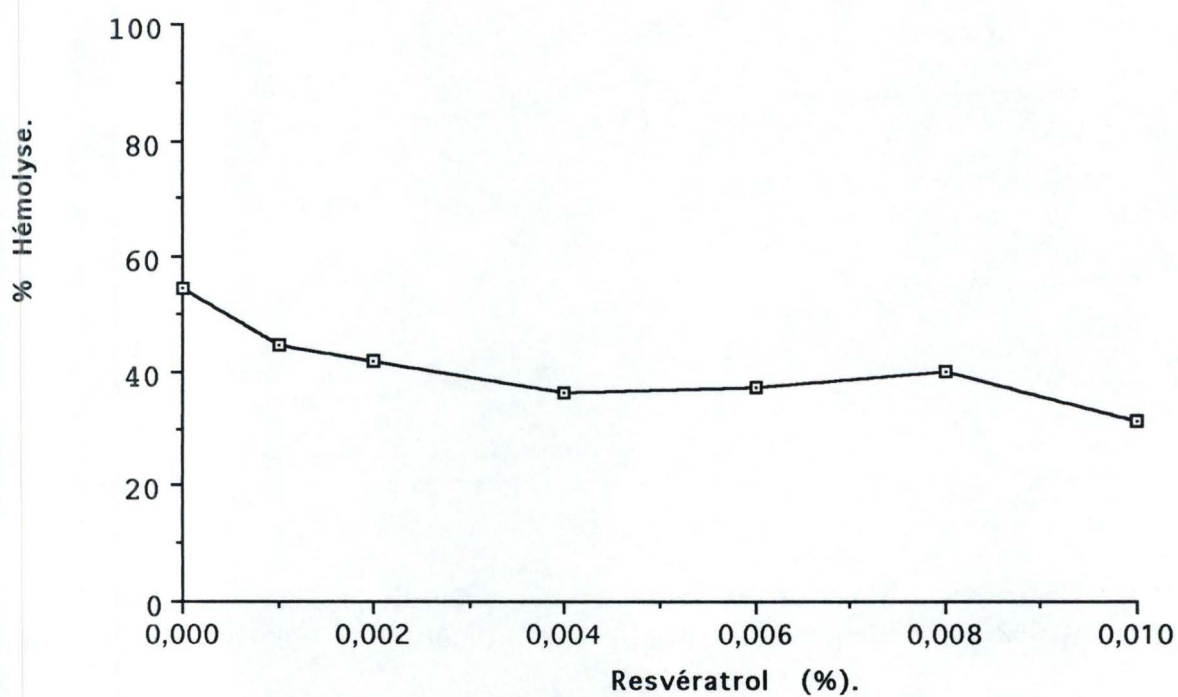


Fig 31: Effet de la Phospholipase C sur la membrane des globules rouges humains pendant 40 min, en présence de resvératrol.

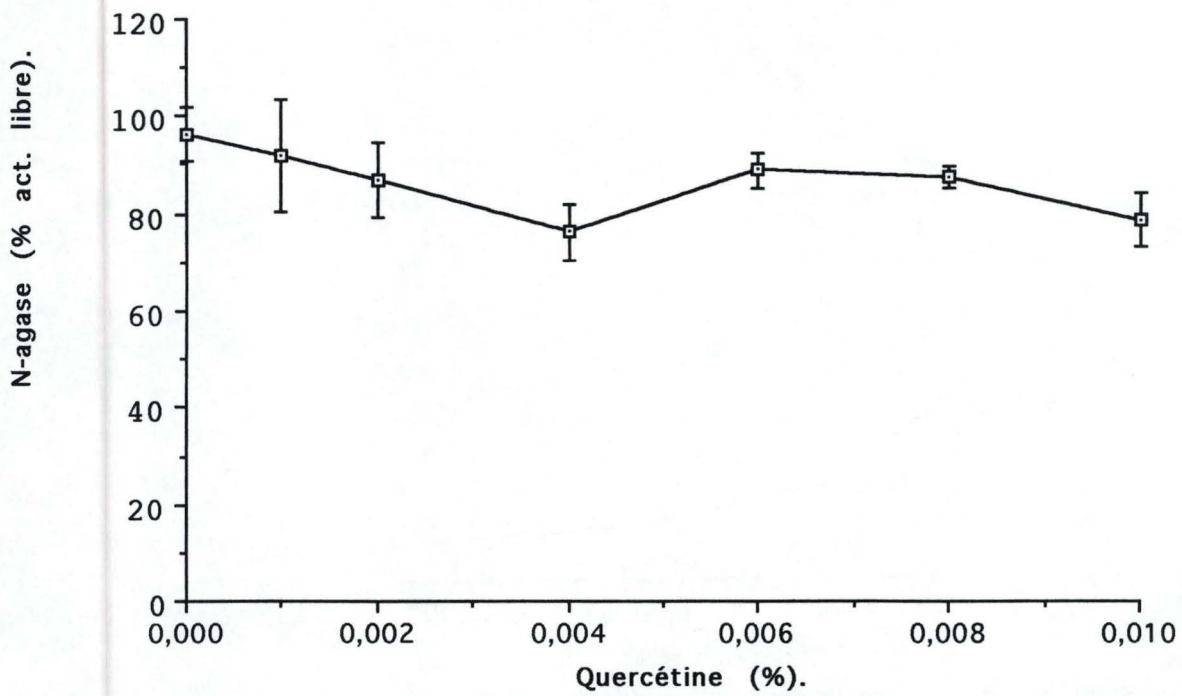


Fig 32: Effet de la Phospholipase C sur la membrane lysosomale pendant 15 min, en présence de quercétine.

Valeur moyenne (n=3) accompagnée de son écart-type.

