



HAL
open science

Effets des dérivés séléniés organiques sur l'oxydation in vitro des LDL

Christophe Guier

► **To cite this version:**

Christophe Guier. Effets des dérivés séléniés organiques sur l'oxydation in vitro des LDL. Sciences pharmaceutiques. 2000. dumas-01524136

HAL Id: dumas-01524136

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01524136>

Submitted on 17 May 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



2^e exemplaire

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

année: 2000

N° D'ordre : 7023

**EFFETS DES DERIVES SELENIES ORGANIQUES SUR
L'OXYDATION *IN VITRO* DES LDL**

MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE
BIOLOGIE MEDICALE

Conformément aux dispositions du décret n° 88-996

Du 19 octobre 1988, tient lieu de

THESE

Présenté à Grenoble et soutenue publiquement le 30 juin 2000

Pour obtenir le grade de **DOCTEUR EN PHARMACIE**

Par **GUIER Christophe**

[Données à caractère personnel]

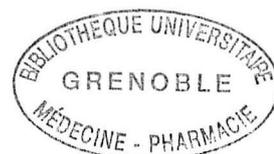
JURY

Président : Madame le Professeur **A.M ROUSSEL**

Membres : Monsieur le Professeur **X. LEVERVE**

Madame le Docteur **V. DUCROS**

Monsieur le Docteur **F. LAPORTE**



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté

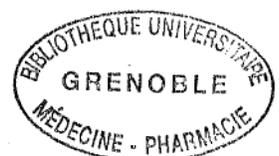
M. le Professeur P. DEMENGE

Vice Doyen

M. le Professeur J. CALOP

PROFESSEURS DE PHARMACIE

| | | |
|-----------------------------|------------|----------------------------|
| ALARY | Josette | Chimie Analytique |
| BAKRI | Abdelaziz | Pharmacie Galénique |
| BENOIT-GUYOD toxicologie | Jean-Louis | Chimie Toxicologie et Eco- |
| CALOP technique | Jean | Pharmacie Clinique et Bio- |
| CUSSAC | Max | Chimie Thérapeutique |
| DECOUT | Jean-Luc | Chimie Générale |
| DEMENGE | Pierre | Physiologie/Pharmacologie |
| DROUET | Emmanuel | Microbiologie-Immunologie |
| FAVIER | Alain | Biochimie |
| GOULON | Chantal | Physique-Pharmacie |
| GRILLOT | Renée | Parasitologie |
| LECLERC | Gérard | Chimie Organique |
| MARIOTTE | Anne-Marie | Pharmacognosie |
| RIBUOT | Christophe | Physiologie-Pharmacologie |
| ROUSSEL | Anne-Marie | Biochimie |
| SEIGLE-MURANDI | Françoise | Botanique et Cryptogamie |
| STEIMAN | Régine | Biologie Cellulaire |
| WOUESSIDJEWÉ | Denis | Pharmacie Galénique |



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

FACULTE DE MEDECINE DE GRENOBLE

Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté
Vice-Doyen
Assesseurs

M. le Professeur J. L. DEBRU
M. le Professeur J. P. CHIROSSEL
M. le Professeur J. LEBEAU
M. le Professeur J.P. ROMANET
M. le Professeur B. SELE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

| | | | | | |
|------------------|-------------|---|-------------|--------------|--|
| AMBLARD | Pierre | Dermato. VénérologieA | HOMMEL | Marc | Neurologie. |
| MBROISE-THOMAS | Pierre | Parasitologie et Mycol. | HOSTEIN | Jean | Hépto-Gastro-Entérol. |
| BACHELOT | Ivan | Endocrinologie et Maladies Métaboliques | JOUK | Pierre-Simon | Biologie du Dévelop. et de la reproduction. |
| BACONNIER | Pierre | Biostatistiques et Informatique Méd. | JUVIN | Robert | Rhumatologie |
| BARGE | Michel | Neurochirurgie | LAVIEILLE | Jean-Pierre | O.R.L. |
| BARRET | Luc | Médecine Légale | LE BAS | François | Biophys. et Trait. de l'Image. |
| BAUDAIN | Philippe | Radiologie et Imag. Méd. | LEBEAU | Jacques | Stomat. et Chirurgie Maxillo- Faciale |
| BEANI | J.-Claude | Dermatologie, Vénérologie | LEROUX | Dominique | Génétique |
| BENABID | Al.-Louis | Biophys. et Trait. de l'image | LETOUBLON | Christian | Chirurgie Générale |
| BENSA | J. Claude | Immunologie | LEVERVE | Xavier | Thérapeutique |
| BERNARD | Pierre | Gynéco et Obstétrique | LEVY | Patrick | Physiologie |
| BESSARD | Germain | Pharma. Fondamentale | LUNARDI | Joël | Biochimie et Bio. Molécu. |
| BLIN | Dominique | Chir. Thor. et Cardio Vascul. | MACHECOURT | Jacques | Cardio. et Maladie Vascul. |
| BOLLA | Michel | Radiothérapie | MAGNE | Jean-Luc | Chir. Vasculaire |
| BOST | Michel | Pédiatrie | MALLION | J. Michel | Méd. du Trav. et Risques Prof. |
| BOUCHARLAT | Jacques | Pédo Psychiatrie | MASSOT | Christian | Médecine Interne |
| BOUGEROL | Thierry | Psychiatrie d'adultes | MERLOZ | Philippe | Chir. Ortho. et Traumatol. |
| BRAMBILLA | Christian | Pneumologie | MOREL | Françoise | Bioch. et Biol. Moléculaire |
| BRAMBILLA | Elisabeth | Anatomie et Cyto. Pathol. | MICOD | Max | Maladies Infect. et Trop. |
| BRICHON | P.Yves | Chir. Thor. et Cardio.Vasc. | MOUILLON | Michel | Ophthalmologie |
| CARPENTIER | Françoise | Thérapeutique | MOUSSEAU | Mireille | Cancérologie |
| CARPENTIER | Patrick | Méd. Interne | MOUTET | François | Chir. Plast. Reconst. et Esth. |
| CESBRON | Jean-Yves | Immunologie | PASQUIER | Basile | Anat. et Cyto. Pathol. |
| CHAMBAZ | Edmond | Biologie Cellulaire | PASSAGIA | J.-Guy | Anatomie. |
| CHARACHON | Robert | O.R.L. | PAYEN de LA | | |
| CHIROSSEL | J. Paul | Anatomie | GARANDERIE | J. François | Anesthésiologie |
| CINQUIN | Philippe | Biostatistique et Inf. Méd. | PELLAT | Jacques | Neurologie |
| COLOMB | Maurice | Immunologie | PHELIP | Xavier | Rhumatologie |
| CORDONNIER | Daniel | Néphrologie | PISON | Christophe | Pneumologie |
| COULOMB | Max | Radiologie et Imagerie Méd. | POLACK | Benoît | Hématologie |
| CROUZET | Guy | Radiologie et Imagerie Méd. | POLLAK | Pierre | Neurologie |
| DEBRU | Jean-Luc | Médecine Interne | PONS | Jean-Claude | Gynécologie et Obstétrique |
| DE GAUDEMARIS | Régis | Méd. du Trav. et des risques professionnels. | RAMBAUD | Pierre | Pédiatrie |
| DEMONGEOT | Jacques | Biostatistique et Inf. Méd | RAMBEAUD | J. Jacques | Urologie |
| DESCOTES | Jean-Luc | Urologie | RAPHAEL | Bernard | Stomat. et Chirurgie Maxillo-faciale |
| DUPRE | Alain | Chirurgie Générale | REYT | Emile | O.R.L. |
| DYON | J. François | Chirurgie Infantile | ROMANET | J. Paul | Ophthalmologie |
| FAGRET | Daniel | Bioph et Trait. Image | SARAGAGLIA | Dominique | Chir. Orthopédique et Traumatologique |
| FAURE | Claude | Anatomie | SCHAERER | René | Cancérologie |
| FAVRO'T | Marie C. | Cancerologie CLB Lyon | SEIGNEURIN | Daniel | Histo.embryo. cytogénét. Reproduction |
| FEUERSTEIN | Claude | Physiologie | SEIGNEURIN | J. Marie | Bactério-Viro - Hygiène. |
| FOURNET | Jacques | Hépto-Gastro-Entéro. | SELE | Bernard | Biologie du Développement et de la Reproduction |
| FRANCO | Alain | Médecine. Interne | SOTTO | J. Jacques | Hématologie et Transfusion |
| FRANCOIS | Patrice | Épidém., Écon. de la Sant. et Prévention. | STAHL | J. Paul | Maladies Infect. et Trop. |
| GARNIER | Philippe | Pédiatrie | VANZETTO | Gérald | Clin./Urgences Cardio. |
| GIRARDET | Pierre | Anesth. et Réa. Chir. | VIALTEL | Paul | Néphrologie |
| GOULLIER-FLEURET | Andrée | Parasitologie et Mycologie | VROUSOS | Constantin | Radiothérapie |
| GUIDICELLI | Henri | Chirurgie Vasculaire | VUILLEZ | J.-Philippe | Biophys./Méd. Nucléaire |
| GUIGNIER | Michel | Réanimation Médicale | ZARSKI | J. Pierre | Hépto-Gastro-Entérol. |
| HADJIAN | A.-Jean | Biochimie et biol. Mol | | | |
| HALIMI | Serge | Nutrition | | | |



