

# EFFETS DU VIN SUR LES MEMBRANES CELLULAIRES ET ENDOCELLULAIRES *IN VITRO*

## EFFECTS OF WINE ON CELLULAR AND ENDOCELLULAR MEMBRANES *IN VITRO*

R. WATTIAUX\*, Kathy JAWORSKI et Simone WATTIAUX-De CONINCK

Laboratoire de Chimie Physiologique, Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix  
61, rue de Bruxelles, 5000 Namur, Belgique

**Résumé :** Nous avons recherché l'effet du vin sur l'intégrité de la membrane des lysosomes et de la membrane des globules rouges. Nos résultats montrent que de faibles concentrations de vin rouge protègent la membrane des lysosomes contre les détériorations induites par un système générateur de radicaux libres de l'oxygène et s'opposent à l'hémolyse produite par la phospholipase C. Le vin blanc est considérablement moins efficace. Il est probable que les effets protecteurs du vin sur les membranes biologiques que nous avons observés proviennent des composés phénoliques présents dans cette boisson.

**Summary :** Several observations suggest that wine consumption could have beneficial effects on health by preventing cardiovascular diseases. Apparently, ethanol is not the only component responsible for these effects, phenolic substances: tanins, flavonoids may have an important role. As these compounds are able to affect biological membranes, we investigated the effect of wine *in vitro* on two model membranes: the lysosomal membrane and the red cell membrane. The integrity of rat liver lysosomal membrane was assessed by measuring the latency of N-acetylglucosaminidase, a lysosomal enzyme, when the organelles are subjected to free radicals of oxygen in the presence of different concentrations of wine. The state of red cell membrane was followed by determining hemolysis caused by phospholipase C. Our results show that low concentrations of red wine prevent the deterioration of the membrane of lysosomes induced by oxygen free radicals generated by the xanthine-xanthine oxidase system and oppose hemolysis induced by treating red cells with *Clostridium welchii* phospholipase C. White wine is considerably less efficient. As similar effects can be obtained with some phenolic compounds, it is probable that the membrane protective effects of red wine that we describe, originate from its content in these substances.

**Mots-clés :** lysosome, vin, radicaux libres, hémolyse

**Key-words :** lysosome, wine, free radicals, hemolysis

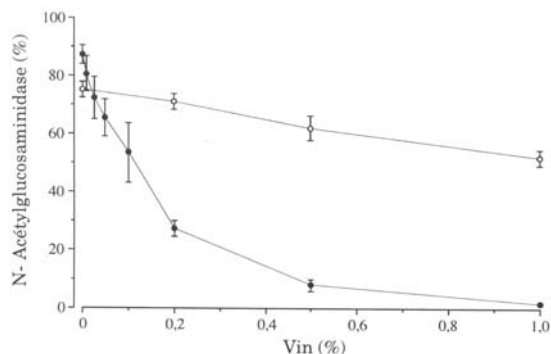
## INTRODUCTION

La perméabilité des membranes cellulaires et endocellulaires est altérée par divers types de traitements physicochimiques. L'effet de tels traitements peut être atténué par des composés qui fonctionnent comme des protecteurs de membrane. Deux types de membrane se prêtent assez facilement à l'expérimentation *in vitro* dans ce domaine : la membrane plasmique des globules rouges et la membrane lysosomale. Dans le premier cas, l'altération membranaire est suivie par la mesure de l'hémolyse, dans le second cas, par la perte de latence des enzymes de l'organite (de DUVE *et al.*, 1962). Etudiant l'action de produits naturels sur ces membranes *in vitro*, nous avons eu la curiosité de rechercher si le vin exerçait un effet sur celles-ci lorsqu'elles sont soumises à des agressions susceptibles de les léser. Cette démarche est basée sur le fait que des observations suggèrent que la consommation modérée de vin a un effet

bénéfique en pathologie cardiovasculaire (SEIGNEUR *et al.*, 1990) et pourrait être un des facteurs responsables du paradoxe français, celui-ci rend compte d'une compatibilité apparente entre une consommation élevée de graisses et un faible risque de troubles ischémiques coronaires (RENAUD et de LORGERIL, 1992). Un effet du vin sur les membranes biologiques est susceptible d'être à la base de l'action bénéfique de cette boisson. Nos résultats montrent que le vin rouge à faible concentration, s'oppose à la détérioration de la membrane des lysosomes provoquée par les radicaux libres oxygénés et à l'hémolyse induite par la phospholipase C.