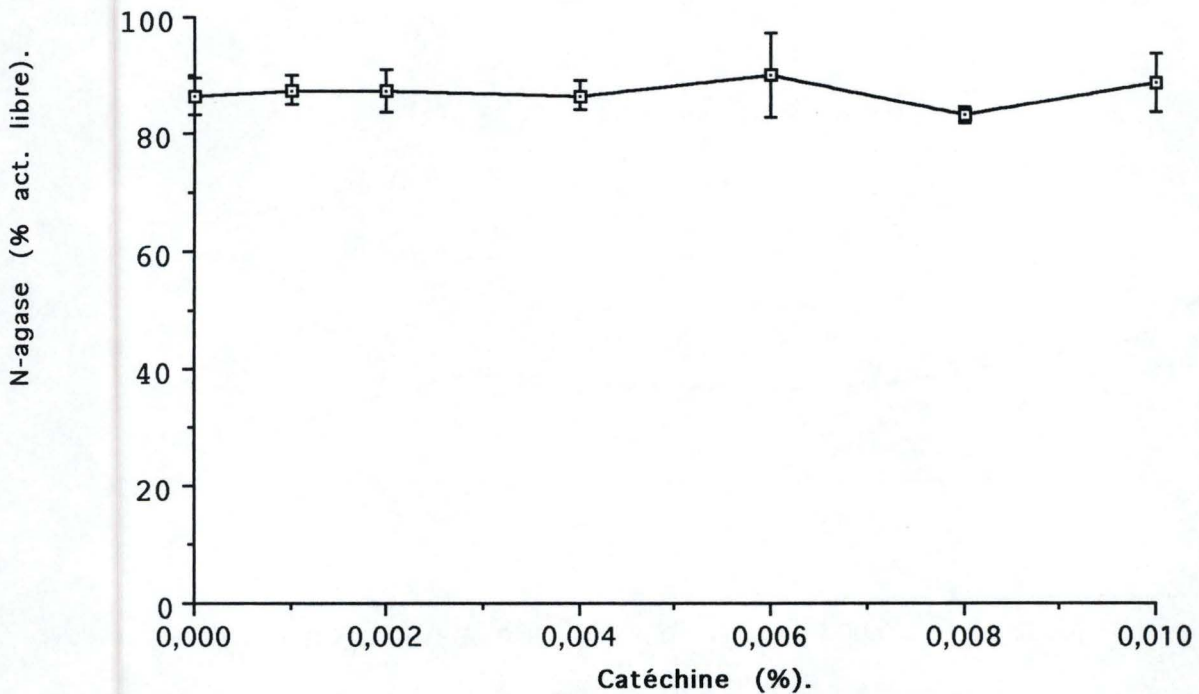


Fig33: Effet de la Phospholipase C sur la membrane lysosomale pendant 15 min, en présence de catéchine.

Valeur moyenne (n=3) accompagnée de son écart-type.

N'agase (% act. libre).

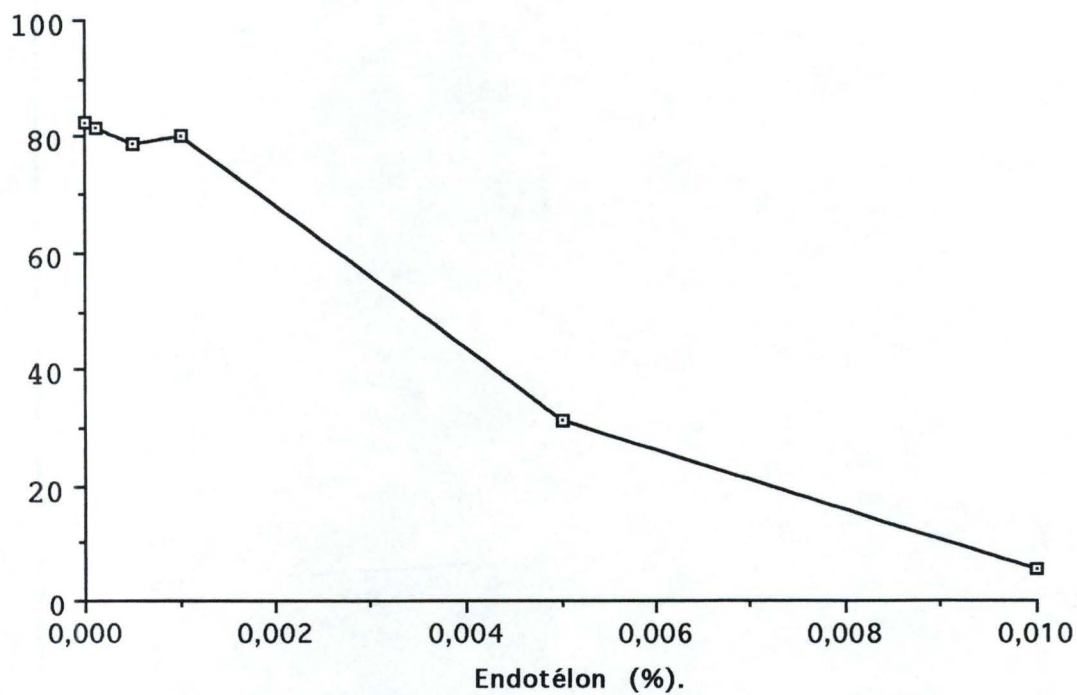


Fig 34: Effet de la Phospholipase C sur la membrane lysosomale pendant 15 min, en présence d'endotélon.

N-agase (% act. libre).

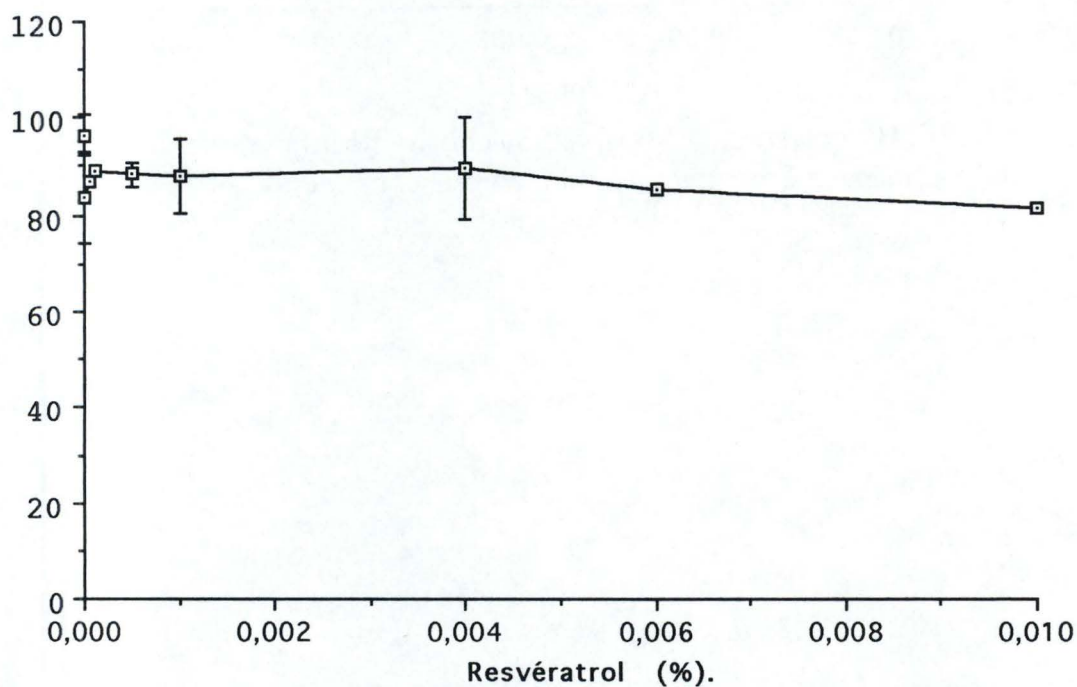


Fig 35: Effet de la Phospholipase C sur la membrane lysosomale pendant 15 min, en présence de resvératrol.