Serment des Apothicaire

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



Je voudrais remercier

Madame le professeur Anne-Marie ROUSSEL,

pour son accueil et sa disponibilité lors de la réalisation de ce travail,
et qui m'a fait l'honneur d'accepté la présidence du jury de cette thèse.

Madame le docteur Véronique DUCROS,

Pour l'aide et la gentillesse dont elle a fait preuve tout au long de ce travail

Monsieur le Professeur Xavier LEVERVE,

qui a accepté de juger dans ce jury.

Monsieur le Docteur François LAPORTE,

qui a été à l'origine de ce travail,
et dont la patience, la confiance et l'encadrement apporté ont permis sa
réalisation.

Je tiens à associer à ces remerciements les étudiants et les membres du LBSO, ainsi
que tout le personnel hospitalier qui m'a aidé dans ce travail.

Ainsi que Isabelle Bureau, Isabelle Hininger, M Othman et M Zarban pour leur aide
quotidienne.

A mes parents pour leur soutien et leur aide au cours de mes années d'études

A ma sœur Valérie et toute sa famille

A mes grands parents

A Isabelle

A tout mes amis.

| | |
|---|-----------|
| LISTE DES ABREVIATIONS..... | 4 |
| A INTRODUCTION..... | 5 |
| B BIBLIOGRAPHIE | 7 |
| I L'Athérosclérose | 7 |
| I-1 Définition..... | 7 |
| I-2 Rôle des lipoprotéines dans l'athérosclérose | 8 |
| I-2-1 Perméabilité de l'endothélium aux lipides..... | 8 |
| I-2-2 Formation des cellules spumeuses..... | 8 |
| II Les LDL..... | 11 |
| II-1 Composition et origine des LDL | 11 |
| II-2 Oxydation des LDL | 14 |
| II-2-1 Mécanisme d'oxydation des LDL | 14 |
| II-2-2 Oxydation <i>in vitro</i> des LDL | 16 |
| II-2-3 Oxydation <i>in vivo</i> des LDL | 17 |
| 1) Oxydation par les métaux de transition | 18 |
| 2) Oxydation par la lipoxygénase | 19 |
| 3) Oxydation par la myéloperoxydase | 19 |
| 4) Oxydation par le NO | 20 |
| II-3 Propriétés biologiques des LDL oxydées | 20 |
| III Rôle antiathérogène des antioxydants..... | 23 |
| III-1 Mécanismes d'action des antioxydants..... | 23 |
| III-2 Épidémiologie | 25 |
| IV Propriétés antioxydantes du sélénium..... | 27 |
| IV-1 Généralités | 27 |
| IV-2 Formes du sélénium dans l'organisme..... | 28 |
| IV-2-1- Absorption et incorporation du sélénium | 28 |
| 1) Incorporation de la sélénométhionine dans les protéines..... | 29 |
| 2) Incorporation de la sélénocystéine dans les protéines | 30 |
| IV-2-2 Propriétés antioxydantes des sélénoprotéines..... | 31 |
| 1) Les glutathions peroxydases (GPX) | 31 |
| 2) La thioredoxine réductase (TR)..... | 32 |
| 3) La Sélénoprotéine P (Se P)..... | 33 |
| IV-3 Statut en sélénium et maladies cardio-vasculaires..... | 33 |

| | |
|---|-----------|
| IV-3-1 Sélénium et bilan lipidique | 34 |
| IV-3-2 Sélénium et glutathion peroxydase | 35 |
| IV-3-3 Effet antioxydant du sélénium | 35 |
| IV-4 Sélénium et lipoprotéine | 36 |
| C MATÉRIEL ET MÉTHODE | 39 |
| I Oxydation des LDL..... | 39 |
| I-1 Recueil du plasma..... | 39 |
| I-2 Isolement des LDL..... | 39 |
| I-3 Oxydation des LDL | 40 |
| I-4 Mesure des diènes conjugués..... | 41 |
| I-5 Produits testés | 42 |
| I-6 Enrichissement du plasma en sélénocystine et en Ebselen..... | 44 |
| II Mise en évidence de la formation d'un complexe..... | 44 |
| II-1 Spectre d'absorption dans l'ultra violet..... | 44 |
| II-2 Etude des complexes du Cu par Résonance Paramagnétique Electronique | 44 |
| II-3 Evaluation de l'activité oxydo-réductrice des complexes de cuivre | 45 |
| III Etude du quenching de fluorescence du tryptophane par le cuivre..... | 45 |
| IV Mesure de l'activité glutathion peroxydase des composés | 46 |
| V Etude de la capacité "scavenger" de radicaux libres des composés..... | 47 |
| D RESULTATS | 49 |
| I Effet des molécules séléniées sur l'oxydation des LDL par le cuivre..... | 49 |
| I-1 Oxydation par le cuivre..... | 49 |
| I-2 Oxydation des LDL par le Cu après enrichissement du plasma en sélénocystine et en Ebselen | 51 |
| II- Résultats en faveur de la formation de complexes | 54 |
| II-1 Effet de l'augmentation de la concentration en cuivre..... | 54 |
| II-2 Oxydation par l'AAPH..... | 57 |
| II-3 Spectre d'absorption dans l'ultra-violet | 59 |
| II-4 Signal RPE..... | 62 |
| III Diminution de la fluorescence du tryptophane..... | 65 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| IV | Mesure de l'activité glutathion peroxydase | 66 |
| V | Activité "scavenger" de radicaux libres | 67 |
| VI | Effet de la complexation sur l'activité oxydo-reductrice du cuivre | 68 |
| E | DISCUSSION | 70 |
| I | Effet antioxydant | 70 |
| II | Formation de complexes | 71 |
| | II-1 Formation de complexes par les acides aminés..... | 72 |
| | II-2 Formation de complexes avec l'ebselel..... | 73 |
| III | Effet " scavenger " de radicaux libres | 74 |
| | III-1 Pour les acides aminés | 74 |
| | III-2 Effet de l'ebselel..... | 75 |
| IV | Activité glutathion peroxydase | 75 |
| | IV-1 Effet des acides aminés..... | 75 |
| | IV-2 Effet de l'ebselel | 76 |
| V | Interaction avec le trolox | 77 |
| F | CONCLUSION | 79 |
| H | REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 81 |