## MÉTHODES

Les expériences sur les lysosomes ont été réalisées sur des fractions mitochondriales légères (fractions L) préparées suivant la méthode de de DUVE *et al.* (1955)



**Fig.1 - Effet du vin sur l'activité libre de la N-acétylglucosaminidase de préparations de lysosomes hépatiques**

(fractions L de de DUVE *et al.* (1955) exposées pendant 20 min à 37°C, à un système générateur de radicaux libres. Le milieu est composé de Tris-HCl 0,01 M pH 8, saccharose 0,25 M, xanthine 0,5 mM, ADP 2 mM, FeCl<sub>3</sub> 0,2 mM, xanthine oxydase 18 mU et de vin rouge (cercles pleins) ou de vin blanc (cercles vides) aux concentrations indiquées en abscisse. En ordonnée, l'activité libre de la N-acétylglucosaminidase en pourcentage de l'activité totale. Les valeurs sont les moyennes de trois expériences accompagnées de leur déviations standard.

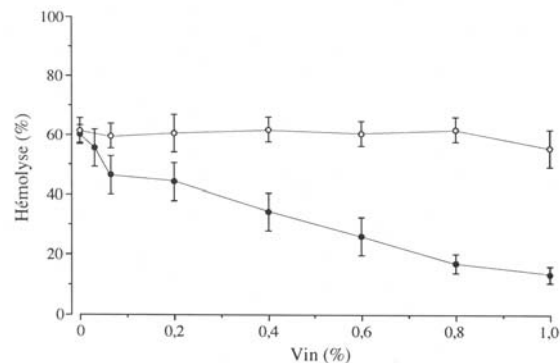
**Fig. 1 - Effect of wine on N-acetylglucosaminidase free activity of liver lysosomes**

(L fraction of de DUVE *et al.* (1955). Granule preparations were incubated for 20 min at 37°C, in presence of a free radicals generating system consisting of 0.01M Tris-Hcl, pH 8, 0.25 m sucrose, 0.5 mM xanthine, 2 mM ADP, 0.2 mM FeCl<sub>3</sub>, 18 mU xanthine oxidase and red wine (closed circles) or white wine (open circles). Ordinate: free activity of N-acetylglucosaminidase given as percentage of total activity. Abscissa: wine concentration (w/v). Means for three experiments + SD were presented.

à partir du foie de rat. Les granules ont été soumis aux effets d'un système enzymatique producteur de radicaux libres comme le décrivent DECHARNEUX *et al.* (1992). Les expériences d'hémolyse ont été faites sur des globules rouges de sang humain isolés par centrifugation et lavés dans une solution isotonique de NaCl. Les globules ont été mis en présence de phospholipase C de *Clostridium welchii* comme nous le décrivons brièvement dans la légende de la figure 2. Les mesures d'activités libre et totale de la N-acétylglucosaminidase ont été effectuées suivant JADOT *et al.* (1989). Les composés phénoliques totaux ont été mesurés par la méthode de SINGLETON et ROSSI (1965).

## RÉSULTATS

La membrane des lysosomes est sensible aux radicaux libres oxygénés. On peut s'en rendre compte en mesurant l'activité libre d'une hydrolase lysosomale, la N-acétylglucosaminidase par exemple, d'une préparation de granules mise en présence d'un système générateur de radicaux libres oxygénés (xanthine oxydase, xanthine, Fe ADP). On constate une augmentation considérable de l'activité libre de l'enzyme au cours du



**Fig. 2 - Effet du vin sur l'hémolyse produite par la phospholipase C**

Les globules rouges sont incubés pendant 40 min à 37°C en présence de Tris-HCl 0,05 M pH 7,4, saccharose 0,25 M, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, phospholipase C 25 mU et de vin rouge (cercles pleins) ou de vin blanc (cercles vides) aux concentrations indiquées en abscisse. L'hémolyse totale est obtenue par addition de Triton X-100 à 0,1 %. Les valeurs sont les moyennes de trois expériences accompagnées de leurs déviations standard.