Valeur moyenne (n=3) accompagnée de son écart-type.

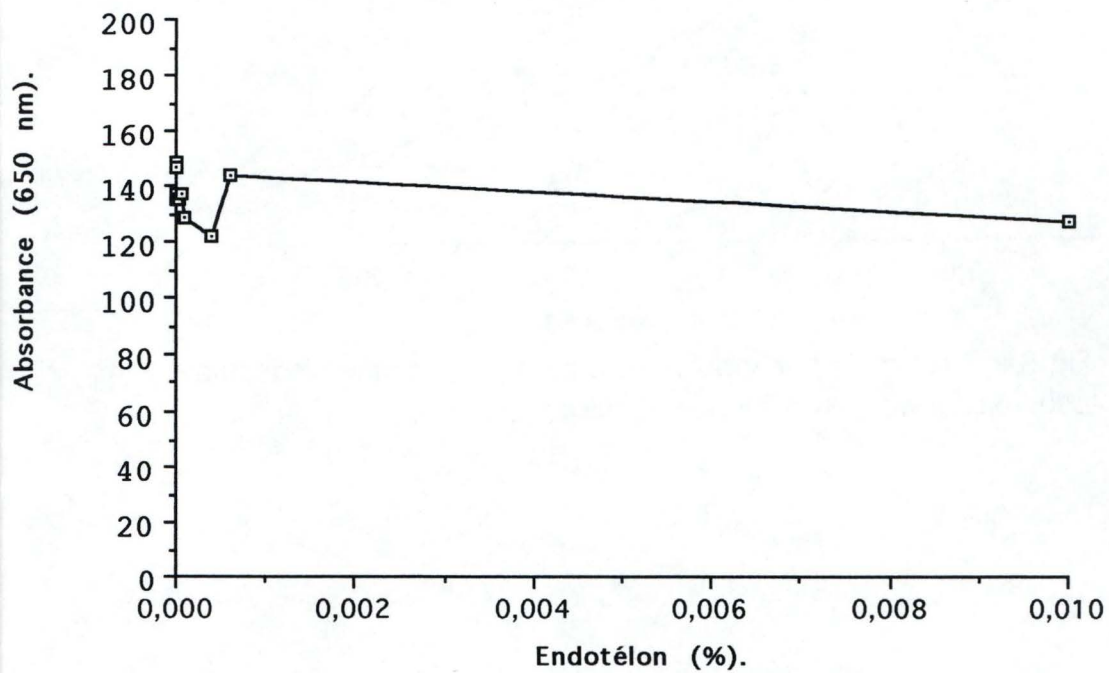


Fig 36: Hydrolyse de la Phosphatidylcholine (lécithine) par la Phospholipase C pendant 15 min, en présence d'endotélon.

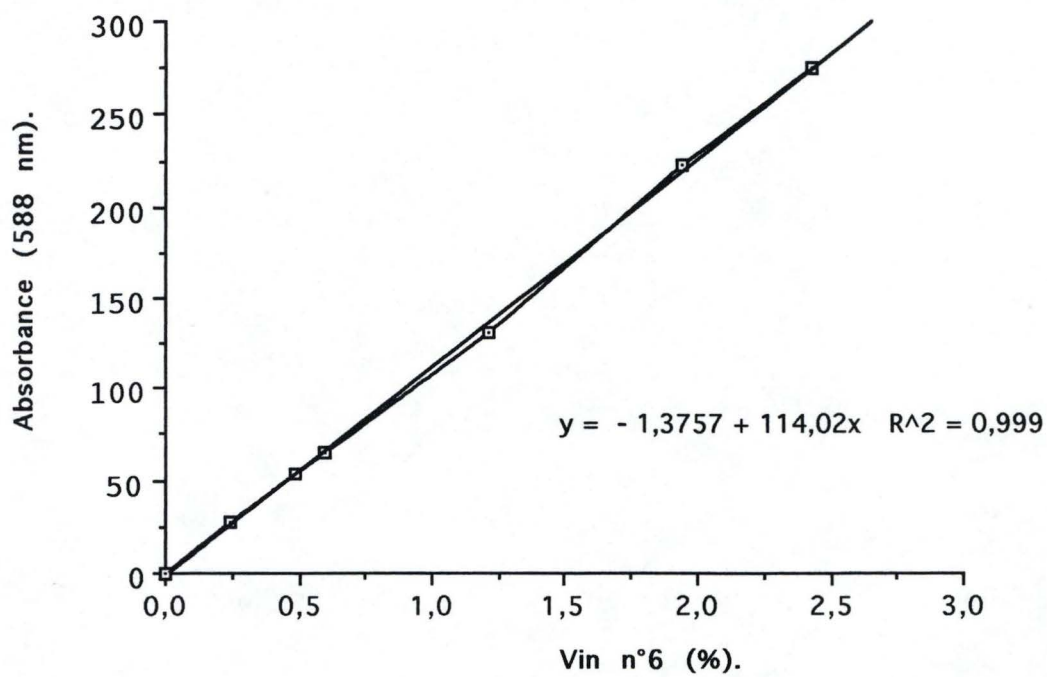


Fig 37: Dosage des composés phénoliques dans le vin n°6.

