

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE
LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE
EL-HARRACH - ALGER

T H E S E

Présentée par A. AMMOUCHE

en vue de l'obtention du titre de Docteur d'Etat ès-Sciences
en Agronomie option : Sciences Alimentaires.

**MODULATION DES ACTIVITES ENZYMATIQUES MEMBRANAIRES
PAR LES ACIDES GRAS POLYINSATURES ALIMENTAIRES
CHEZ LE RAT EN CROISSANCE.**

Soutenue publiquement le 12 septembre 1995 devant la commission d'examen
composée de:

Président : Mr. B. AZZOUT
Rapporteur : Mr. J. M. BOURRE
Rapporteur : Mr. A. YOUYOU
Examineur: Mr. H. AIT - AMAR
Examineur: Mr. G. AYAD
Examineur: Mme D. SADOULI

SOMMAIRE

	Pages
AVANT-PROPOS	
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	
ABREVIATIONS	
NOMENCLATURE DES ACIDES GRAS A LONGUE CHAINE ET DES ENZYMES	
INTRODUCTION	1
I. Importance physiologique des AGPI.....	2
I.1. Rôle structural	3
I.2. Synthèse et rôle des eicosanoïdes	3
I.2.1. Synthèse des eicosanoïdes	5
I.2.1.1. Voie de la cyclo-oxygénase	5
I.2.1.2. Voie de la 5-lipoxygénase	7
I.2.2. Rôle des eicosanoïdes	7
I.2.3. Equilibre 20:4 n-6/20:5 n-3.....	7
I.3. Physiopathologie des déséquilibres n-6 et n-3.....	9
I.4. Besoins alimentaires en acides gras essentiels	10
II. Métabolisme des AGPI chez les mammifères	11
II.1. Biosynthèse des acides gras à longue chaîne	11
II.2. Elongation	12
II.2.1. Elongation mitochondriale	12
II.2.2. Elongation microsomale.....	12
II.3. Désaturations	14
II.4. Rétroconversion	16
III. Structure et rôle des membranes biologiques.....	18
III.1. Modèle de Singer et Nicholson	18
III.2. Fonctions	20
III.3. Structure des phospholipides	20
III.4. Organisation supra-moléculaire	22

III.4.1. Hétérogénéité transversale	24
III.4.2. Hétérogénéité latérale	24
III.4.2.1. Domaine membranaire	25
III.5. Organisation sub-macroscopique et moléculaire.....	25
III.5.1. Caractéristiques des AGPL.....	25
III.5.2. Notion d'espèces moléculaires et phospholipides.....	26
III.5.3. Ordre et mouvement des chaînes d'acides gras.....	27
III.5.4. Influence de la matrice lipidique sur les propriétés structurales et l'activité des protéines.....	27
III.6. Fluidité membranaire	29
IV. Métabolisme des phospholipides	30
IV.1. Synthèse <i>de novo</i> des phospholipides	30
IV.2. Réappariement des chaînes grasses	30
V. Enzymes membranaires	32
V.1. 5'-nucléotidase	33
V.2. Monooxygénases à fonction mixte.....	33
V.3. Nucléoside triphosphatase	39
MATERIEL ET METHODES	44
I. MATERIEL	44
I.1. Animaux et régimes alimentaires.....	44
II. METHODES.....	47
II.1. Préparations des microsomes.....	47
II.2. Préparation des noyaux et des membranes nucléaires hépatiques.....	49
II.2.1. Préparation des noyaux.....	49
II.2.2. Préparation des membranes nucléaires.....	49
II.3. Dosage des protéines.....	50
II.4. Dosage des acides gras par CPG	50
II.5. Dosage des activités enzymatiques	52
II.5.1. 5'-nucléotidase	52
II.5.2. Nucléoside triphosphatase.....	52
II.5.3. Monooxygénases à fonction mixte	53

II.5.3.1. Cytochrome P-450 et cytochrome b ₅	53
II.5.3.2. NADPH-cytochrome c réductase	54
II.5.3.3. NADH-cytochrome b ₅ réductase.....	54
II.5.3.4. Aminopyrine N-déméthylase.....	55
II.5.3.5. Aniline hydroxylase.....	56
ANALYSES STATISTIQUES DES RESULTATS.....	56
RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	57
I. Influence des régimes alimentaires sur la composition en acides gras des microsomes cérébraux et hépatiques de rats.....	58
I.1. Composition en acides gras des microsomes cérébraux.....	58
I.2. Composition en acides gras des microsomes hépatiques	62
I.3. Conclusion.....	66
II. Evolution de l'activité spécifique de la 5'AMPase dans les microsomes cérébraux et hépatiques de rats en fonction des régimes alimentaires et de l'âge.....	67
II.1. Evolution de l'activité spécifique de la 5'AMPase dans les microsomes cérébraux...	67
II.2. Evolution de l'activité spécifique de la 5'AMPase dans les microsomes hépatiques..	67
II.3. Conclusion.....	71
III. Influence des régimes alimentaires et de l'âge sur les activités des monooxygénases à fonction mixte.....	74
III.1. NADH cytochrome b ₅ réductase.....	74
III.2. NADPH cytochrome c réductase	74
III.3. Cytochrome b ₅	75
III.4. Cytochrome P-450.....	76
III.5. Aniline hydroxylase.....	76
III.6. Aminopyrine N-déméthylase.....	77
III.7. Conclusion.....	80
IV. Influence des régimes alimentaires sur la composition en acides gras des membranes nucléaires et sur l'activité spécifique de la NTPase.....	82
IV.1. Observation en microscopie électronique des noyaux et des membranes nucléaires hépatiques.....	82
IV.2. Composition en acides gras des membranes nucléaires hépatiques.....	82