**Fig. 2 - Effect of wine on hemolysis induced by phospholipase C**

Red cells were incubated during 40 min at 37°C in a medium consisting of 0.05 M Tris-Hcl, pH 7.4, 0.25 M sucrose, 5mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mU phospholipase C and red wine (closed circles) or white wine (open circles). Total hemolysis was obtained by adding 0.1 % Triton X-100. Means for three experiments +SD were presented.

temps, indiquant que la barrière de perméabilité existant entre l'enzyme intralysosomale et son substrat exogène est supprimée (DECHARNEUX *et al.*, 1992). Lorsqu'un tel traitement des lysosomes est réalisé en présence de vin rouge, on observe une profonde inhibition du phénomène (figure 1), un effet protecteur de la membrane lysosomale très significatif est déjà manifeste pour une concentration en vin rouge dans le milieu de 0,1 p. cent, l'activité libre de la N-acétylglucosaminidase étant tombée de 85 à 55 p. cent de l'activité totale. Une protection quasi totale des lysosomes est obtenue à une concentration en vin de 0,5 p. cent. L'effet protecteur est nettement moins marqué en présence de concentrations semblables de vin blanc. Nous avons trouvé que l'éthanol, à des concentrations comparables à celles apportées par le vin dans nos expériences n'affectait pas la réponse des lysosomes aux radicaux libres oxygénés. L'effet décrit n'est pas non plus dû à une inhibition ou à une inactivation par le vin de la xanthine oxydase, l'enzyme responsable de la production de radicaux libres dans nos expériences. En effet, la production d'acide urique, à partir de xanthine, provoquée par l'enzyme, n'est pas modifiée par la présence du vin. De plus, une protection de la membrane

lysosomale par le vin s'observe également quand un système non enzymatique producteur de radicaux libres est utilisé.

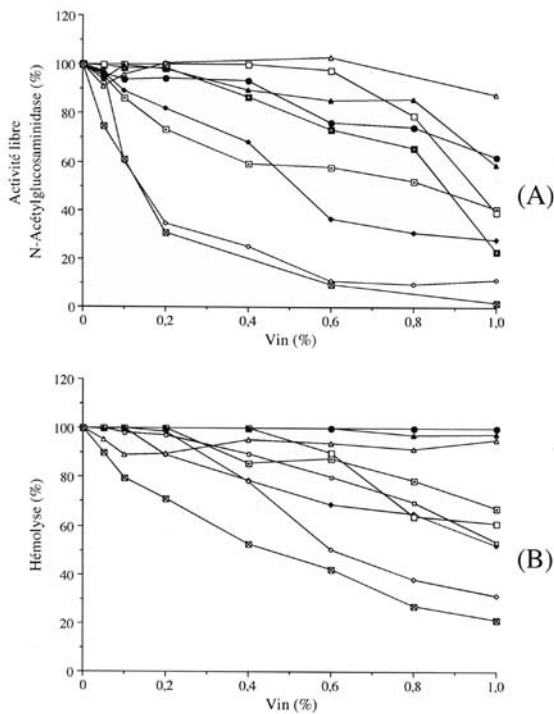
Nous avons mis en évidence un effet semblable du vin lors d'une agression toute différente d'une membrane biologique conduisant à sa détérioration. Il s'agit de l'hémolyse induite par une phospholipase, dans nos expériences, la phospholipase C de *Clostridium welchii*. L'incubation de globules rouges en présence de phospholipase C provoque une hémolyse progressive au cours du temps. Ce phénomène est inhibé par l'addition de vin rouge au milieu d'incubation (figure 2). Les concentrations efficaces sont du même ordre de grandeur que celles utilisées dans les expériences sur les lysosomes décrites ci-dessus. Le vin blanc est inactif dans les mêmes conditions. L'effet du vin rouge n'est pas dû à une inhibition ou à une inactivation de la phospholipase C, nous avons trouvé que

celle-ci garde sa capacité d'hydrolyser la lécithine en présence de vin rouge.