LISTE DES ABREVIATIONS

- AAPH : 2,2'-azobis (amidinopropane hydrochloride)
ABTS : 2,2' azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate)
ADN : acide désoxyribo nucléique
Apo : apolipoprotéine
Cu : cuivre
CML : cellules musculaires lisses
Cys : cystéine
DMSO : diméthyl sulfoxide
Ebs : ebselen
EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique
GPx : glutathion peroxydase
LDL : « Low density lipoprotein » lipoprotéine de basse densité
LDL ox : LDL oxydées
M : molaire
MDA : malonaldialdéhyde
Met : méthionine
PBS : phosphate buffered saline
RPE : résonance paramagnétique électronique
Se : sélénium
Toco : tocophérol
UV : ultra violet
Vit : vitamine
VLDL : « very low density lipoprotein » lipoprotéine de très basse densité

A INTRODUCTION

La production de radicaux libres oxygénés par les organismes est une conséquence directe de l'adaptation de leur métabolisme à la vie en aérobiose. Les radicaux libres sont des espèces chimiques possédant un électron célibataire. Cette particularité leur confère une réactivité susceptible de générer des réactions en chaînes. Cette réactivité permettra leur participation dans l'organisme à des processus biologiques tel que la phagocytose ou la régulation de l'expression des gènes. Cependant cette réactivité est aussi à l'origine des effets délétères des radicaux libres.

Les radicaux libres peuvent provoquer des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides) mais aussi des lésions secondaires dues à la toxicité des produits issus de l'oxydation. Pour se préserver des effets délétères des radicaux libres, l'organisme dispose d'un ensemble de défenses, dont les micronutriments antioxydants (vitamine E, vitamine C, bêta-carotènes, zinc, sélénium) et des enzymes tel que la superoxyde dismutase ou la glutathion peroxydase.

Ce système de régulation peut être dépassé en cas de surproduction de radicaux libres ou de diminution des systèmes de défense antioxydants. Ce déséquilibre entre la production de radicaux libres et les systèmes antioxydants est retrouvé dans de nombreuses pathologies dont l'athérosclérose. Cette constatation a aboutit à l'hypothèse que le stress oxydant pouvait être une étiologie de l'athérosclérose. L'oxydation des lipoparticules jouerait un rôle prépondérant dans le développement de la maladie. L'explication de la physiopathologie de l'athérosclérose, par le stress oxydant, a permis de proposer de nouveaux schémas thérapeutiques basés sur les propriétés antioxydantes de molécules.

Le sélénium est un oligo-élément impliqué dans les mécanismes de défense contre le stress oxydant. Par son incorporation au sein de la glutathion peroxydase, il va permettre le catabolisme des peroxydes lipidiques. Une faible fraction de sélénium plasmatique se retrouve dans une certaine partie de lipoparticules, les LDL, fraction de lipoparticules dont l'augmentation plasmatique est considérée comme un facteur de risque majeur de l'athérosclérose.

D'autre part des travaux préliminaires, réalisés par l'équipe de Mr Laporte, ont montré que les dérivés séléniés organiques étaient capables, *in vitro*, de présenter un effet protecteur vis à vis de l'oxydation des LDL par le Cu.

Après un rappel bibliographique présentant, l'état de la question, nous exposerons la partie expérimentale de notre travail mise en place pour répondre à nos objectifs qui sont:

- * Confirmer le rôle antioxydant des acides aminés sélénisés
- * Expliquer par quel mécanisme ses composés agissent
- * Comparer les effets des acides aminés sélénisés par rapport aux acides aminés soufrés.

B BIBLIOGRAPHIE

I L'ATHEROSCLEROSE

I-1 DEFINITION

L'organisation mondiale de la santé définit l'athérosclérose comme: «une association variable de modifications de l'intima des artères consistant en une accumulation locale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, un développement de tissus fibreux et des dépôts calcaires, le tout associé à des modifications de la media».

Cette définition situe la maladie comme une atteinte de l'intima des artères pouvant aboutir à des remaniements de la media. Les remodelages des constituants de la paroi artérielle vont aboutir à des modifications des propriétés biologiques et mécaniques des vaisseaux (Bonnet 1997).

Différentes populations cellulaires sont impliquées dans la constitution des plaques d'athérosclérose:

- Les cellules musculaires lisses issues de la migration et de la prolifération de ces cellules à partir de la media
- Les macrophages provenant du recrutement et de la migration trans-endothéliale des monocytes de la circulation sanguine.
- Les lymphocytes T4 et T8 d'origine plasmatique.

Un autre type cellulaire a été isolé au niveau des plaques, il s'agit des cellules spumeuses chargées de lipides. Ces cellules ont une double origine. Elles proviennent de la transformation des macrophages et des cellules musculaires lisses, cette transformation étant causée par la phagocytose et l'accumulation des lipides dans ces cellules (Brown 1986).

Les cellules endothéliales, bien que n'étant pas incluses dans les plaques, ont un rôle important dans la constitution et l'évolution de celles-ci. Les lipides vont provoquer des modifications des propriétés biologiques de ces cellules avec l'apparition d'un phénotype proathérogène (Demuth 1995).

Le développement des plaques d'athérosclérose peut être responsable d'accidents vasculaires dramatiques. Parmi les nombreux facteurs de risques, favorisant le développement de l'athérosclérose, les dyslipoprotéïnémies sont l'un des plus importants.

I-2 ROLE DES LIPOPROTEINES DANS L'ATHEROSCLEROSE

I-2-1 Perméabilité de l'endothélium aux lipides

Une corrélation positive existe entre la concentration plasmatique en cholestérol-LDL et l'importance des stries lipidiques. La barrière endothéliale ne constitue pas un obstacle pour les lipoprotéines, à l'exception des chylomicrons. Cette perméabilité de l'endothélium est liée au transport des lipides par transcytose endothéliale. Ce mécanisme est non saturable et va entraîner la libération et l'accumulation des lipides dans l'espace sous-endothélial. Les lipides libérés dans cet espace ne seront plus protégés par les antioxydants plasmatiques et pourront être plus facilement oxydés (Demuth 1995).

I-2-2 Formation des cellules spumeuses

La formation des cellules spumeuses est liée à la captation et à l'accumulation des lipides, contenus dans les LDL, par les macrophages et les cellules musculaires lisses. Cependant l'expérimentation *in vitro* a montré que la simple incubation des LDL natives, même à forte concentration, avec les macrophages ou les cellules musculaires lisses, n'était pas suffisante pour générer des cellules spumeuses.