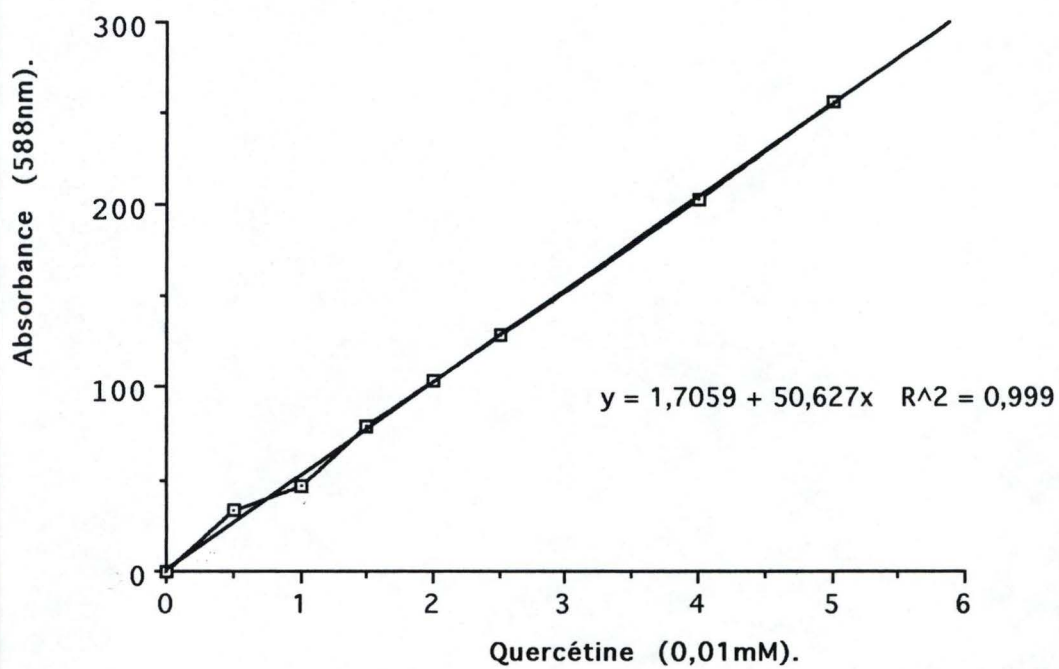


Fig 38: Quercétine étalon.

C H A P I T R E I V .

EFFET COMPARATIF DES DIFFERENTS VINS SUR LA LYSE DES LYSOSOMES INDUITE PAR LE SYSTEME X-XO ET SUR L'HEMOLYSE PROVOQUEE PAR LA PHOSPHOLIPASE C

Les expériences dont nous avons présentés les résultats montraient bien qu'un vin rouge (Bordeaux supérieur) était capable de prévenir la lyse des lysosomes par les radicaux libres oxygénés et l'hémolyse provoquée par la phospholipase C. Il nous a semblé intéressant de voir jusqu'à quel point ces propriétés dépendaient du type de vin.

D'autre part, tenant compte des résultats que nous avons obtenus avec quelques polyphénols présents dans le vin, nous avons recherché si une relation éventuelle existait entre la teneur en polyphénols d'un vin et ses propriétés antilytiques.

IV.1. DOSAGE DES COMPOSES PHENOLIQUES

Il a été réalisé en utilisant le réactif de Folin. Comme le montre les figures 37 et 38 l'absorbance du composé coloré produit par la réaction évolue d'une façon strictement linéaire que ce soit pour un polyphénol pur, la quercétine ou pour le vin n° 6 (pris comme exemple). Cette linéarité est observée pour les 9 vins que nous avons choisis dans les expériences suivantes. Elle nous a permis de déterminer les teneurs en polyphénols de ces vins qui sont reprises au tableau récapitulatif; exprimées en équivalents de quercétine.

On constate qu'une très grande différence de contenu en polyphénols peut exister entre différents vins.

IV.2. EFFET DES DIFFERENTS VINS SUR LES LYSOSOMES SOUMIS AU SYSTEME X-XO / Fe-ADP

Les résultats sont rassemblés à la figure 39. Les lysosomes ont été incubés pendant 20 minutes en présence du système X-XO / Fe-ADP et de concentrations croissantes des différents vins testés. Pour faciliter la comparaison, une valeur de 100 % a été attribuée à l'activité libre de la N-agase mesurée en absence de vins.

On constate des différences sensibles d'un vin à l'autre; les vins 4 et 9 sont très protecteurs de la membrane lysosomale alors que le vin 8 ne l'est presque pas dans la gamme des concentrations utilisées.