L'effet de neuf vins différents sur les lysosomes soumis à un stress oxydatif et les globules rouges traités à la phospholipase C est repris à la figure 3. Les résultats montrent d'abord que des différences sensibles existent entre différents vins quant à leur pouvoir de protéger les deux types de membrane contre les agressions qu'elles subissent. D'autre part, ils illustrent que les vins les plus efficaces pour protéger les lysosomes contre les radicaux libres sont également les plus efficaces pour inhiber l'hémolyse induite par la phospholipase C. L'importance de la teneur en composés phénoliques de ces vins est illustrée à la figure 4. Elle montre la concentration des différents vins testés nécessaire pour obtenir une réduction de 50 p. cent de la libération de la N-acetylglucosaminidase par les radicaux libres de l'oxygène en fonction de la teneur en composés phénoliques de ces vins. Il est manifeste que plus la concentration en phénols est élevée plus la quantité de vin requise pour protéger la membrane lysosomale est faible.

## DISCUSSION

Nos résultats montrent que le vin rouge est capable de protéger *in vitro*, des membranes biologiques soumises à des agressions conduisant à leur détérioration. L'éthanol n'est pas responsable de ce phénomène. Il est vraisemblable que l'effet exercé sur la membrane lysosomale lésée par les radicaux libres oxygénés est dû aux composés phénoliques : flavonoïdes, catéchines, présents dans le vin rouge, qui sont doués de propriétés antioxydantes (ROBAK et GRYGLEWSKI, 1988 ; SICHEL *et al.*, 1991) et sont capables de protéger la membrane des lysosomes contre les radicaux libres (DECHARNEUX *et al.*, 1992). Il a d'autre part été démontré que les substances phénoliques du vin inhibaient l'oxydation catalysée par  $Cu^{++}$  des lipoprotéines sériques humaines de faible densité (FRANKEL *et al.*, 1993). Le problème est différent dans le cas de la protection des globules rouges traités à la phospholipase C, la détérioration membranaire est due ici à l'hydrolyse des lipides. Or, nous avons vu que le vin n'inhibait pas la phospholipase C. Dès lors, son action doit se situer au niveau de la membrane globulaire, les composés actifs du vin, en se fixant sur la membrane, soit empêchent un accès adéquat de l'enzyme aux phospholipides membranaires soit s'opposent à la déstabilisation de la membrane provoquée par l'enlèvement des têtes polaires. Quels sont ces composés ? On peut penser qu'il s'agit également des phénols. En effet, récemment nous avons trouvé que la quercétine était capable d'inhiber l'hémolyse induite par la phospholipase C, toutefois la catéchine est inefficace.

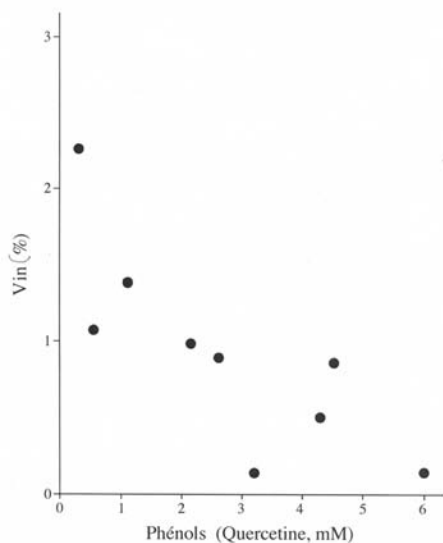


**Fig. 3 - Effet de 9 vins rouges différents sur la membrane de lysosomes soumis à un stress oxydatif (A) et sur l'hémolyse induite par la phospholipase C (B).**

Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles signalées dans les légendes des figures 1 et 2. Pour faciliter les comparaisons, une valeur de 100 % a été attribuée à l'activité libre de la N-acetylglucosaminidase et à l'hémolyse observées en absence de vin. Les chiffres concernant chaque vin sont affectés du même sigle dans les deux expériences.

**Fig. 3 - Effect of 9 different red wines on membrane of lysosomes subjected to an oxidative stress (A) and on hemolysis induced by phospholipase C (B).**

For the experimental conditions, see legends of figures 1 and 2. A value of 100 % has been attributed to the free activity of N-acetylglucosaminidase and to hemolysis observed without wine addition. The same symbols have been used for each wine in the two experiments.