Les travaux de Brown et Golsteine (Brown 1986) ont montré que les LDL natives étaient captées par les cellules grâce aux récepteurs au Apo B/E. L'expression de ces récepteurs est régulée par la concentration intra cellulaire en cholestérol. Une augmentation de cette concentration va entraîner une diminution du nombre de récepteurs évitant ainsi l'accumulation intra cellulaire du cholestérol. La formation des cellules spumeuses met en jeu un autre type de récepteurs: les récepteurs scavengers.(figure n°1)

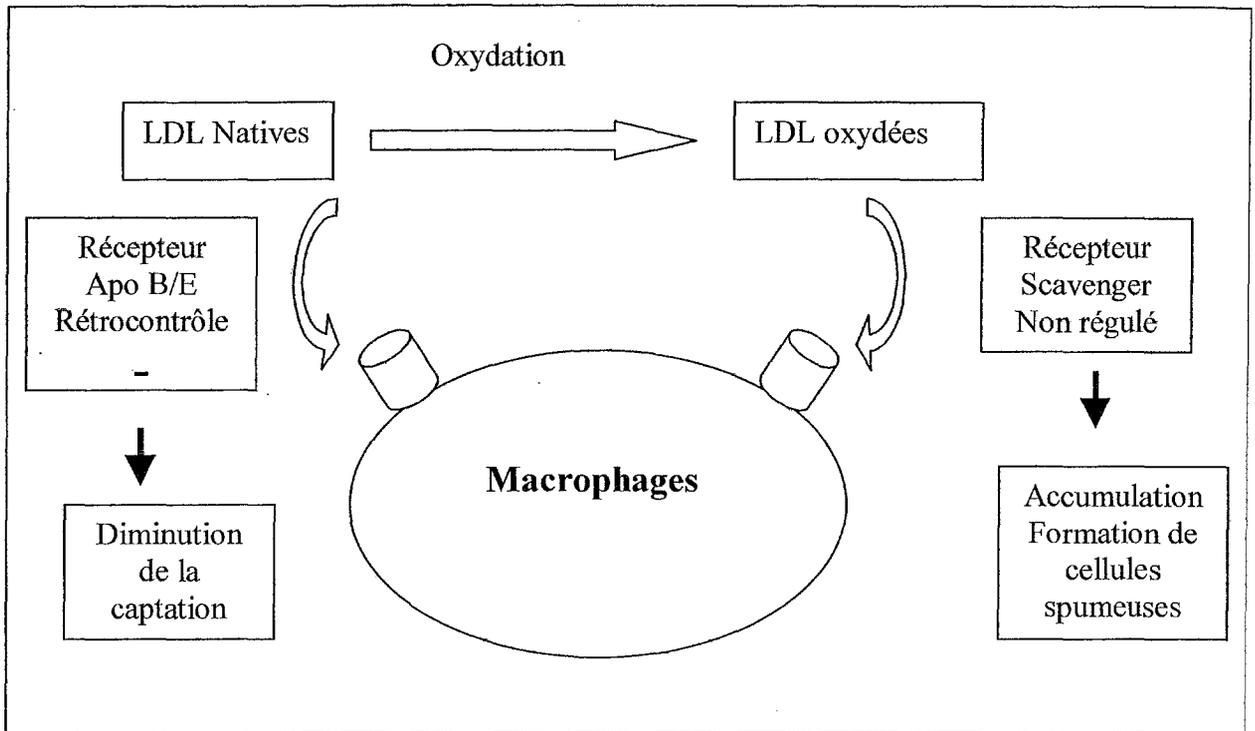


Figure n°1 : Récepteurs des macrophages aux LDL natives et oxydées

Ces récepteurs vont capter les LDL présentant une modification structurale empêchant leur reconnaissance par le récepteur des Apo B/E. Ils ne sont pas soumis à un rétrocontrôle négatif par la concentration intra cellulaire en cholestérol. La non-régulation des récepteurs va être à l'origine de l'accumulation des lipides dans les macrophages et les cellules musculaires lisses et de leur transformation en cellules spumeuses. (figure n°2)

L'hypercholestérolémie constitue un important facteur de risque de l'athérosclérose. Il n'existe pas de valeur seuil à partir de laquelle le risque de maladie cardiovasculaire apparaît. Cette notion a abouti à la définition d'une valeur cible de 2 g/l pour laquelle le risque est tolérable. A côté de la cholestérolémie, il est important de regarder la répartition du cholestérol dans les différentes lipoprotéines.

Ainsi, le risque cardio-vasculaire devient important pour un taux de cholestérol-LDL > 1,4 g/l.

Le rôle des triglycérides dans le processus athérogène est plus controversé. Mais une triglycéridémie supérieure à 2 g/l a été retenue comme étant un facteur de risque de maladies cardiovasculaires. Le type d'acide gras consommé a son importance, une alimentation riche en acides gras saturés sera plus préjudiciable qu'une alimentation riche en acides gras insaturés.

Le type d'alimentation est donc un facteur essentiel dans le développement des maladies cardio-vasculaires. Les populations ayant une alimentation de type méditerranéenne riche en fruits et en graisse d'origine végétale (huile d'olive) présentent souvent un risque d'accidents cardio-vasculaires moindre que les populations consommant une alimentation riche en graisse d'origine animale. Cependant l'origine des graisses n'est pas le seul facteur intervenant dans l'effet protecteur. La teneur en antioxydants lipophiles, tel que la vitamine E, contenue dans l'alimentation est un paramètre important.

