

# Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires

Bruno Baudin

Service de biochimie A, hôpital Saint-Antoine, 184, rue du faubourg Saint-Antoine, 75571 Paris Cedex 12  
<bruno.baudin@sat.aphp.fr>

**Résumé.** À l'état physiologique, il existe un équilibre entre la production de radicaux libres dérivés de l'oxygène (ou espèces réactives de l'oxygène, ERO) et les systèmes antioxydants. En pathologie cardiovasculaire, il peut apparaître un déséquilibre provoqué essentiellement par une production exagérée d'ERO à laquelle peut s'associer un déficit des défenses antioxydantes. C'est en particulier ce qui se passe dans le développement de l'athérosclérose, où l'attaque oxydante des LDL les fait capturer par les cellules « éboueurs » (*scavenger*) venant accumuler des lipides dans le sous-endothélium et créer un cœur lipidique dans la plaque athéroscléreuse constituée. Le stress oxydant intervient dans toutes les phases du développement de l'athérosclérose et de multiples manières ; citons les effets mitogéniques des LDL oxydées, les propriétés chimiotactiques et génotoxiques des produits de la peroxydation lipidique, la formation d'*advanced glycation end-products* et la production de monoxyde d'azote. Par ailleurs, le stress oxydant est une conséquence majeure de l'ischémie myocardique, en particulier par activation de la xanthine-oxydase endothéliale ; les ERO formés sont directement incriminés dans les arythmies post-infarctus. Nous assistons depuis plusieurs décennies à la multiplication de méthodes de dosage des marqueurs du stress oxydant, qu'il s'agisse des produits d'oxydation de nature lipidique (malonate-dialdéhyde, 4-hydroxy-nonéanal...), protéique (albumine oxydée) ou nucléotidique (8-hydroxy-désoxyguanosine), des enzymes pro-oxydantes comme la myéloperoxydase, ou encore les enzymes (superoxyde-dismutase, glutathion-peroxydase, catalase...), vitamines (A, E, C) et glutathion de la protection antioxydante. Des études prospectives ont déjà montré l'intérêt de certains de ces marqueurs, en particulier la glutathion-peroxydase, la myéloperoxydase et l'albumine oxydée, dans le diagnostic et le pronostic des syndromes coronaires aigus, de façon indépendante des autres facteurs de risque cardiovasculaires.

**Mots clés :** stress oxydant, antioxydants, athérosclérose, ischémie myocardique

**Abstract. Oxidative stress and cardiovascular pathology.** In the physiological state, anti-oxidant systems can equilibrate the production of free radicals derived from oxygen (or reactive oxygen species, ROS). In cardiovascular pathology, an imbalance can emerge related to the overproduction of ROS with a potential defect in anti-oxidant defences. Such a phenomenon particularly arises during the development of atherosclerosis where oxidized LDL are captured by scavenger cells leading to the accumulation of lipids in sub-endothelium and creating a lipid core in the atherosclerotic plaque. Oxidative stress occurs in all the stages of atherosclerosis development and in many ways; for example through the mitogenic effects of oxidized LDL, by the chemotactic and genotoxic properties of the products of lipoperoxidation, by the formation of advanced glycation end-products and by the production of nitrogen monoxide. Moreover, oxidative stress is a major consequence of myocardial ischemia, in particular by the activation of endothelial xanthine-oxidase; ROS arising from this activation are directly incriminated in post-infarction arrhythmia. In recent decades, many assays for oxidative stress markers have been developed, such as products of oxidization of lipids (malonedialdehyde, 4-hydroxy-nonenal...), proteins (oxidized albumin) or nucleotides (8-hydroxy-deoxyguanosine), also pro-oxidative enzymes (e.g. myeloperoxidase), or enzymes (superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase...), vitamins (A, E, C) and glutathione for anti-oxidant protection. Retrospective studies have shown the interest of some of these markers, in particular glutathione peroxidase, myeloperoxidase and oxidized albumin, for the diagnosis and the prognosis of acute coronary syndromes, independently of other cardiovascular risk factors.

**Key words:** oxidative stress, anti-oxidants, atherosclerosis, myocardial ischemia

mtc

Correspondance : B. Baudin

## Généralités sur le stress oxydant et les protections antioxydantes

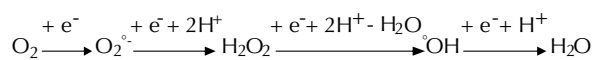
### Production de radicaux libres et systèmes antioxydants

L'oxygène est un gaz indispensable à la vie mais il peut être toxique par lui-même et par la formation de radicaux libres qui ont de nombreux

effets délétères. Les organismes vivant en aérobiose possèdent des systèmes de défense ; ainsi à l'état physiologique il existe un équilibre entre la production des radicaux libres et les systèmes antioxydants. Dans certaines conditions, il apparaît un déséquilibre provoqué par une production exagérée de radicaux libres ou par une diminution des défenses antioxydantes ; on parle alors de stress oxydant à l'origine bien souvent d'altérations

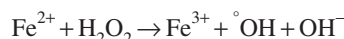
moléculaires participant à la physiopathologie de nombreux processus pathologiques comme l'athérosclérose, l'inflammation, la fibrose, la dégénérescence neuronale...

Une vision simple de la formation des principales espèces activées de l'oxygène est apportée par la chaîne de réduction monovalente de l'oxygène :



L'anion superoxyde ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ) et le radical hydroxyle ( $\text{OH}^{\cdot}$ ) sont des radicaux libres puisqu'ils contiennent chacun un électron célibataire ; à l'inverse le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) n'est pas radicalaire, mais tous trois sont des « espèces réactives de l'oxygène » (ERO) dans le sens où elles peuvent interagir avec des molécules biologiques en les oxydant. Le radical superoxyde est peu réactif par lui-même mais il peut donner naissance à des composés plus réactifs, notamment le radical hydroxyle sous l'action des superoxyde-dismutases (SOD). Les sources de l'anion superoxyde sont multiples : de nombreuses enzymes catalysent la réduction du dioxygène en  $\text{O}_2^{\cdot -}$  comme la NADPH-oxydase, enzyme jouant un rôle clef dans la phagocytose par la production de  $\text{H}_2\text{O}_2$  et HOCl, la xanthine-oxydase qui est activée au cours de la reperfusion après ischémie, l'activité mono-oxygénase du cytochrome P450 dans la membrane du réticulum endoplasmique, aussi la NADH-déshydrogénase du transport électronique dans la membrane interne mitochondriale, et l'hème de l'hémoglobine et de la myoglobine oxydant le  $\text{Fe}^{2+}$  en  $\text{Fe}^{3+}$  pour donner les formes oxydées méthémoglobine et metmyoglobine. Les radicaux hydroxyles proviennent essentiellement de la réaction de Fenton qui implique le peroxyde d'hydrogène et des métaux réducteurs libres de leurs complexes protéiques, en particulier

$\text{Fe}^{2+}$  complexé au citrate ou à l'ATP selon :

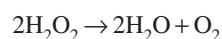


Les autres sources de radical hydroxyle sont les radiations ionisantes, le rayonnement ultra-violet et les ultrasons. Enfin les autres radicaux libres et ERO sont le monoxyde d'azote ( $\text{NO}^{\cdot}$ ), synthétisé à partir de l'arginine sous l'action de NO-synthases et source de peroxy-nitrites par interaction avec l'anion superoxyde, ainsi que les radicaux hydroperoxyde ( $\text{HO}_2^{\cdot}$ ), peroxyde ( $\text{RO}_2^{\cdot}$ ) et alcoxyde ( $\text{RO}^{\cdot}$ ) qui apparaissent dans les réactions d'attaque oxydante par les ERO précédents, ce qui est la base des réactions en chaîne du stress oxydant.