**Fig. 4 - Effet de la concentration en phénols des vins sur la membrane des lysosomes soumis à un stress oxydatif.**

Les valeurs sont tirées de l'expérience rapportée à la figure 3 (A). Ordonnée : concentration en vin (%) nécessaire pour obtenir une réduction de 50 % de la libération de la N-acetylglucosaminidase. Abscisse : concentration en phénols des différents vins exprimée en équivalents de quercétine (mM).

**Fig. 4 - Effect of wine total phenol concentration on lysosomes subjected to an oxidative stress.**

Values originate from experiment reported in figure 3(A). Ordinate: wine concentration (%) required to observe a 50 % reduction of N-acetylglucosaminidase release. Abscissa: total phenol concentration of the different wines expressed in quercetine equivalents.

Un dernier point que nous voudrions aborder brièvement concerne la signification physiologique et médicale éventuelle de nos observations. Certains vins exercent *in vitro* un effet protecteur des membranes modèles que nous avons utilisées, à des concentrations de l'ordre de 0,5 p. cent. Une telle concentration est envisageable, du moins dans le plasma, après une consommation modérée de vin. Pour un homme de 70 kg, le volume du plasma est d'environ 3.5 l. Pour y retrouver une concentration en vin de 0,5 %, un apport de 18 ml de vin est nécessaire. La prise de 180 ml de vin (plus ou moins deux verres) pourrait conduire à une telle concentration en supposant une efficacité d'absorption de 10 p. cent des composés actifs. En supposant qu'ils ne diffusent pas trop rapidement, ceux-ci seraient capables d'agir au niveau des membranes des éléments figurés du sang et des endothélium vasculaires.

## RÉFÉRENCES

- DECHARNEUX TH., DUBOIS F., BEAULOYE C, WATTIAUX-DE CONINCK S. and WATTIAUX R. 1992. Effect of various flavonoids on lysosomes subjected to an oxidative or an osmotic stress. *Biochem. Pharmacol.*, **44**, 1243-1248.
- DE DUVE C., PRESSMAN B.C., GIANETTO R., WATTIAUX R. and APPELMANS F., 1955. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution pattern of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem. J.*, **60**, 604-617.
- DE DUVE C., WATTIAUX R. and WIBOM M., 1962. Effects of fat-soluble compounds on lysosomes *in vitro*. *Biochem. Pharmacol.*, **9**, 97 - 116.
- FRANKEL E. N., KANNER J., GERMAN J.B., PARKS E. and KINSELLA J.E. 1993. Inhibition of oxidation of human low - density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet*, **341**, 454 - 457.
- JADOT M., WATTIAUX-DE CONINCK S. and WATTIAUX R., 1989. The permeability of lysosomes to sugars. Effect of diethylstilbestrol on the osmotic activation of lysosomes induced by glucose. *Biochem. J.*, **262**, 981-984.
- RENAUD S. and de LORGERIL M., 1992. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, **339**, 1523-1526.
- ROBAK J. and GRYGLEWSKI R.J. 1988. Flavonoids are scavengers of superoxides anions. *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 837-841.
- SEIGNEUR M., BONNET J., DORIAN B., BENCHIMOL D., DROUILLET F., GOUVERNEUR G., LARRUE J., CROCKETT R., BOISSEAU M.R., RIBÉREAU-GAYON P. and BRICAUD H., 1990. Effect of the consumption of alcohol, white wine and red wine on platelet function and serum lipids. *J. Appl. Card.*, **5**, 215-222.
- SICHEL G., CORSARO C., SCALIA M., DI BILIO A.J. and BONOMO R.P., 1991. *In vitro* scavenger activity of some flavonoids and melanins against  $O_2^\circ$ . *Free Radical Biol. Med.*, **11**, 1-8.
- SINGLETON S.L. et ROSSI J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic reagent. *Am. J. Enol. Vitic.*, **16**, 144 - 158.

Reçu le 23 juin 2000

accepté pour publication le 10 octobre 2000