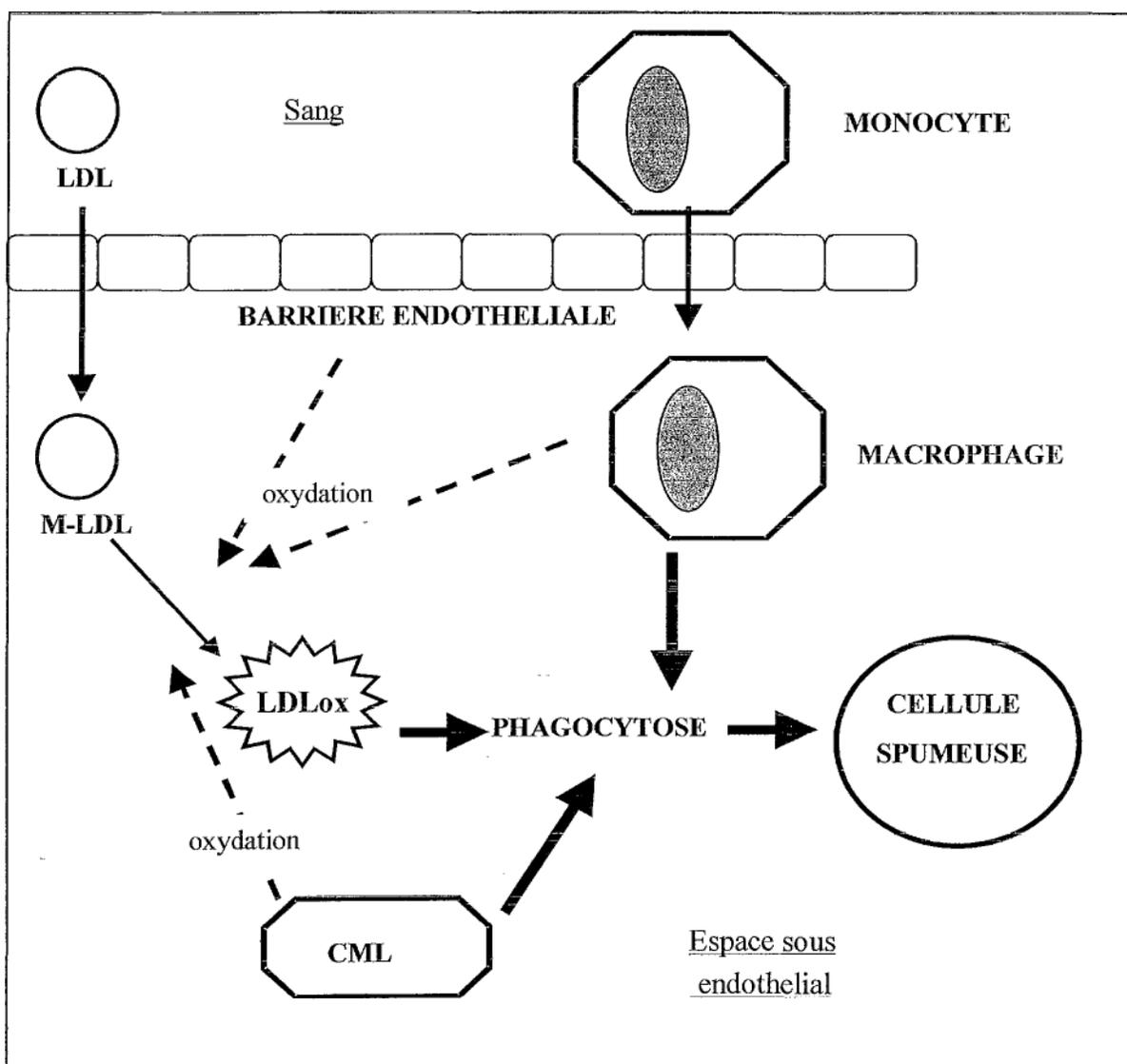


Figure n° 2: LDL ox et formation des cellules spumeuses

LDL ox : LDL oxydées ; M LDL : LDL modifiées ; CML : cellule musculaire-lisse

II LES LDL

II-1 COMPOSITION ET ORIGINE DES LDL

Les LDL sont issues de l'hydrolyse des triglycérides des VLDL par la lipoprotéine lipase présente sur la membrane des cellules endothéliales des vaisseaux. Parallèlement à la perte des triglycérides la composition en apoprotéines des VLDL change. Les VLDL perdront les Apo A et C de sorte que l'Apo B soit la seule apoprotéine contenue dans les LDL (figure n°3).

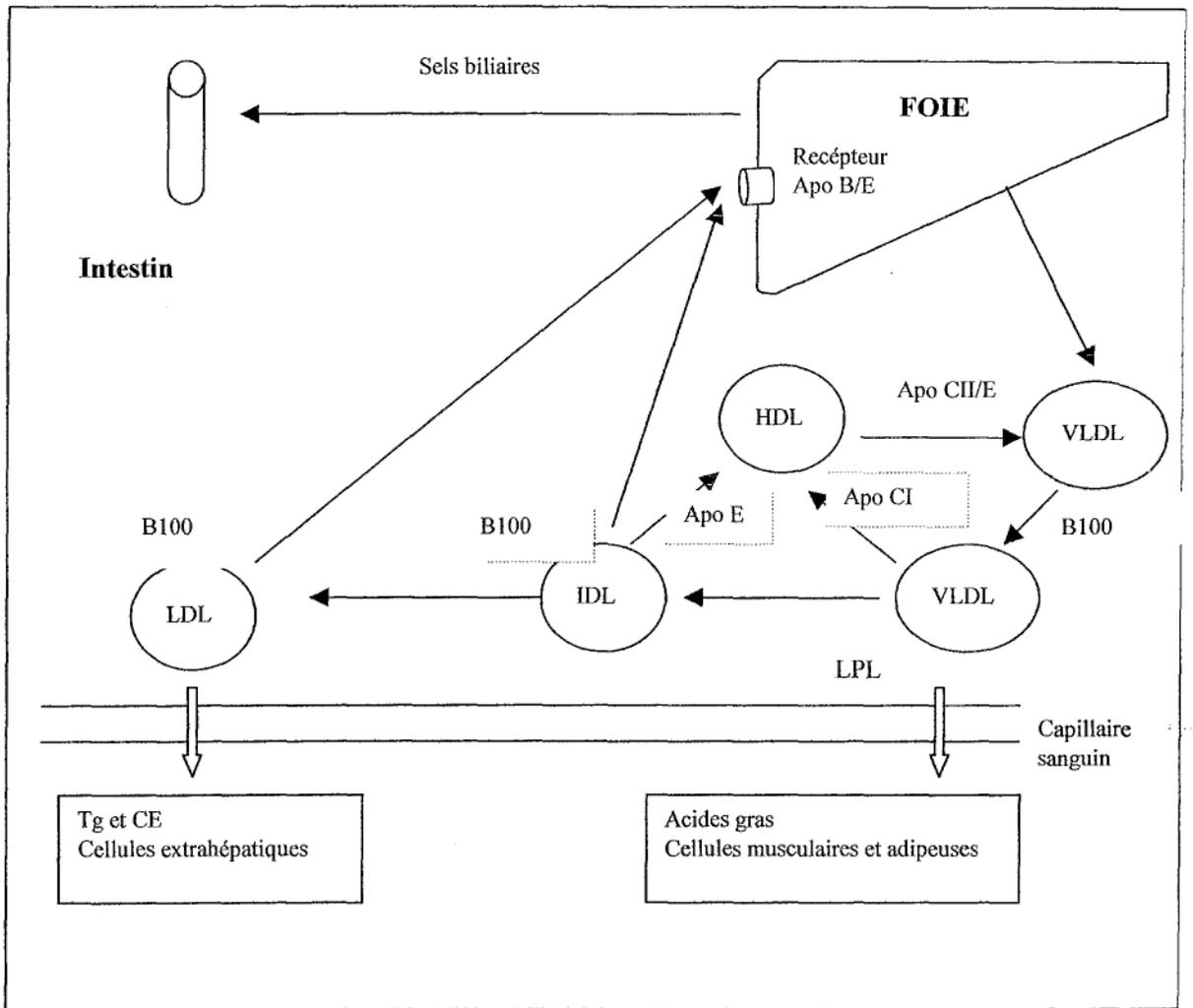


Figure n°3 Métabolisme des lipoprotéines VLDL et LDL

Tg : triglycérides ; CE : cholestérol esterifié, LPL : lipo protéine lipase

Les LDL ont une densité comprise entre 1,019 et 1,063 g/ml. En fonction de leur densité, différentes sous populations de LDL, au pouvoir athérogène différent, ont pu être

isolées : les LDL, de petite taille et de densité élevée, étant considérées comme plus athérogènes.

L'Apo B-100 représente 20 à 25 % de la masse totale d'une LDL, le cholestérol libre 7 à 10 %, le cholestérol estérifié 35 à 40 %, les triglycérides 6 à 10 % et les phospholipides 20 à 24 %. Les LDL transportent 2/3 du cholestérol circulant et plus de 90% de l'Apo B-100 plasmatique. Les LDL possèdent aussi dans leur structure des antioxydants lipophiles tel que la vitamine E, dans la proportion de 6 molécules α tocophérol par LDL en moyenne, mais aussi des carotènes et de l'ubiquinol 10 (Esterbauer 1992). Tableau n°1

| CONSTITUANT | MOLE/PARTICULES | % POIDS |
|-----------------------------|-----------------|---------|
| * Protéine | | |
| -Apo B 100 (4536 AA) | 1 | 20 |
| * Lipides | | |
| - <u>core</u> | | |
| .esters de cholestérol | 1600 | 42 |
| .dont avec AG insaturés | 1165 | |
| .triglycérides | 180 | 6 |
| .dont avec AG insaturés | 50 | |
| - <u>de surface</u> | | |
| .phospholipides | 700 | 22 |
| dont avec AG insaturés | 375 | |
| .cholestérol | 600 | 10 |
| - <u>acides gras totaux</u> | 2700 | |
| dont insaturés | 1590 | |
| * antioxydants | | |
| - α tocophérol | 6-12 | |
| - γ tocophérol | 0.5 | |
| - ubiquinol 10 | 0.5-0.8 | |
| - lycopène | 0.2-0.7 | |
| - β carotène | 0.1-0.4 | |

Tableau n°1 : Composition moyenne des LDL, d'après Esterbauer 1992

II-2 OXYDATION DES LDL

II-2-1 Mécanisme d'oxydation des LDL

Le terme « LDL oxydées » regroupe une population hétérogène de LDL dont les parties lipidiques et protéiques ont été modifiées par un mécanisme oxydant. Ces LDL oxydées se caractérisent d'un point de vue physico-chimique par :

- * une augmentation de leur densité
- * une augmentation de leur charge négative
- * une diminution du rapport lipides/protéines
- * une dégradation de l'Apo B100
- * l'apparition de nouveaux composés issus de l'oxydation des triglycérides et du cholestérol.