Les systèmes de défenses antioxydantes comportent des enzymes et des vitamines spécifiques (essentiellement E et C) ; ils comportent également des protéines qui agissent indirectement, comme les protéines vectrices du fer et du cuivre, ainsi que des petites molécules biologiques dont ce n'est pas la principale fonction, comme l'acide urique et la bilirubine, sans oublier le glutathion qui est au cœur des défenses antioxydantes. Les systèmes enzymatiques sont au nombre de trois et ils fonctionnent en complémentarité. La Cu/Zn-SOD, chez l'homme, existe sous deux formes, l'une cytosolique et l'autre extra-cellulaire ; la première, codée par le gène SOD-1, est ubiquitaire et dimérique (32 kDa), la seconde est tétramérique (135 kDa) et sa synthèse est mal connue. Toutes les sous-unités portent un ion  $\text{Zn}^{2+}$ , non catalytique, et un ion  $\text{Cu}^{2+}$  responsable de l'activité SOD, c'est-à-dire la dismutation de l'anion superoxyde selon :



Une troisième forme est mitochondriale et dans son site actif on trouve du manganèse (Mn-SOD) ; c'est une protéine importée du noyau (gène SOD-2), on ne la trouve donc pas dans les hématies ; son activité catalytique est identique à celles des Cu/Zn-SOD. Un autre rôle des SOD est de régénérer la vitamine C. On voit que l'action antioxydante des SOD est incomplète car en éliminant l'anion superoxyde, elles produisent du peroxyde d'hydrogène. Les deux autres systèmes enzymatiques antioxydants ont pour rôle d'éliminer le peroxyde d'hydrogène dont celui produit par les SOD : la glutathion-peroxydase et la catalase. La catalase est localisée dans les peroxysomes et les hématies ; c'est une enzyme tétramérique et héminique capable d'éliminer  $\text{H}_2\text{O}_2$  *in situ* selon :

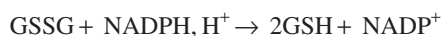
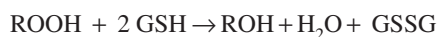


Cependant 85 % de l'activité peroxydasique sont portés par les peroxydases, et chez l'homme tout particulièrement les glutathion-peroxydases (GPX). Il y aurait plusieurs gènes GPX mais l'existence de formes intra- et extra-cellulaires serait essentiellement due à des modifications post-transcriptionnelles et post-traductionnelles. Dans le plasma, on trouve une forme très glycosylée qui viendrait du foie. Toutes ces enzymes sont homo-tétramériques et séléno-dépendantes, c'est-à-dire qu'elles

### Abréviations

OH : radical hydroxyle  
 8-OH-dG : 8-hydroxy-désoxyguanosine  
 AGE : *advanced glycation end-products*  
 AGPI : acides gras polyinsaturés  
 ERO : espèces réactives de l'oxygène  
 GPX : glutathion-peroxydases  
 HPETE : acides hydroperoxy-éicotétraénoïques  
 HPODE : acides hydroxy-octadécadiénoïques  
 LOX : lipo-oxygénases  
 MDA : malonate-dialdéhyde  
 NO : monoxyde d'azote  
 R : radical acide gras  
 RAGE : récepteur aux AGE  
 $\text{RO}_2$  : radical peroxyde  
 RPE : spectroscopie de résonance paramagnétique  
 SOD : superoxyde-dismutases  
 XDH : xanthine déshydrogénase  
 XO : xanthine oxydase

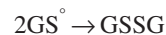
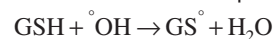
contiennent dans leur site actif un atome de sélénium (Se) à la place d'un soufre cystéinique. Le glutathion (GSH) est un substrat obligatoire, le deuxième substrat étant un hydroperoxyde (ROOH), souvent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ; la GPX agit par son groupement sélénol et deux molécules de GPX sont nécessaires à la transformation d'une molécule d'hydroperoxyde. Comme ces deux GSH s'oxydent en GSSG (forme oxydée), il est indispensable que la GPX soit couplée au système de régénération du GSH (forme réduite active) comme suit :



La dernière réaction est catalysée par la glutathion-réductase NADPH<sub>2</sub>-dépendante, le cofacteur réduit provenant des deux premières réactions de la voie glycolytique des pentoses-phosphates incriminant la glucose-6-phosphate-déshydrogénase et la 6-phosphogluconate-déshydrogénase. Tous ces éléments existent dans l'érythrocyte et sont d'ailleurs nécessaires à la détoxification de l'oxygène néfaste à l'intégrité membranaire érythrocytaire. Les autres hydroperoxydes éliminés par les GPX sont les produits de la peroxydation lipidique, hydroperoxydes d'acides gras de phospholipides membranaires et hydroperoxydes de cholestérol. Il existe d'autres peroxydases, comme la thiorédoxine-peroxydase, fonctionnant sans GSH. GPX et catalase agissent tardivement dans le processus oxydant en éliminant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et les peroxydes membranaires alors que les SOD agissent un peu plus précocement dès que se forme O<sub>2</sub><sup>•</sup>, que ce soit dans le cytosol ou la mitochondrie.