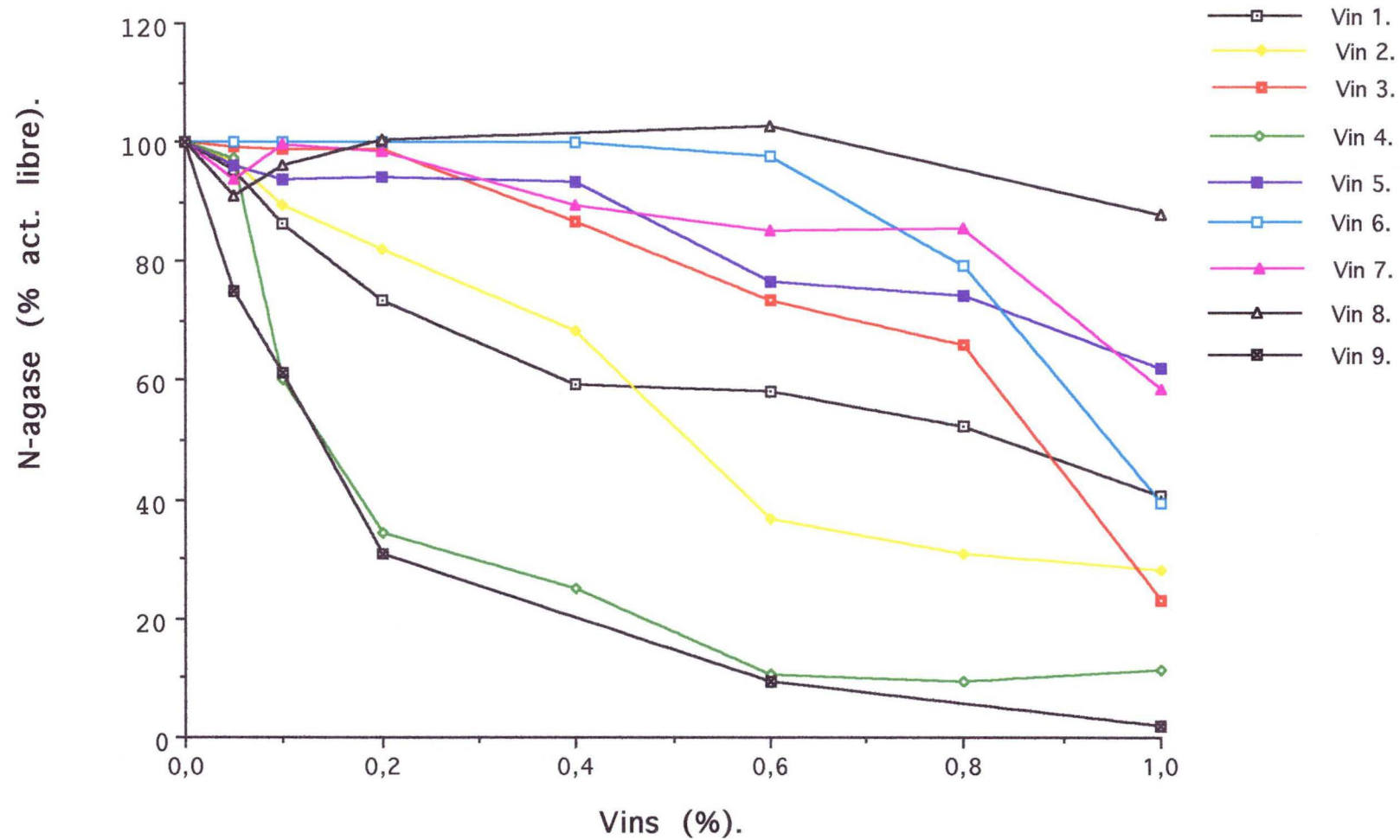


Fig 39: Effet du système X-XO / Fe-ADP sur la membrane lysosomale pendant 20 min, en présence des différents vins (de 1 à 9).

IV.3. EFFET DES DIFFERENTS VINS SUR L'HEMOLYSE PROVOQUEE PAR PHOSPHOLIPASE C

Dans ce cas également, l'effet antihémolytique du vin est variable d'un vin à l'autre (figures 40 et 41).

On constate que les vins 4 et 9, les plus efficaces dans la protection des lysosomes sous l'influence du système X-XO / Fe-ADP sont également les plus actifs d'un point de vue hémolytique.

IV.4. RELATION AVEC LA TENEUR EN POLYPHENOLS

Les observations sur les différents vins que nous venons de faire sont mises en parallèle au tableau avec la teneur en polyphénols de ces vins.

Pour simplifier, nous nous sommes référés à la concentration en vin qui provoquait une inhibition de 50 % de la lyse des lysosomes par le système X-XO / Fe-ADP ou de l'hémolyse par la phospholipase C. Ces valeurs sont mises en vis-à-vis avec la concentration en polyphénols de chaque vin essayé. Les données sont vraisemblablement trop fragmentaires et les concentrations en polyphénols totaux insuffisamment informationnelles pour qu'une relation précise soit établie entre les 2 données.

Il est toutefois certain que les vins les plus efficaces dans les deux systèmes (lysosomes et globules rouges) sont les vins ayant une teneur élevée en polyphénols et que les vins 5 et 8, qui sont les moins protecteurs, sont ceux qui contiennent le moins de polyphénols. Le vin 7 (vin rosé) occupe une position intermédiaire tant dans la protection des lysosomes que dans celle des globules rouges.

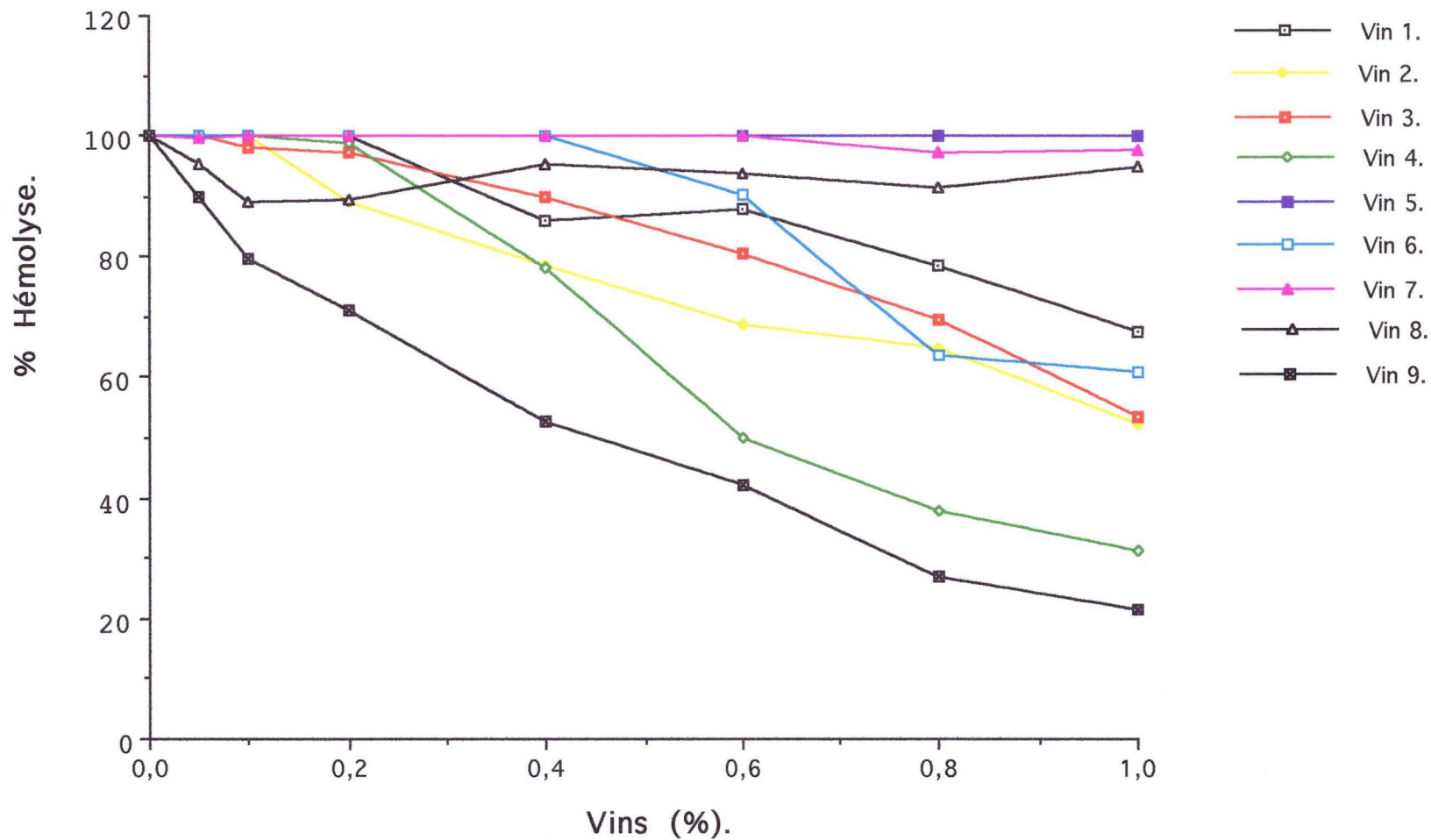


Fig 40: Effet de la Phospholipase C sur la membrane des globules rouges humains pendant 40 min, en présence des différents vins (de 1 à 9).