Ces modifications vont être à l'origine de l'apparition de nouvelles propriétés biologiques, responsables des propriétés athérogènes de ces LDL (Holvoet 1994).

Des facteurs intrinsèques vont moduler la susceptibilité des LDL à être oxydées. Cette capacité à être oxydé va dépendre :

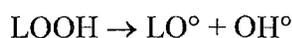
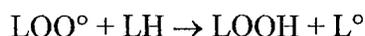
- du contenu en antioxydant des LDL
- de la composition et de la localisation de leurs acides gras polyinsaturés
- de la taille des LDL, les LDL denses et de petite taille étant oxydées plus facilement.

Parallèlement des facteurs extrinsèques aux LDL tel que la capacité antioxydante du sérum, la teneur en vitamine C, l'existence d'un état inflammatoire vont influencer l'oxydation des LDL.

L'oxydation des LDL met en jeu un processus radicalaire aboutissant à la modification des constituants des LDL. Plusieurs étapes sont distinguées dans le phénomène d'oxydation: figure n°4



-Réarrangement : formation de diènes conjugués



-Terminaison : $\text{LOO}^\circ + \text{L}^\circ + \text{LO}^\circ \rightarrow$ Produits non radicalaires

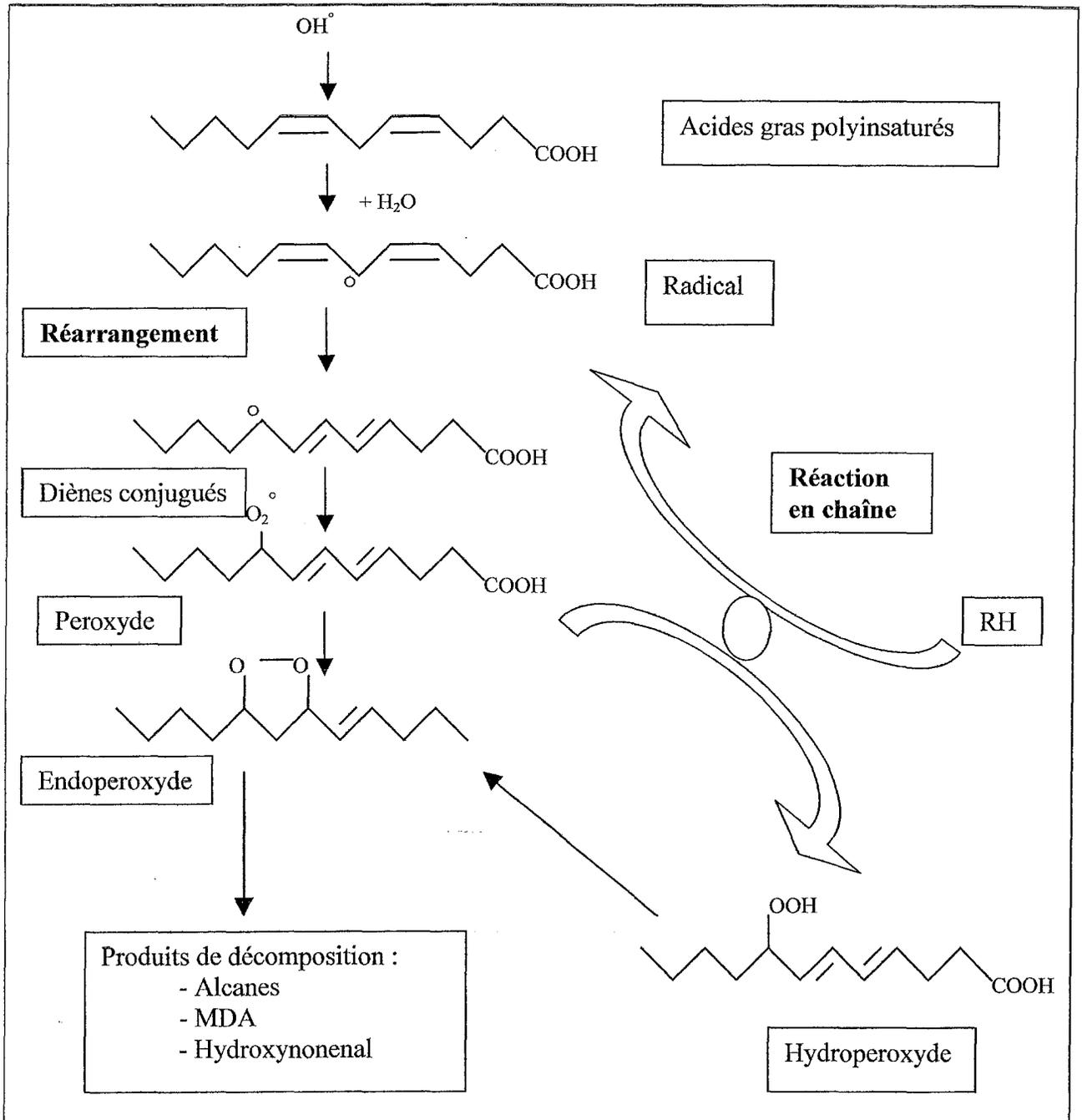


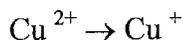
Figure n°4: Principales étapes de la peroxydation lipidique (Favier 1997)

L'oxydation des LDL débute par la dégradation des acides gras polyinsaturés aboutissant à la formation d'aldéhydes tel que le malondialdéhyde (MDA) ou le 4 hydroxynonanal. Ces composés, très réactifs pourront se lier avec la partie protéique des LDL, l'Apo B100, aboutissant à la modification des épitopes de la protéine et à leur non

reconnaissance par les récepteurs à Apo B/E mais aussi à l'apparition de propriétés antigéniques ou à la cassure de la protéine. Le cholestérol présent dans les LDL sera aussi oxydé aboutissant à la formation d'oxystérols (Esterbauer 1992).

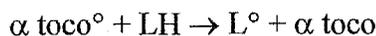
II-2-2 Oxydation *in vitro* des LDL

In vitro de nombreux modèles ont été développés pour oxyder les LDL, des systèmes enzymatiques (Peroxydase, lipoxygenase), des systèmes cellulaires (cellules endothéliales, musculaires lisses, monocytes), des systèmes physiques (U.V.) et des systèmes chimiques tels que des azoinitiateurs (AAPH) ou des ions métalliques notamment le cuivre (Rice evans 1996). Ces deux derniers composés vont entraîner l'oxydation des LDL par des mécanismes différents. Pour le Cu son action oxydante nécessite au préalable sa fixation sur l'Apo B (Kuzuya 1992) puis sa réduction en Cu^+ (Lynch 1995). Le Cu agirait avec les peroxydes selon une réaction de Fenton :

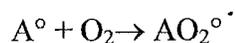
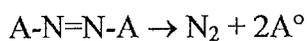


Les radicaux LO° initieraient la peroxydation lipidique.