Il existe aussi des systèmes non enzymatiques antioxydants par leurs propriétés chimiques intrinsèques essentiellement réductrices et/ou antiradicalaires. Le plus important est le système des vitamines E et C ; la première, liposoluble, est présente dans les membranes cellulaires et circule dans le sang liée aux lipoprotéines. La vitamine E (ou α-tocophérol) capte alcoxyles et peroxydes issus de la peroxydation lipidique, donc elle interrompt la chaîne de propagation radicalaire dans les membranes et les lipoprotéines soumises à un stress oxydant. Dans cette réaction de piégeage la vitamine E devient à son tour radicalaire et c'est l'acide ascorbique (la vitamine C) qui la régénère sous forme active. Néanmoins à forte concentration la vitamine E peut se comporter comme un prooxydant vis-à-vis des acides gras polyinsaturés. La vitamine C, hydrosoluble, agit aussi comme réducteur plus ou moins directement, en particulier pour la préservation du glutathion, de la mélanine et du cytochrome P450 ; elle intervient aussi dans la maturation du collagène, au bénéfice de la cicatrisation. Elle est régénérée sous forme réduite (enediol) par une NADH-réductase. On peut encore citer comme antiradicalaires et/ou réducteurs à effets mineurs : les caroténoïdes (essentiellement le β-carotène, provitamine A alimentaire) plutôt réparateurs donc peu

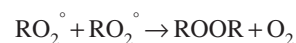
importants dans les défenses précoces ; l'acide urique, la bilirubine et les œstrogènes parmi les réducteurs plasmatiques ; les polyphénols parmi les sources alimentaires ; et les acide lipoïque et coenzyme Q pour les composés intracellulaires. Ajoutons que le glutathion (GSH), au-delà de son rôle comme cofacteur des GPX, est directement antioxydant par son caractère nucléophile :



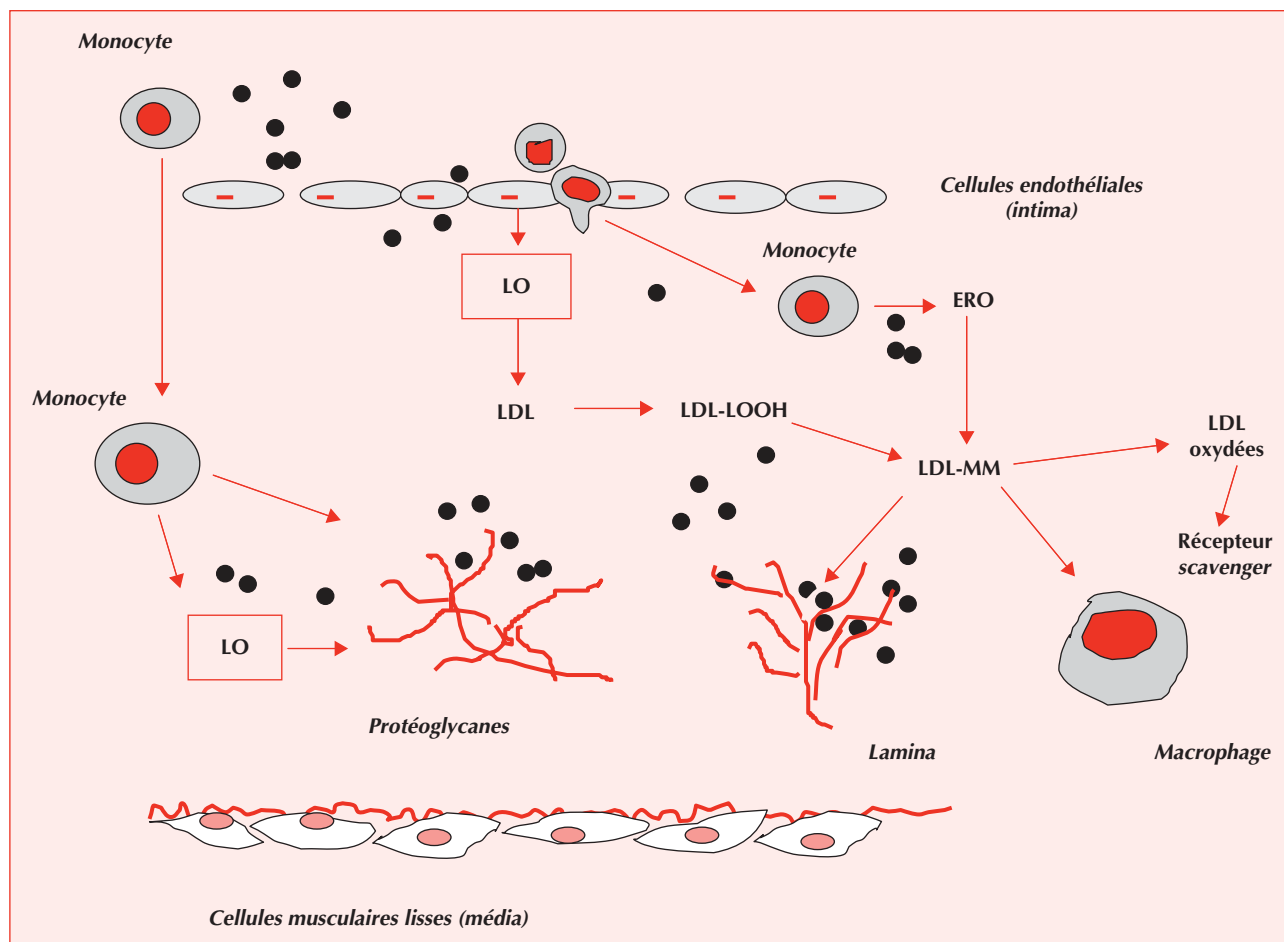
et c'est un agent de détoxification par formation de dérivés mercapturiques. N'oublions pas que le glutathion a besoin de NADPH pour sa régénération sous forme réduite active [1, 2].

### Cibles biologiques des espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Quelles sont les cibles des ERO non éliminées par ces systèmes de défense (figures 1 et 2) ? La plupart des molécules biologiques y sont sensibles : acides gras et lipides complexes, acides aminés et protéines, bases puriques et acides nucléiques. Ces oxydations délétères font l'objet de mécanismes de réparation spécifiques. L'oxydation des lipides concerne essentiellement les acides gras tant non estérifiés (AGNE) qu'estérifiés (triacylglycérols, phospholipides et esters de cholestérol), ou encore le cholestérol libre. Pour les dérivés d'acides gras le mécanisme d'attaque oxydante est la peroxydation lipidique ; elle concerne essentiellement les acides gras polyinsaturés (AGPI), acides linoléique, linoléique et arachidonique. La première étape, dite d'initiation, consiste à l'abstraction par le radical libre d'un atome d'hydrogène dans un groupement méthylène (-CH<sub>2</sub>-) surtout s'il est adjacent à une double liaison, comme on en trouve plusieurs dans les acides cités précédemment. Le radical formé se stabilise, sous forme de diène conjugué, par résonance. La phase de propagation débute lorsqu'une molécule d'O<sub>2</sub> attaque le radical acide gras (R<sup>•</sup>) pour former un radical peroxyde (RO<sub>2</sub><sup>•</sup>) qui peut arracher un H à un autre AGPI et créer un nouveau radical libre, qui s'oxydera et ainsi de suite. La phase de terminaison consiste à la recombinaison des deux peroxydes pour former un peroxyde relativement stable :