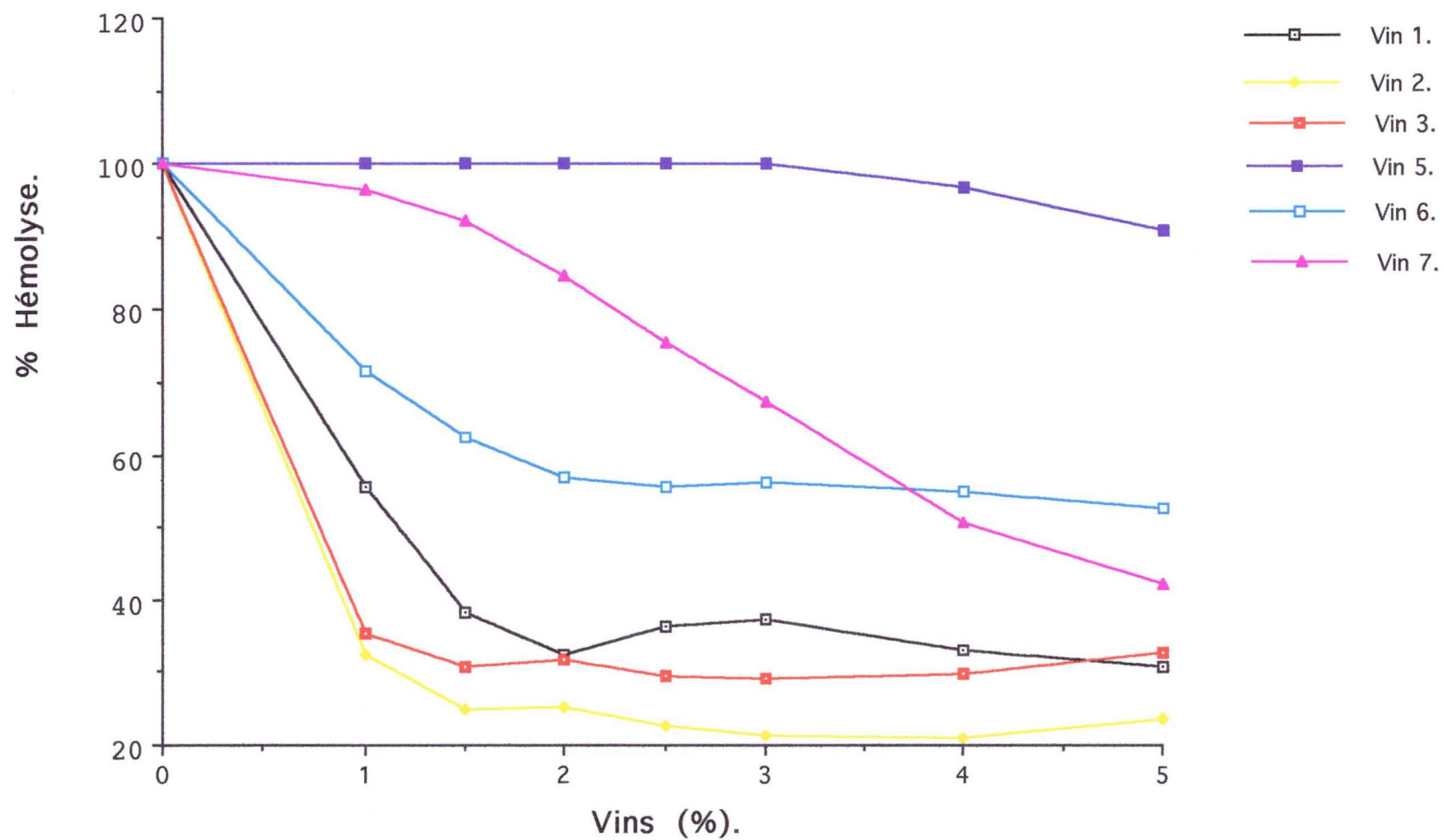


Fig 41: Effet de la Phospholipase C sur la membrane des globules rouges humains pendant 40 min, en présence des vins 1,2,3,5,6 et 7 jusqu'à 5%.

XANTHINE OX.

HEMOLYSE

VINS	50 % protect.	50 % protect		Equiv. querc. (mM /l).	Noms
VIN n°1	0,91%	1,25%		2,6	Juliéas (beaujolais)
VIN n°2	0,52%	0,78%		4,29	Mercurey
VIN n°3	0,88%	0,82%		4,61	Bordeaux supérieur
VIN n°4	0,15%	0,58%		5,91	Côtes de Provence
VIN n°5	> 1%	> 5%		0,61	Bourgogne blanc Chardonnay
VIN n°6	0,97%	5%		2,19	Roumain (rouge)
Vin n°7	1,40%	4,55%		1,16	Rosé.
Vin n°8	2,30%	>> 5%		0,34	Sauvignon blanc
Vin n°9	0,14%	0,45%		3,03	Bordeaux supérieur

Tableau récapitulatif: Protection apportée par les différents vins (50 %) dans les expériences radicalaires de Xanthine oxydase et dans les expériences d'hémolyse.

DISCUSSION DES RESULTATS

DISCUSSION DES RESULTATS

Lorsqu'une substance est capable d'inhiber la détérioration d'une membrane, comme celle des lysosomes, soumise à une agression par les radicaux libres oxygénés produits par la réaction de xanthine oxydase, trois possibilités d'action peuvent être envisagées.

1. La substance peut inhiber ou inactiver l'enzyme
2. Elle peut jouer un rôle d'éboueur (scavenger) des radicaux libres
3. Elle peut agir sur la membrane en la rendant plus résistante à l'action des radicaux libres.

Qu'en est-il dans le cas du vin ?

La première possibilité est vraisemblablement à exclure, puisque apparemment la xanthine oxydase n'est pas inhibée par le vin.