Cependant une autre hypothèse est proposée faisant intervenir non plus les peroxydes lipidiques éventuellement présents mais l'alpha tocophérol (Wagner 1997):



L'AAPH est un azoinitiateur hydrosoluble qui, sous l'action de la chaleur et de la lumière, va générer des radicaux capables d'initier la peroxydation lipidique. Contrairement au Cu, l'AAPH ne nécessite pas la présence préalable de peroxydes pour entraîner la l'oxydation des lipides. (Niki 1990).



II-2-3 Oxydation *in vivo* des LDL

L'existence plasmatique de LDL oxydées reste controversée à cause des possibles artefacts survenant lors de l'isolement des LDL. Le pouvoir antioxydant du plasma et la capacité d'épuration plasmatique du foie semble limiter leur existence à la paroi artérielle. Cependant divers arguments attestent de leur présence (Ferriere 1992) :

- des anticorps dirigés contre des LDLox ont montré une réactivité envers les lésions athéroscléreuses,
- les LDL extraites de lésions d'athérosclérose présentent des propriétés physico-chimiques identiques aux LDLox,
- l'homme présente des anticorps circulants dirigés contre les LDL oxydées.

Bien que les systèmes impliqués *in vivo* dans l'oxydation des LDL ne soient pas encore totalement élucidés, plusieurs mécanismes ont été proposés. D'après Heinecke l'oxydation passerait par des mécanismes enzymatiques impliquant notamment la myéloperoxydase ou la lipoxigénase ou des ions métalliques. L'oxydation des LDL pourrait mettre en jeu plusieurs mécanismes. Ces mécanismes intervenant aux différents stades d'évolution des lésions (Figure n°5 Heineck 1997).

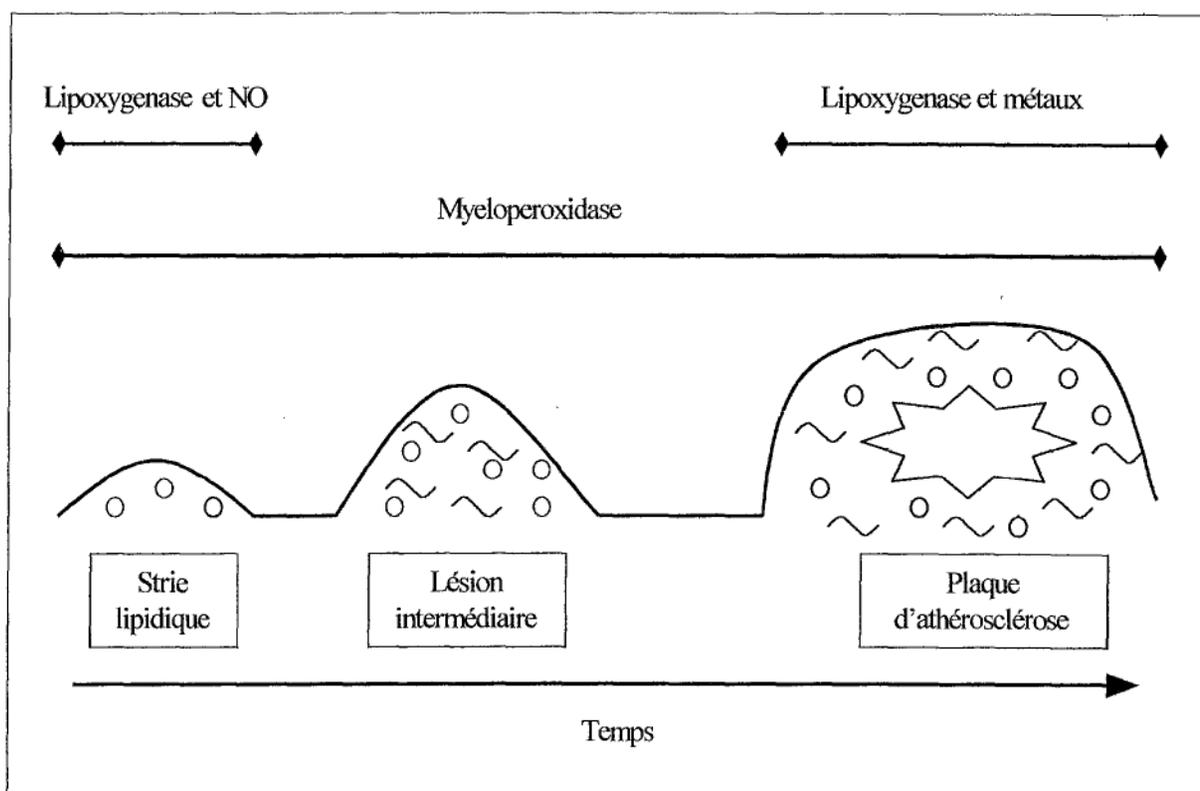


Figure 5 : Cinétique d'intervention des différents systèmes prooxydants dans la constitution des plaques d'athérosclérose (Heinecke 1997).

1) Oxydation par les métaux de transition.

Les propriétés oxydantes des métaux de transition sur les LDL sont très fréquemment utilisées lors d'expériences d'oxydation *in vitro* des LDL. Plusieurs faits laissent penser que les métaux pourraient jouer un rôle dans l'oxydation *in vivo* des LDL :

- L'oxydation *ex vivo* des LDL par les cellules musculaires lisses nécessite des traces de cuivre ou de fer. La présence de chélateurs de métaux provoque l'arrêt de l'oxydation des LDL.
- Les prélèvements de tissus effectués au niveau des plaques d'athérosclérose contiennent des traces de métaux, cependant il n'est pas exclu que ces traces proviennent d'une contamination lors du prélèvement.

En fait l'oxydation, *in vivo*, par les métaux de transition n'interviendrait que dans des lésions d'un stade avancé. Par ailleurs les enquêtes épidémiologiques n'ont pas établie de lien entre les concentrations en métaux de transition et le risque de maladies cardiovasculaires (Ascherio 1994).

2) Oxydation par la lipoxygénase

La lipoxygénase est une enzyme cytosolique impliquée dans la synthèse des leucotriènes à partir des acides gras polyinsaturés. Cette synthèse va s'accompagner de la génération de radicaux libres oxygénés prooxydants.

La lipoxygénase est capable d'oxyder les LDL *in vitro*.

De l'ARNm de la 15 lipoxygénase et de l'enzyme ont été retrouvés au niveau des lésions d'athérosclérose laissant penser que cette enzyme interviendrait dans l'oxydation *in vivo* des LDL.

Des métabolites spécifiques de l'activité de la lipoxygénase ont été retrouvés au niveau des plaques d'athérosclérose.

Les inhibiteurs de la lipoxygénase inhibent l'oxydation des LDL dans des cultures cellulaires.

3) Oxydation par la myeloperoxydase

La myeloperoxydase, autre enzyme présente au niveau des lésions d'athérosclérose semble susceptible elle aussi d'oxyder *in vivo* les LDL. La myeloperoxydase est une enzyme lié au processus inflammatoire, or le développement de l'athérosclérose est favorisé par les mécanismes inflammatoires.