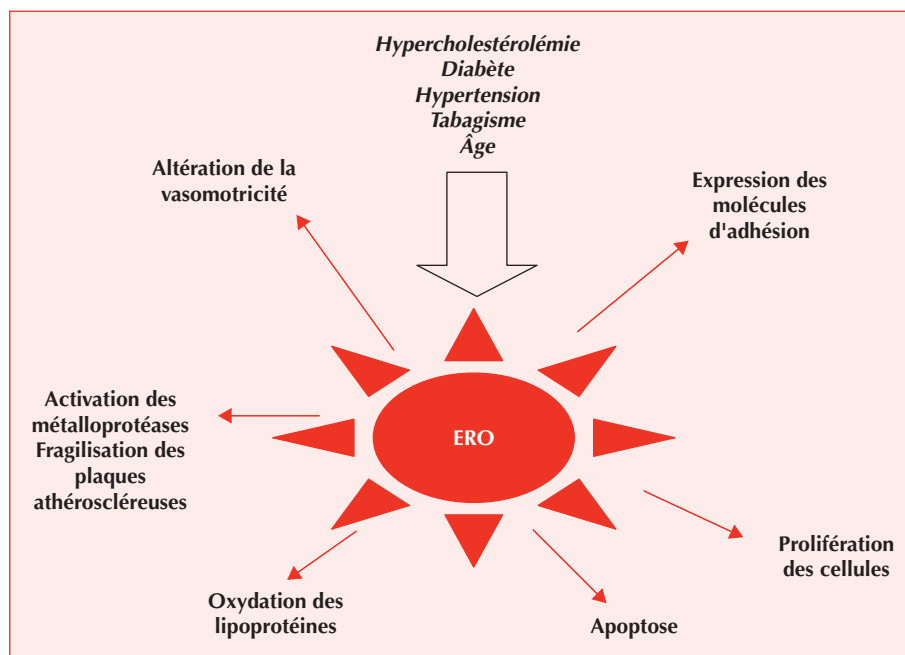
La décomposition des peroxydes libère de nombreux produits tels que des aldéhydes (malonate-dialdéhyde, 4-hydroxynonéna...) à partir de la plupart des AGPI, et des isoprostanes à partir d'esters de l'acide arachidonique. Notons que les lipo-oxygénases (LOX) catalysent l'oxydation des acides linoléique et arachidonique, libres ou estérifiés, et en donnant des acides hydroxy-octadécadiénoïques (HPODE) à partir du premier, ou hydroperoxy-éicotétraénoïques (HPETE) à partir du



**Figure 1.** Modification des LDL dans la paroi artérielle menant à la plaque d'athérosclérose. La première étape est la pénétration de lipoprotéines athérogènes, en particulier des LDL, à travers la monocouche endothéliale, suite à un dysfonctionnement de l'endothélium, à une augmentation de sa perméabilité, ou à un défaut du récepteur aux LDL. Par activation de lipoxygénases (LO), les LDL vont s'oxyder avec formation d'hydroperoxydes (LOOH). Des monocytes circulants vont pénétrer dans l'intima après avoir été ralentis et fixés par des protéines d'adhésion endothéliales, dont l'expression à la face luminale est augmentée par les LDL oxydés. Ces monocytes vont s'activer et produire de la LO et des ERO qui viennent compléter l'oxydation des LDL, les LDL-MM formées peuvent adhérer aux protéoglycanes du sous-endothélium et sont partiellement éliminés par les macrophages par leur récepteur scavenger. En fonction de leur faculté d'évacuation des différentes populations de LDL oxydées, les macrophages vont soit maintenir un équilibre sans épaississement intimal, soit, suite au débordement de ce système d'élimination, se transformer en cellules spumeuses qui, s'accumulant, vont venir épaissir l'intima, créant les conditions du développement de la plaque d'athérosclérose. Vont alors intervenir, en plus de ces premiers acteurs, des cellules musculaires lisses de la média, des lymphocytes, des plaquettes et une réaction inflammatoire.

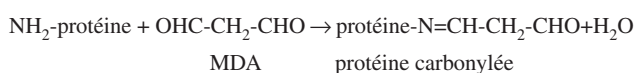
second. Les différentes formes du cholestérol peuvent, quant à elles, être oxydées sous forme d'oxystérols au cours de la peroxydation lipidique, ou encore d'HPODE sous l'effet des LOX. Le mécanisme de réparation repose essentiellement sur le blocage de la propagation de la chaîne radicalaire par les vitamines E/C et la conversion des hydroperoxydes lipidiques en alcools par la GPX membranaire. La peroxydation lipidique revêt une importance toute particulière dans la physiopathologie de l'athérosclérose, tant au niveau cellulaire et pariétal que par l'attaque oxydante des lipoprotéines.

Les acides aminés sont très sensibles au radical hydroxyle ( $^{\circ}\text{OH}$ ), en particulier les soufrés (la cystéine s'oxyde en cystine ou en acide cystéique et la méthionine en sulfoxyde ou sulfone), les basiques (histidine, lysine, arginine) en dérivés carbonylés ou hydroxylés semi-aldéhydes, et les aromatiques (la phénylalanine en ortho-tyrosine, le tryptophane en cynurénine, la tyrosine en DOPA, ou encore nitration par les peroxy-nitrites). Dans les protéines, certaines de ces réactions d'oxydation des chaînes latérales des acides aminés sont possibles ; s'y ajoutent des attaques spécifiques comme la lipo-oxydation par



**Figure 2.** Rôle des ERO (espèces réactives de l'oxygène) dans la formation de la plaque d'athérosclérose et relations avec les facteurs de risque des maladies cardiovasculaires.

les produits de la peroxydation lipidique ; c'est le cas avec le malonate-dialdéhyde (ou MDA) se liant sur l'extrémité N-terminale des protéines par réaction de Schiff :



Le 4-hydroxynonéal réalise une lipo-oxydation aussi à l'origine de protéines carbonylées. Ces réactions peuvent s'associer à la glycation pour donner des protéines à liaisons croisées, avec formation de carboxyméthyllysine par exemple, et en particulier au niveau du collagène, à l'origine de ce que l'on appelle les *advanced glycation end-products* (AGE). Enfin la liaison peptidique peut être rompue, selon des mécanismes complexes et encore mal élucidés, menant à une fragmentation de la chaîne polypeptidique. On voit bien l'importance de ces modifications chimiques des protéines qui peuvent toucher leurs fonctions en particulier s'il s'agit de résidus ou de zones formant le site actif d'une enzyme ou encore le site de liaison d'un transporteur, d'un récepteur ou d'un facteur de transcription. Ces protéines modifiées vont être reconnues plus ou moins rapidement par le système intracellulaire d'ubiquitination pour les éliminer dans le protéasome. Plus spécifiquement la méthionine oxydée sera réduite par la méthionine-sulfoxyde-réductase qui utilise la thiorédoxine réduite comme cofacteur. Les protéines modifiées dans le secteur extra-cellulaire peuvent être phagocytées et dégradées dans les lysosomes des cellules phagocytaires ; on connaît maintenant un mécanisme

spécifique pour l'élimination des AGE par les cellules phagocytaires présentant le récepteur aux AGE (RAGE).