La deuxième est certainement à considérer. En effet, le vin est riche en composés phénoliques : flavonoïdes (ex : quercétine), catéchines, procyanidines (ex : endotélon ou oligomères procyanidoliques), phytoalexines (ex : trans-resvératrol). La concentration en quercétine dans le vin rouge est de 25 mg/L, celle en catéchine peut dépasser 150 mg/L, celle en procyanidine est supérieure à 1 g/L (Sharp, 1993) et celle en resvératrol est inférieure à 1 mg/L (Frankel and al., 1993 - Siemann and Creasy, 1992). Ces substances sont connues comme antioxydantes (Yuting and al., 1990 - Robak and Gryglewski, 1988) et comme il a été montré par Descharneux et al., 1991 et par nous-mêmes (chapitre III), elles sont capables de protéger "in vitro" la membrane lysosomale soumise au système xanthine / xanthine oxydase.

Toutefois, on ne peut écarter la possibilité d'une intervention du troisième mécanisme, un effet direct sur la membrane, comme il l'a déjà été suggéré par Descharneux et al., 1991, et tenant compte de nos résultats sur la phospholipase C dont nous allons discuter maintenant.

Du fait de leur capacité d'hydrolyser les phospholipides, les phospholipases peuvent détériorer les membranes biologiques. Leur pouvoir hémolytique, par exemple, est connu depuis longtemps. Nous avons montré que le vin rouge était capable de s'opposer à l'effet hémolytique de la phospholipase C. Ici également, il ne s'agit pas d'un effet direct sur l'enzyme puisque l'hydrolyse de la lécithine qu'il catalyse n'est pas affectée par le vin.

Comme autre mécanisme, on pourrait supposer que l'interaction entre les phospholipides localisés dans la membrane des globules rouges et l'enzyme est inhibée, du fait d'un effet des composés actifs du vin sur les lipides membranaires.

Une autre possibilité qui n'exclut pas nécessairement la précédente, est que la membrane, quoique ayant ses phospholipides altérés sous l'effet de la phospholipase, soit quand même capable de garder une perméabilité relativement normale. En effet, dans certains cas, l'hémolyse peut se faire en deux étapes. Dans un premier temps l'agent hémolytique perméabilise la membrane permettant aux petits solutés extérieurs (le Na Cl par exemple) de pénétrer à l'intérieur du globule : le résultat est dans un deuxième temps, l'établissement d'un déséquilibre osmotique conduisant au gonflement et à la rupture du globule rouge. On pourrait supposer que, en s'insérant dans la membrane, les composés actifs du vin la stabilisent et empêchent de s'établir la perméabilisation induite par la phospholipase C.

La membrane lysosomale est également dérériorée sous l'action de la phospholipase C. Il peut paraître surprenant que le vin n'ait pratiquement pas d'effet dans ce cas, l'activité libre de la N-agase augmente tout aussi bien sous l'effet d'enzyme lipolytique tant en présence qu'en absence de vin. Evidemment, les deux systèmes membranaires sont différents en composition. De plus, la taille des structures est dissemblable, on a d'une part un organe : le lysosome d'environ $0,5 \mu\text{M}$ de diamètre, et d'autre part, le globule rouge une cellule beaucoup plus grande. Il est possible que la phospholipase perméabilise davantage une membrane de taille plus restreinte (lysosomes), ne permettant pas aux composés actifs du vin de "colmater" cette membrane comme ils le font dans le cas des globules rouges, plus volumineux.

La quercétine, la catéchine, le resvératrol et l'endotélon sont des substances faisant partie des composés phénoliques du vin. Nos résultats montrent qu'elles sont capables de reproduire l'effet protecteur du vin rouge sur la membrane lysosomale soumise au système xanthine oxydase. Ces observations cadrent bien avec l'idée que l'effet du vin est dû essentiellement aux composés phénoliques qu'il contient.

Ni la quercétine, ni la catéchine, ni le resvératrol ne peuvent protéger la membrane lysosomale des effets de la phospholipase C. Ceci également s'accorde avec les résultats montrant que le vin est inefficace dans les mêmes concentrations. Notons que les concentrations en ces substances, dans nos expériences, sont largement supérieures à celles que l'on peut imaginer dans le vin dilué que nous utilisons.

L'endotélon est protecteur mais il est possible que, dans ce cas, les concentrations nécessaires pour obtenir cette protection ne soient pas atteintes dans nos expériences sur le vin nous ne pouvons nous prononcer, nous n'avons pas de données concernant la teneur du vin en endotélon.

Quant à l'hémolyse par la phospholipase C, quercétine et endotélon exercent un effet antihémolytique mais à des concentrations 10 fois plus faibles pour cette dernière substance; catéchine et resvératrol sont inefficaces. Il est à noter que la protection des lysosomes par l'endotélon nécessite 10 fois plus de composés que la protection des globules rouges.

La protection des membranes contre les radicaux oxygénés et contre la phospholipase C exercée par le vin peut être très différente suivant le vin utilisé. Pour obtenir un degré de protection semblable (par exemple de 50 %) dans les deux systèmes d'agression membranaire, des concentrations en vin sensiblement différentes sont parfois nécessaires.

Il est toutefois difficile de juger s'il s'agit d'un phénomène significatif car les comparaisons ne peuvent se faire qu'en se référant à deux systèmes membranaires différents : lysosomes et globules rouges. Par contre, dans chacun des cas, on observe que la teneur en polyphénols est un élément important pour déterminer l'efficacité du vin utilisé. Cela est totalement en faveur de l'hypothèse que les effets protecteurs de membrane du vin sont avant tout dépendant de la teneur de celui-ci en polyphénols.

Un dernier point que nous voudrions aborder brièvement concerne les significations physiologiques et médicales éventuelles de nos observations. Certains vins exercent *in vitro* un effet protecteur des membranes à des concentrations de l'ordre de 0,5 %. Une telle concentration est envisageable, du moins dans le plasma, après une consommation modérée de vin. En effet, les liquides extracellulaires représentent en moyenne 20 % du poids du corps. Pour un homme de 70 Kg, le compartiment liquidien extracellulaire est d'environ 14 litres; une concentration en vin de 0,5 % nécessite donc l'apport de 70 ml de vin. La prise de 250 ml de vin pourrait conduire à une telle concentration pour une efficacité d'absorption de 30 % du vin consommé. En supposant que les composants actifs ne diffusent pas trop rapidement dans les cellules, des effets, au niveau des éléments figurés du sang et des endothéliums vasculaires, pourraient se produire. Rien d'ailleurs n'empêche leur extension à d'autres territoires si un apport régulier de vin approprié dans l'alimentation conduisait à des concentrations efficaces des substances actives du vin dans les tissus. C'est peut-être dans cette optique qu'il faut considérer les observations épidémiologiques montrant un effet favorable du vin dans les maladies cardiovasculaires ischémiques illustrées par le "French paradox".