IV.3. Evolution de l'activité spécifique du NTPase dans les membranes nucléaires	88
IV.4. Conclusion	91
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....	92
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	94-
ANNEXES.....	129

S U M M A R Y

The aim of this study was to specify the consequences of the fat-free diet and different dietary polyunsaturated fatty acids, in particular (n-6) and (n-3) series on the fatty acid composition of liver and brain microsomal and nuclear membrane, and enzymatic activities (5'-AMPase, NTPase, and mixed function oxidase system).

This study was performed on male weanling rats of the Sprague Dawley strain in development. In term of this experimental period, the results shows that.

The fat-free diet induced an increase in oleic serie, particulary 18:1 n-9 and 20:3 n-9 acids, and a significantly decrease of the sum (n-6 + n-3) fatty acids.. In parallel, the specific activities of 5'-AMPase, NADPH cytochrome c reductase, and cytochrome P-450 concentration were significantly reduced in the hepatic microsomes of rats. In contrary, the specific activities of NADH cytochrome b₅ reductase and cytochrome b₅ content were significantly elevated. As, the specific activity of NTPase was significantly increased in nuclear membranes.

The sunflower-oil diet involved high level of n-6 serie fatty acids, particulary, 20:4 n-6, and a significantly decrease of n-3 serie fatty acids. The specific activities were not affected, except for NADH cytochrome c reductase which was significantly reduced in the hepatic microsomes.

The fish-oil diet induced high level of n-3 serie fatty acids, essentially 20:5 n-3 and 22:6 n-3 acids, and a significantly decrease of n-6 serie fatty acids. The specific activities of 5'AMPase, NADPH cytochrome c reductase, aminopirine N-demethylase, aniline hydroxylase, and the amount of cytochrome P-450 were significantly enhanced. However, the amount of cytochrome b₅ and the specific activity of NTPase were significantly reduced.

The overall data shores the modulation hypothesis of membranes enzymatic activities by the polyunsaturated fatty acids, which seem to act straighly on physico-chemical properties of biological membranes.

Key words. Diets, rats, PUFA, microsomes, nuclear membranes, (5'AMPase), (NTPase), mixed function oxydase system (MFO).

RESUME

L'objectif de cette étude est de préciser les conséquences d'une carence ou d'une surcharge alimentaire en acides gras polyinsaturés des séries n-6 et n-3 sur la composition en acides gras des lipides totaux des microsomes cérébraux, hépatiques et des membranes nucléaires du foie de rat et sur les activités enzymatiques membranaires, en particulier, la 5'-nucléotidase (5'AMPase), la nucléoside triphosphatase (NTPase) et les monooxygénases à fonction mixte (MFO).

Cette étude a été réalisée sur des lots de rats mâles de souche (Sprague Dawley) en croissance. Au terme de cette période expérimentale, les principaux résultats obtenus montrent que:

Le régime lipidoprive induit une augmentation du taux des acides gras de la série oléique, particulièrement le 18:1 n-9 et le 20:3 n-9 et une réduction significative du taux des AGPI (n-6 + n-3) dans les membranes microsomales et nucléaires hépatiques. Parallèlement, les activités spécifiques de la 5'AMPase, du NADPH cytochrome c réductase, et de la teneur en cytochrome P-450 sont réduites de façon très significative. En revanche, les activités spécifiques du NADH cytochrome b₅ réductase, et la teneur en cytochrome b₅ sont augmentées de manière significative dans les membranes microsomales hépatiques. De même, l'activité spécifique du NTPase est augmentée de manière significative dans les membranes nucléaires hépatiques.

Le régime tournesol entraîne une augmentation des acides gras polyinsaturés de la série n-6, particulièrement le 20:4 n-6 et une réduction des acides gras de la série n-3. Les activités enzymatiques sont peu ou pas affectées à l'exception de NADH cytochrome b₅ réductase qui est réduite significativement dans les microsomes hépatiques.

Le régime poisson induit une augmentation significative des acides gras polyinsaturés de la série n-3, notamment le 20:5 n-3 et le 22:6 n-3 et une réduction des acides gras de la série n-6. Les activités spécifiques de la 5'AMPase, de NADPH cytochrome c réductase, de l'aminopyrine N-déméthylase, de l'aniline hydroxylase et de la teneur en cytochrome P-450 sont augmentées significativement par rapport aux témoins, alors que la teneur en cytochrome b₅ et l'activité spécifique du NTPase sont réduites de façon significative.

L'ensemble de ces résultats étayent l'hypothèse d'une modulation des activités enzymatiques membranaires par les AGPI, qui semblent agir directement sur les propriétés physico-chimiques des membranes biologiques.

Mots clés: Régimes, rats, AGPI, microsomes, membranes nucléaires, 5'AMPase, NTPase, Monooxygénase à fonction mixte (MFO).