Les ARN et ADN sont aussi des cibles privilégiées pour les ERO. Dans les conditions physiologiques, on estime que l'ADN nucléaire présente une base modifiée par les ERO pour 130 000 bases, et même une pour 8 000 dans l'ADN mitochondrial particulièrement vulnérable. Le radical  $\cdot\text{OH}$  est le plus réactif envers les bases azotées et les sucres des acides nucléiques. Par exemple la guanine peut être oxydée en 8-hydroxy-guanine ; les atomes 4 et 5 peuvent aussi être touchés et des attaques semblables ont été retrouvées sur les mêmes atomes de l'adénine ainsi que sur les C du noyau ou du groupement méthyle de la thymine, par exemple pour former du thymidine-glycol. Le ribose et le désoxyribose peuvent être oxydés en dérivés mono- ou di-carbonylés. En tout plus d'une dizaine de produits d'oxydation des bases puriques et pyrimidiques, ainsi que des sucres des ARN et des ADN ont été isolés. Plusieurs mécanismes tentent de supprimer ces oxydations. L'un est basé sur l'excision des bases grâce à des ADN-glycosidases donnant des sites abasiques, apuriques ou apyrimidiques ; ces sites sont mutagènes en bloquant réplication et transcription.

C'est pourquoi les sites abasiques sont reconnus par des endonucléases qui éliminent le désoxyribose esséulé ; le trou ainsi créé est comblé par une ADN-polymérase qui remplace la base correcte par complémentarité du brin non endommagé ; enfin la ligature de l'ADN est réalisée par une ligase. Dans le processus de réparation par excision



de nucléotides, un oligonucléotide de 25 à 30 nucléotides renfermant la base modifiée est excisé de l'ADN grâce à une excinuclease ; le trou est comblé comme précédemment par ADN-polymérase et ligase. Néanmoins ces systèmes ne sont pas capables d'éliminer complètement les bases modifiées par les ERO [1, 3].

### Rôles du stress oxydant dans la physiopathologie de l'athérosclérose et de l'ischémie myocardique

#### Facteurs de risque et bases de la physiopathologie de l'athérosclérose

Dans sa stricte définition, il n'existe aucune cause indispensable au développement de l'athérosclérose. Cependant les grandes enquêtes épidémiologiques réalisées depuis plusieurs décennies ont révélé que divers facteurs de risque étaient associés à la survenue de complications artérielles, en particulier coronaires avec angor et infarctus du myocarde (syndromes coronaires aigus), mais aussi des artères du cou et de la tête, causes d'accidents ischémiques cérébraux, et des membres inférieurs avec le développement d'artérite des membres inférieurs. Classiquement, on distingue les facteurs de risque non modifiables (âge, sexe masculin, antécédents familiaux de pathologies cardiovasculaires précoces) des facteurs de risque modifiables, comme le tabagisme, l'hypertension artérielle, le diabète et tout particulièrement les anomalies lipidiques. En effet le lien entre l'hypercholestérolémie et la maladie coronaire a été établi par les grandes études épidémiologiques prospectives.

Des études de prévention tant primaire que secondaire ont montré que la baisse du cholestérol, en particulier du LDL-cholestérol, s'accompagnait d'une réduction de la morbidité et de la mortalité coronaires. Si le LDL-cholestérol est un facteur de risque majeur, l'athérogénicité de l'hypertriglycéridémie a fait l'objet de nombreux travaux souvent contradictoires. L'effet athéroprotecteur des HDL a été largement confirmé, d'où l'importance à l'heure actuelle de la détermination des rapports d'athérogénicité LDL-cholestérol/HDL-cholestérol ou apoB/apoA, la première étant l'apolipoprotéine majeure des LDL et la seconde celle des HDL.

L'étude des mécanismes participant à l'athérogenèse a bénéficié de nouvelles approches expérimentales, en particulier avec la culture cellulaire et les souris génétiquement modifiées. Le rôle clé de l'endothélium dans l'initiation et la progression de la plaque athéroscléreuse est maintenant bien défini. Dans les conditions normales, les cellules endothéliales contrôlent la vasomotricité et le

profil non thrombotique du vaisseau. Très précocement au cours du processus d'athérogenèse, ces fonctions sont altérées avant même que n'apparaissent les lésions artérielles cliniquement détectables. Un événement majeur est la présence dans l'environnement cellulaire de dérivés potentiellement athérogènes, c'est le cas en particulier de l'accumulation des LDL dans l'espace sous-endothélial. Les LDL diffusent passivement, en particulier dans les zones vulnérables soumises à un flux sanguin perturbé (courbures, bifurcations, là où les forces de cisaillement sont diminuées). La liaison avec les protéoglycans de la matrice extracellulaire facilite leur rétention au sein de l'intima. Les lipoprotéines piégées, LDL et autres lipoprotéines à apoB comme la Lp(a), sont l'objet de modifications progressives entraînant une réponse inflammatoire locale, essentiellement en interagissant avec les cellules de la paroi artérielle, cellules endothéliales et cellules musculaires lisses, qui répondent par la production de médiateurs pro-inflammatoires en particulier responsables du recrutement des leucocytes, monocytes et lymphocytes T essentiellement. Les monocytes subissent *in situ* la différenciation en macrophages qui vont proliférer. La capture des lipoprotéines modifiées par les macrophages est à l'origine de la formation des cellules spumeuses ; en effet ces cellules présentent un récepteur aux LDL-modifiées (dit *scavenger*), qui, n'étant pas régulé par le contenu intracellulaire en cholestérol, accumule les lipides sous forme de vacuoles lipidiques. Celles-ci deviennent de plus en plus grandes, entraînant *in fine* la mort cellulaire et la libération du contenu lipidique dans l'intima à l'origine de l'épaississement de l'intima puis du cœur lipidique de la plaque athéroscléreuse constituée. La libération de cytokines et de facteurs de croissance par les leucocytes activés et les différentes cellules de la paroi artérielle amplifie le processus et induit la migration, à partir de la média, et la prolifération des cellules musculaires lisses. Celles-ci s'accumulent dans l'intima et encapsulent progressivement le centre nécrotique, formant la chape fibreuse de la plaque maintenant fibro-lipidique et plus ou moins stable. Souvent le processus va continuer d'évoluer vers la plaque compliquée ; l'augmentation de la taille du centre nécrotique ainsi que la dégradation de la chape fibreuse par des métalloprotéases sont des facteurs majeurs d'instabilité. Les macrophages produisent eux-mêmes les protéases responsables de la dégradation de la matrice extra-cellulaire alors que les cellules musculaires lisses, mourant par apoptose, sont incapables de compenser ce phénomène en produisant de nouvelles protéines matricielles. L'interféron  $\gamma$  produit par les lymphocytes T activés majeure la dérégulation de ce métabolisme en bloquant la synthèse du collagène par les cellules musculaires lisses ; comme le TNF- $\alpha$  il a aussi pour effet d'augmenter la synthèse des récepteurs *scavenger* par les macrophages [4-6].