BIBLIOGRAPHIE

Alberts, B., Broy, D., Lewis, J., Roff, M., Robert, K. and Watson J.D. (1989)

"Molecular Biology of the cell second édition, 275.

Alibrandi, B., Parodi, A., Varaldo, G. (1990)

"Purpura due to ethanol"

The new england journal of medicine, 702.

Biamond, P., Swaak, J.G., Beindorff, C.M. and

Koster, J.F. (1986)

"Superoxyde- dependent and independent mechanisms of iron mobilization from ferritine by xanthine oxydase"

Biochem. J., 239, 169-173.

Bindoli, A., Valente, M. and Cavallini, L.

(1988) "Inhibitory action of quercetin on xanthine oxidase and xanthine déshydrogénase activity",

Pharmacol. Res. Commun 17: 831-839.

Blaich, R., Bochmann, O. and Stein, U. (1982)

"Botrytis cinerea in grapevine"

Bull. OEPP., 2, 167-170.

B.N. (1994), "Le vin améliore-t-il la

circulation?", médecine/sciences, 10, 478-479.

Caen, J. 1992. "Vins et Vaisseaux: y a-t-il un paradoxe?", revue groupe impact médecin.

Canada, A.I., Giannella, E., Nguten, T.D. and

Mason, R.P. (1990) "Inhibition of mitochondrial respiration and production of toxic oxygen radicals by flavonoïds"

Free radicals Biology and medicine, 9, 441-449.

Franfel, E.N., Kanner, J., German, J.B., Parks, E., Kinsella, J.E. (1993), "Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine.", *the Lancet*, 341, 454-457.

Forster, S. and Lloyd, J.B. (1988), "Solute translocation across the mammalian lysosome membrane", *Biochim. Biophys. Acta*, 47, 412-426.

Freeman, B.A. and Crapo, J.D. (1982), "Free radicals and tissue injury", *Lab. invest.*, 47, 412-426.

Gurr, M.I., Segall, J.J., Barnard, M.J., Linter, S.P.K. and Nestle, M. (1992) "Wine and coronary heart disease", *the lancet*, 340, 313-315.

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1984) "Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease", *Biochem. J.*, 219, 1-13.

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1986) "Iron and free radical reactions: two aspects of antioxidant protection", *Trends Biochem. Sci.*, 11, 372-375.

Havsteen, B. (1983), "Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency", 32, 1141-1148.

Ingham, J.L. (1976), "3,5,4'-trihydroxystilbene as a phytoalexin from groundnuts", *Phytochemistry*, 15(11), 1791-1793.

Kimura, Y., Okuda, H. and Arichi, S. (1985), "Effects of stilbènes on arachidonate metabolism in leucocytes, *Biochim. Biophys. Acta*, 834(2) 275-278.

Langcake, P. (1981), "Disease resistance of vitis SPP and the production of the stress metabolites resveratrol epsilon-viniferin, alpha-viniferin-and pterostilbène", *Physiol. Plant. Pathol.* 18 (2), 213-226.

Laparra, J., Michaud, J., Lesca, M.F., Blanquet, P. et Masquelier, J. (1978), "étude pharmacocinétique des oligomères totaux du raisin", *Acta therapeutica*, 4, 223-246.

Masquelier, J., Michaud, J., Laparra, J., Duman, M.C. (1979), "Flavonoïdes et Pycnogénols", *Journal inter. de vitaminologie et Nutr.*, 3, 307-311.

Massey, K.D. and Burton, K.P. (1990), "Free radical damage in neonatal rat cardiac myocyte cultures: effects of α -tocophérol, trolox and phytol", *Free radical Biology and medicine*, 8, 449-458

Michaud, J. et Masquelier, J. (1973), "Quelques aspects nouveaux de la connaissance des tanins catéchiques, leurs relations avec la vitamine C2(p)", *Prod. et Prob. Pharm.*, 38, 449-511.

Michaud, M.M.J., Lagaze, P. et Masquelier, J. (1971) "Fractionnement des oligomères flavanoliques du raisin", *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 110, 111-116.

Miranda, J., Laughon, Halliwell, B., Evans, P.J. and Hault, J.R. (1989), "Antioxydant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, Gossypol and Myricetin", *Biochemical pharmacology*, 38, 2859-2865.

Pincemail, J., Deby, C., Drieu, K., Anton, R. and Goutier, R. (1990), "Flavonoïdes as antioxydants" *Flavonoïdes in Biology et medicine 3: current issues in Flavonoïdes research*, 161-179.

Pryor, W.A. (1976), "The role of free radical reactions in biological system"., Free radical in biology, 1, 240-250, edited by Pryor, W.A.

Renaud, S. and De Lorgeril, M. (1992), "Wine, alcohols, platelets and the French Paradox for Coronary heart disease", the Lancet, 339, 1523-1526.

Rimm, E.B., Giovannucci, E.L., Willett, W.C., Colditz, G.A., Ascherio, A., Rosner, B. and Stampfer, M.J. (1991) "Prospective study of alcohol consumption and risk of coronary disease in men", the lancet, 338, 464-468.

Robak, J. and Gryglewski, R.J. (1988), "Flavonoïds are scavenger of superoxide anions", Biochem. Pharm. 37, 837-41.

Seineur, M., Bonnet, J., Dorion, B., and Bricaud, H., (1992), "Effect of white and red wine on platelet function", Service de clinique medicale cardiologique, 215-221.

Sharp, D. (1993), "Coronary disease when whine is red", the lancet, 341, 27-28.

Siemann, E.H. and Creasy, L.L. (1992), "Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine", Am. J. Enol. Vitic., 43, 49-53.

Shneider, D.L, Burnside, J., Gorga, F.R; Nettleton, C.J. (1978), "Properties of the membrane proteins of rat liver lysosomes", Biochem. J, 176, 75-82.

Suh2, Shaten, B. J. , Cutler, J. A. , Kuller, L. H. (1992)
"Alcohol use and mortality from coronary heart
disease: the role of high-density lipoprotein
cholesterol", Ann. intern. med., 116, 881-887.

Watanabe, H. , Kobayashi, A. , Yamamoto, T. , Suzuki, S. ,
Hayashi, H. and Yamazaki, N. (1990), "Altérations of
human erythrocyte membrane fluidity by oxygen-
derived free radicals and calcium", Free radical
biology and medecine, 9, 507-514.

Yuting, C. , Zheng, R. , Zhongjian, J. , and Yong, J. (1990)
"Flavonoids al scavenger of anion superoxyde and
antioxydants", Free radicals in Biology and
Medecine, 9, 19-21.