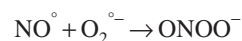
### Stress oxydant et athérosclérose

Le stress oxydant intervient à tous les niveaux de sa physiopathologie. L'oxydation des LDL tient un rôle clef dans l'initiation et le développement de la plaque athéroscléreuse. Les modifications des LDL par oxydation touchent aussi bien la partie lipidique, avec la formation d'hydroperoxydes de phospholipides et d'esters de cholestérol, d'isoprostanes, d'oxystérols et la production de produits de décomposition (MDA et 4-hydroxynonéal), que l'apolipoprotéine B, avec carbonylation, fragmentation, oxydation des acides aminés et formation de produits d'addition entre la lysine N-terminale et le MDA. Les LDL oxydées deviennent cytotoxiques vis-à-vis des cellules endothéliales, par le biais des oxystérols essentiellement, et elles ne sont plus reconnues par le récepteur à l'apoB100 mais au contraire par le récepteur *scavenger* des cellules spumeuses. Elles stimulent la production de médiateurs pro-inflammatoires et la différenciation des macrophages en cellules spumeuses. Elles présentent des effets mitogéniques sur les cellules musculaires lisses et les macrophages, mais apoptotiques vis-à-vis des cellules endothéliales ; elles possèderaient des propriétés thrombogènes par libération de facteur tissulaire, et vasoconstrictrices par production d'endothéline et par l'effet thromboxane A<sub>2</sub> des isoprostanes. Le 4-hydroxynonéal aurait des propriétés chimiotactiques et génotoxiques inhibant la croissance cellulaire. Le collagène oxydé et glyqué se transforme en AGEs qui, reconnus par les cellules phagocytaires présentant RAGE, vont activer ces cellules en un cercle vicieux. L'oxydation des HDL semble elle aussi importante ; elle diminuerait leurs propriétés d'élimination du cholestérol par le transport inverse et de protection des LDL vis-à-vis de l'oxydation. Enfin comme pour les LDL, l'oxydation de l'apo(a) de la Lp(a) participerait au développement de la plaque d'athérome.

Quel est le mécanisme d'oxydation des LDL et autres lipoprotéines ? Les LDL retenues dans l'intima, dans un micro-environnement privé d'anti-oxydants hydrosolubles, subissent l'attaque des ERO produites par les différentes cellules de la paroi artérielle, soit par des mécanismes catalysés non enzymatiquement, par exemple par le cuivre (mais cela n'a pas été prouvé *in vivo*), soit par des mécanismes enzymatiques, comme avec les lipo-oxygénases produisant des hydroperoxydes lipidiques, avec la NADPH-oxydase leucocytaire et vasculaire (endothéliale) capable de réduire O<sub>2</sub> en anion superoxyde et responsable, pour la NADPH-oxydase leucocytaire, de la production d'HOCl bactéricide grâce à l'action de la myéloperoxydase, également avec la xanthine-oxydase activée par l'ischémie et productrice de radicaux superoxyde. Le premier rempart antioxydant serait l'ubiquinol, puis la vitamine E, enfin la vitamine A et la GPX que l'on retrouve dans ces particules ; le PAF-acéther et la para-oxonase auraient des effets protecteurs spécifiques ; donc les lipoparticules riches en ces molécules ne poursuivront

pas le processus d'oxydation au-delà de la phase de latence. Il est vraisemblable qu'au sein de la paroi artérielle cohabite une grande diversité de lipoparticules oxydées, dont les effets biologiques peuvent être très différents en fonction du degré d'oxydation voire opposés selon la nature de ces particules.

À part les mécanismes d'oxydation, les LDL peuvent subir d'autres dommages, comme la dégradation de leurs phosphatidylcholines par la phospholipase A<sub>2</sub> avec formation de lysophosphatidylcholines potentiellement pro-athérogènes, ou encore l'hydrolyse des sphingomyélines par la sphingomyélinase conduisant à des LDL agrégées mieux reconnues par les macrophages ; cette hydrolyse produit aussi du céramide impliqué dans la prolifération et l'apoptose. Ces deux enzymes seraient présentes dans l'intima, liées aux protéoglycanes et en partie localisées aux particules LDL. Le NO tient une place particulière ayant des propriétés vasodilatatrices et étant, au niveau vasculaire, essentiellement produit par les cellules endothéliales qui expriment une NOS constitutive. Le régime riche en cholestérol diminue sa libération ; son interaction avec l'anion superoxyde le neutralise :

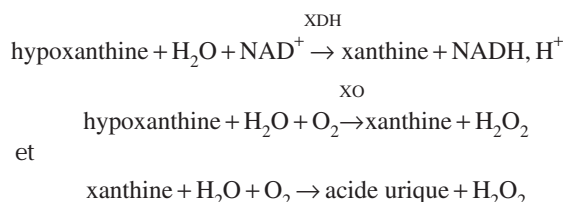


Ces peroxy-nitrites sont responsables de la nitration des acides aminés aromatiques et de l'initiation de la peroxydation lipidique par leur fort pouvoir oxydant. La Lp(a) oxydée serait capable d'inhiber l'expression de la NOS inductible des macrophages [7-9].

### Stress oxydant et ischémie myocardique

Les ERO sont directement incriminés dans les altérations cardiaques, comme les arythmies post-infarctus, dues à l'ischémie suivie de reperfusion, situation rencontrée en particulier au cours des accidents coronaires aigus traités par thrombolyse revascularisante. Ces ERO seraient essentiellement produits par l'activation de la xanthine-oxydase (XO) au cours de l'ischémie ; en fait les cellules endothéliales vasculaires expriment une xanthine-déshydrogénase (XDH) qui, en l'absence d'oxygène, est convertie en xanthine-oxydase, enzyme finale du catabolisme des bases puriques qui en produisant de l'acide urique fournit de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Expérimentalement, une brève période d'ischémie suivie d'une reperfusion protège d'une nouvelle ischémie, ce qu'on appelle un préconditionnement. Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer ce phénomène, dont celle de la surproduction d'enzymes antioxydantes. Ajoutées au perfusé, ces enzymes (SOD et GPX essentiellement) protègent partiellement des accidents de reperfusion, et en particulier en diminuant la peroxydation lipidique. Le stress hypoxique induit d'autres mécanismes, parmi lesquels l'expression de protéines de choc thermique (dont HSP-70), la production de

prostacycline et de NO, trois mécanismes pour lesquels la cellule endothéliale (la première lésée) tient une grande place [10].



### Marqueurs du stress oxydant et pathologie cardiovasculaire

Comme le stress oxydant est impliqué dans la physiopathologie de l'athérosclérose et des syndromes coronaires aigus, on comprend l'intérêt à développer des marqueurs spécifiques, sensibles, fiables et d'exécution analytique aisée. Le stress oxydant peut être évalué par la mesure des radicaux libres, des systèmes antioxydants, enzymatiques ou non, et des dommages créés par l'attaque des radicaux libres sur les lipides, les protéines (comme les tests mesurant l'albumine modifiée) et les acides nucléiques. Récemment c'est un marqueur de l'inflammation pro-oxydant qui a été proposé : la myéloperoxydase.

#### Détection des radicaux libres

Elle est difficile à cause de la très faible durée de vie des radicaux libres, en particulier les  $\cdot\text{OH}$  et  $\text{O}_2^{\cdot-}$  ( $10^{-9}$  et  $10^{-6}$  secondes respectivement). Elle n'est possible que par spectroscopie de résonance paramagnétique (RPE) en employant un artifice augmentant la durée de vie des ERO, le *spin trapping*. Il est possible d'adapter cette technique sur CLHP avec détection électrochimique. Seuls quelques laboratoires de recherche sont équipés de ces méthodologies et travaillent essentiellement sur des modèles cellulaires ou tissulaires, dont ceux de l'athérosclérose. En particulier, une forte augmentation de la production des ERO a été montrée après reperfusion de l'ischémie myocardique chez l'homme et dans des modèles de cœur perfusé ; des résultats identiques ont été retrouvés sur cellules endothéliales en culture [1, 11].

#### Mesure des systèmes antioxydants

Il s'agit d'apprécier le statut en antioxydants de l'organisme. On peut ainsi déterminer l'activité de certaines enzymes antioxydantes comme la SOD, la GPX, la glutathion-réductase et la catalase, soit sur du plasma (ou du sérum), soit sur des éléments figurés du sang (érythrocytes, leucocytes). Toutes ces mesures sont relativement aisées voire automatisables, mais elles souffrent souvent d'un défaut de reproductibilité. Individuellement ou conjointement, elles ont été explorées dans divers types

d'études cliniques. Par exemple l'ischémie myocardique aiguë diminue l'activité SOD alors que le traitement par la SOD prévient les lésions de reperfusion ; par contre l'activité SOD n'est pas prédictive d'un accident cardiovasculaire proche. La GPX érythrocytaire est diminuée chez les patients présentant une maladie coronaire avec hypercholestérolémie, et récemment Blankenberg *et al.* [12] ont montré qu'une activité GPX érythrocytaire faible était associée à un risque accru d'accidents cardiovasculaires indépendamment des facteurs de risque classiques ; mais il faut se rappeler que cette activité GPX est inversement corrélée à l'âge, et positivement corrélée à la teneur en sélénium des sols (les sols sélénifères sont riches en sélénium tandis que les sols séléniprives en sont pauvres) ; un dosage de sélénium permet de connaître ce facteur de variabilité. La GPX est aussi diminuée dans de nombreuses maladies touchant la membrane érythrocytaire ainsi que dans la cirrhose, de nombreuses autres maladies hépatiques et l'hyperbilirubinémie néonatale. La catalase et la glutathion-réductase, ou encore la glutathion-S-transférase, sont plus rarement étudiées sinon en association des SOD et GPX [1].

De nombreux antioxydants non enzymatiques sont facilement dosables, tant les composés hydrophiles, comme le glutathion et l'acide ascorbique (vitamine C), que les lipophiles, comme l' $\alpha$ -tocophérol (vitamine E), le  $\beta$ -carotène (vitamine A) et l'ubiquinol. Ils sont dosés pour la plupart par des méthodes de CLHP facilement disponibles, cela tant dans le plasma et les érythrocytes que dans les particules lipoprotéiques isolées pour les composés lipophiles. Le glutathion peut être dosé sous sa forme réduite (GSH) ou oxydée (GSSG), soit enzymatiquement, soit par CLHP ou encore par électrophorèse capillaire [13]. Il existe aussi des méthodes de détermination du pouvoir total antioxydant du plasma qui incluent des composés non encore identifiés à ce jour, ou pas habituellement dosés. Il paraît particulièrement intéressant de déterminer le rapport GSH/GSSG : plus il est élevé, plus le pouvoir réducteur (donc antioxydant) est fort, inversement quand il est bas il est le stigmate d'un stress oxydant ayant consommé la réserve de glutathion réduit. Au niveau cellulaire, ce rapport du glutathion présente la même signification que le rapport NADPH/NADP. Des diminutions du statut vitaminique (A, C et E) et du rapport GSH/GSSG ont été décrites en pathologie cardiovasculaire et au cours du vieillissement [1, 14, 15].

#### Marqueurs de la peroxydation lipidique

Ils sont nombreux, étant donné que la peroxydation lipidique conduit à la formation d'une quantité importante et encore mal connue de composés très divers. La mesure des diènes conjugués à 234 nm (en spectrophotométrie dérivée) permet de quantifier globalement cette peroxydation, et en particulier d'établir des cinétiques au cours de l'oxydation *in vitro* des lipoprotéines isolées.



Parmi les aldéhydes issus de la décomposition des hydroperoxydes, le MDA est plus couramment dosé ; il réagit à l'acide thiobarbiturique pour donner un dérivé absorbant dans le visible et fluorescent, mais la spécificité n'est pas très bonne car de nombreux composés peuvent aussi réagir avec cet acide. Il existe maintenant des méthodes de dosage, essentiellement chromatographiques, pour les composés primaires, les hydroperoxydes, et d'autres composés secondaires comme le 4-hydroxy-nonénal et les isoprostanes, en particulier la 8-iso-PGF<sub>2α</sub> et son métabolite urinaire pour lequel a été développé un essai immunoenzymatique [1, 16, 17].

### **Marqueurs de l'oxydation des protéines et des acides aminés**

L'ensemble des composés carbonylés provenant de l'oxydation des protéines peut être dosé par une méthode spectrophotométrique à 370 nm après réaction à la 2,4-dinitrophénylhydrazine, méthode malheureusement peu spécifique [18]. Récemment a été développé un test qui mesure la capacité de fixation du cobalt par l'albumine, capacité diminuée par l'altération du N-terminus de l'albumine au cours du stress oxydant (ACB-Test<sup>R</sup>) : le cobalt non fixé est dosé à 505 nm après réaction au dithiothréitol [19]. Ce test souffre encore d'un manque de reproductibilité, mais il est facilement automatisable. Christenson *et al.* [20] ont montré l'intérêt de ce test pour le diagnostic des syndromes coronaires aigus, résultats confirmés par Wu *et al.* [21] en le comparant à la troponine I habituellement utilisée dans ce diagnostic.

### **Marqueurs de l'oxydation des acides nucléiques**

Parmi les nombreux métabolites identifiés à partir de l'oxydation de l'ADN, l'un s'est avéré particulièrement intéressant : la 8-hydroxy-désoxyguanosine (8-OH-dG) que l'on peut doser par CLHP avec détection électrochimique à partir de biopsies, de lymphocytes isolés du sang ou encore de l'urine ; des méthodes immunoenzymatiques sont en cours de développement [1, 22].

### **Myéloperoxydase et infarctus du myocarde**

Deux études indépendantes ont montré l'intérêt de mesurer la myéloperoxydase chez les patients atteints d'un syndrome coronaire aigu. Brennan *et al.* [23] ont comparé 604 malades accueillis dans un service d'urgence pour des douleurs thoraciques à 115 sujets témoins. L'activité plasmatique de la myéloperoxydase était significativement plus élevée chez les malades que chez les témoins ; la valeur diagnostique du test a semblé meilleure que celles des troponine T, CK-MB et protéine C. L'enzyme était plus élevée chez les malades qui ont présenté un événement cardiovasculaire (décès, infarctus, revascularisation précoce ou tardive) ; cette valeur prédictive, comme pour la GPX, était indépendante des autres fac-

teurs de risque. Des résultats identiques ont été rapportés par Baldus *et al.* [24] sur 1 090 patients présentant un syndrome coronaire aigu, indépendamment des autres facteurs et marqueurs de risque.

## **Conclusion et perspectives**

Les ERO sont générés dans le myocarde post-ischémique et dans les artères qui vont former des plaques athéroscléreuses. De nombreux types cellulaires et différentes enzymes contribuent à une production accélérée d'ERO et à un stress oxydant délétère, bien que l'organisme soit équipé de nombreux systèmes (enzymes et vitamines) de défense antioxydante. On dispose maintenant de marqueurs pour apprécier le stress oxydant et on s'oriente vers le dosage de métabolites issus de l'oxydation des principales cibles moléculaires des ERO. Par ailleurs, des études prospectives viennent de montrer l'intérêt de mesurer des enzymes de défense, comme la GPX, ou d'attaque oxydante, comme la myéloperoxydase, pour prédire précocement les accidents ischémiques coronariens.

Cependant ces travaux devront être confirmés par la constatation d'une amélioration en ramenant ces marqueurs à la normale. Les essais thérapeutiques, utilisant soit des antioxydants soit de la SOD, n'ont pas pour l'instant montré d'effets bénéfiques pour réduire l'incidence des maladies cardiovasculaires ni la mortalité. Il est néanmoins trop tôt pour conclure à l'inutilité des stratégies antioxydantes dans le traitement des maladies cardiovasculaires, car la situation est certainement bien plus complexe que ce que l'on avait imaginé au départ. Il est même sûr que certains médicaments existants exercent déjà une partie de leurs effets par des voies de signalisation dépendantes des systèmes redox (par exemple le probucol, les statines, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion, les inhibiteurs de la protéine-kinase C...). Ces médicaments et ceux qui vont naître des stratégies antioxydantes permettront d'améliorer nos connaissances sur les voies de signalisation et les mécanismes du stress oxydant ; de cette meilleure compréhension émergeront de nouveaux marqueurs biologiques de prédiction et de diagnostic ainsi que de nouvelles cibles thérapeutiques.

## **Références**

1. Bonnefont-Rousselot D, Thérond P, Delattre J. Radicaux libres et antioxydants. In : Delattre J, Durand G, Jardillier JC, eds. *Biochimie pathologique. Aspects moléculaires et cellulaires*. Paris : Flammarion Médecine/Sciences, 2003 : 59-81.
2. Sies H, Stahl W. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nutr* 1995 ; 62 : 1315S-1321S.
3. Subbanagounder G, Watson AD, Berliner JA. Bioactive products of phospholipid oxidation : isolation, identification, measurement and activities. *Free Radic Biol Med* 2000 ; 28 : 1751-61.

4. Moatti N. Athérosclérose : concepts actuels. In : Delattre J, Durand G, Jardillier JC, eds. *Biochimie pathologique. Aspects moléculaires et cellulaires*. Paris : Flammarion Médecine/Sciences, 2003 : 83-90.
5. Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 2001 ; 104 : 365-72.
6. Ross R. Atherosclerosis : an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999 ; 340 : 115-25.
7. Beaudoux JL, Delattre J, Peynet J. Lipoprotéines et athérosclérose : mécanismes moléculaires et cellulaires. In : Delattre J, Durand G, Jardillier JC, eds. *Biochimie pathologique. Aspects moléculaires et cellulaires*. Paris : Flammarion Médecine/Sciences, 2003 : 91-107.
8. Chisolm GM, Steinberg D. The oxidative hypothesis of atherogenesis : an overview. *Free Radic Biol Med* 2000 ; 28 : 1815-26.
9. Heinecke JW. Mechanisms of oxidative damage of low density lipoprotein in human atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1997 ; 8 : 268-74.
10. Steeves G, Singh N, Singal PK. Preconditioning and antioxidant defence against reperfusion injury. In : *Cellular, biochemical, and molecular aspects of reperfusion injury*. DK Das ed. *Ann N Y Acad Sci* 1994 ; 723 : 117-27.
11. Lefer DJ, Granger N. Oxidative stress and cardiac disease. *Am J Med* 2000 ; 109 : 315-23.
12. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, et al. Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 2003 ; 349 : 1605-13.
13. Serru V, Baudin B, Ziegler F, et al. Quantification of reduced and oxidized glutathione in whole blood samples by capillary electrophoresis. *Clin Chem* 2001 ; 47 : 1321-4.
14. Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacotherap* 2003 ; 57 : 145-55.
15. Lang CA, Naryshkin S, Schneider DL, Jane Mills B, Lindeman RD. Low blood glutathione levels in healthy aging adults. *J Lab Clin Med* 1992 ; 130 : 720-5.
16. Lawson JA, Rokach J, Fitzgerald GA. Isoprostanes : formation, analysis and use as indices of lipid peroxidation *in vivo*. *J Biol Chem* 1999 ; 274 : 24441-4.
17. Roberts LJ, Morrow JD. Measurement of F2-isoprostanes as an index of oxidative stress *in vivo*. *Free Radic Biol Med* 2000 ; 28 : 505-13.
18. Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 1997 ; 272 : 20313-6.
19. Bar-Or D, Lau E, Wirkler JV. A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia - a preliminary report. *J Emerg Med* 2000 ; 19 : 311-5.
20. Christenson RH, Hong Duh S, Sanhai WR, et al. Characteristics of an albumin cobalt binding test for assessment of acute coronary syndrome patients : a multicenter study. *Clin Chem* 2001 ; 47 : 464-70.
21. Wu AHB, Morris DL, Fletcher DR, Apple FS, Christenson RH, Painter PC. Analysis of the albumin cobalt binding (ACB) test as an adjunct to cardiac troponin I for the early detection of acute myocardial infarction. *Cardiovasc Toxicol* 2001 ; 1 : 147-52.
22. Dizdaroglu M. Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Biol Med* 1991 ; 10 : 225-42.
23. Brennan ML, Penn MS, Van Lente F, et al. Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain. *N Engl J Med* 2003 ; 349 : 1595-604.
24. Baldus S, Heeschen C, Meinertz T, et al. Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2003 ; 108 : 1440-5.