La myeloperoxydase intervient par l'intermédiaire des macrophages dans les mécanismes de phagocytose et est retrouvée au niveau des plaques d'athérosclérose associée aux cellules spumeuses. Des produits d'oxydation de cette enzyme ont été mis en évidence par immunohistochimie dans des plaques d'athérosclérose. En effet l'activation de cette enzyme va s'accompagner de la chloration des résidus tyrosine. Ces produits n'ont pas été retrouvés au niveau des LDL circulantes alors que leur concentration était multipliée par trente dans les LDL issues des plaques d'athérosclérose témoignant de la forte activité de cette enzyme au niveau des plaques.

4) Oxydation par le NO

Les radicaux dérivés du NO pourraient aussi intervenir dans l'oxydation *in vivo* des LDL. Bien que le NO présente des propriétés antiathérogènes, par son rôle comme vasodilatateur et anti-aggrégant plaquettaire, il peut par réaction avec des peroxydes former des peroxydes nitriques susceptibles d'oxyder les LDL. Or des produits d'oxydation issus de la réaction des LDL avec les peroxydes nitriques ont aussi été retrouvés dans les plaques d'athérosclérose. (figure n°6)

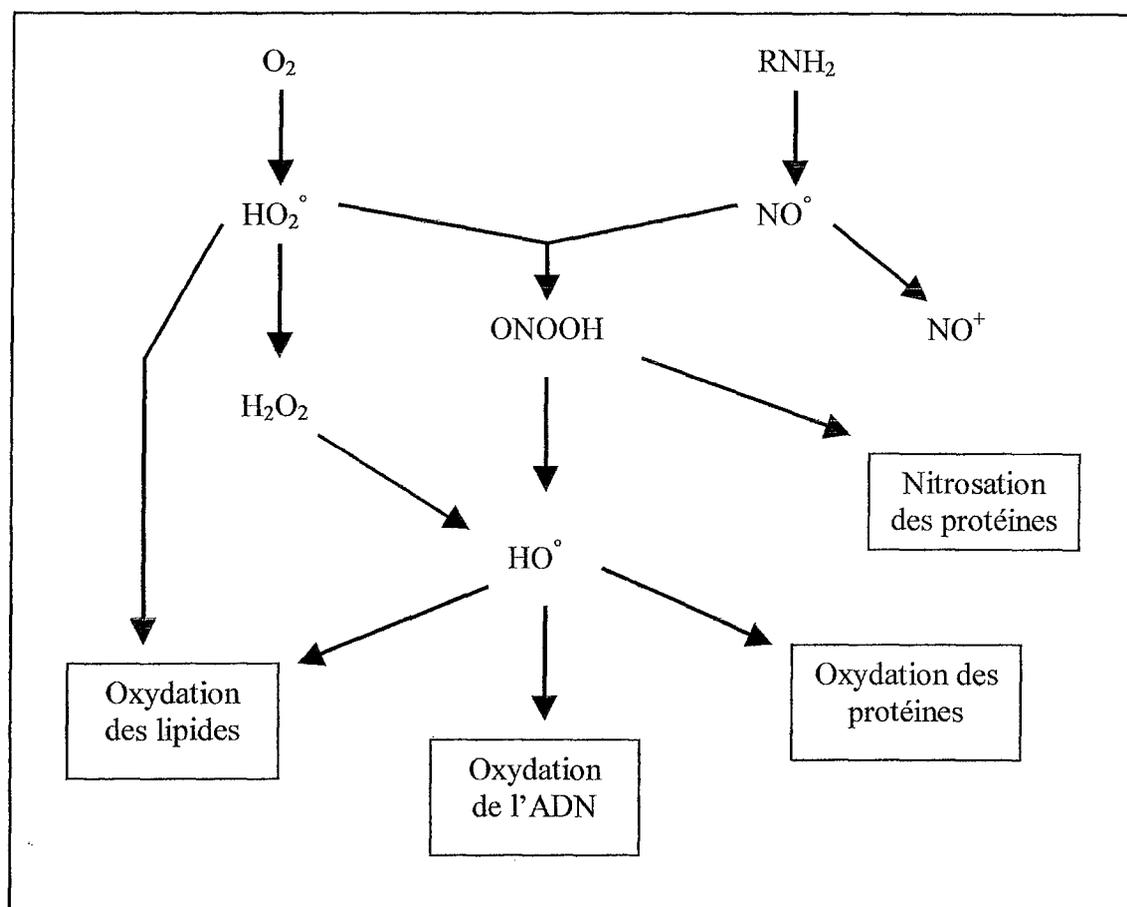


Figure n°6: Relation entre les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (Favier 1997)

II-3 PROPRIETES BIOLOGIQUES DES LDL OXYDEES

L'oxydation des LDL est à l'origine de leur acquisition de nouvelles propriétés biologiques. Ces nouvelles propriétés se manifestent de différentes manières sur le processus athérogène. (Demuth 1995) figure n°7

→ Formation de cellules spumeuses par non-reconnaissance liée à leur captation par les récepteurs scavengers.

→ Recrutement et adhésion des monocytes circulant aux cellules endothéliales.

Les LDLox présentent une action chimiotactique directe sur les monocytes circulants, par l'intermédiaire de leurs lysolécithines. Elles induisent la sécrétion d'un facteur chimiotactique spécifique des monocytes : la protéine MCP-1. Elles provoquent l'adhésion des leucocytes à la paroi artérielle en induisant l'expression des molécules d'adhésion VCAM-1 et ICAM-1 par les cellules endothéliales.

→ Modification des cellules de l'intima artérielle

Les LDLox inhibent la mobilité des macrophages présents dans l'intima. Elles induisent la sécrétion de facteurs de croissance hématopoïétiques entraînant la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses.

→ Modification du métabolisme de l'acide arachidonique

Les LDLox entraînent une diminution de la synthèse de prostacyclines en faveur des leucotriènes et des acides hydroxyéicosatétraénoïques, au niveau de la cellule endothéliale. Ce déséquilibre dans la synthèse du PGI₂ va se répercuter à plusieurs niveaux :

- modification des propriétés vasomotrices des vaisseaux et favorisant l'hypertension,
- altération des propriétés antithrombotiques de l'endothélium vasculaire.

→ Intervention dans les processus immunitaires et inflammatoires

Les LDLox présentent des propriétés immunogènes qui induisent la synthèse d'anticorps dirigés contre les épitopes des LDLox. Cette réponse immunitaire va favoriser la persistance d'un état inflammatoire au niveau des lésions athéromateuses.

→ Propriétés cytotoxiques

Les LDLox présentent une action cytotoxique sur les cultures cellulaires. *In vivo* cette cytotoxicité provoquerait une altération de la barrière endothéliale et contribuerait ainsi à l'accélération de la formation des lésions d'athérosclérose. tableau n°2

| Type de cellules | Effet direct | Conséquence |
|------------------|---|--|
| a) Endothéliales | <ul style="list-style-type: none"> * Synthèse de molécules d'adhésion * Synthèse de molécules chimiotactiques * Synthèse de facteurs de croissance hématopoïétique * Synthèse de facteurs de croissance * Sécrétion d'EDRF * Sécrétion de prostaglandines * Synthèse de protéines C et de facteur tissulaire * Diminution de la synthèse de t-PA et augmentation du PAI-1 | <ul style="list-style-type: none"> * Adhésion des monocytes * Migration des monocytes dans l'intima * Prolifération des monocytes * Prolifération des CML * Vasoconstriction et adhésion plaquettaire * Aggrégation plaquettaire * Génération de thrombine et coagulation * Diminution de la fibrinolyse |
| * Monocytes | <ul style="list-style-type: none"> * Synthèse de MCP-1 * Phagocytose * Favorise la présentation de l'antigène | <ul style="list-style-type: none"> * Chimiotactisme sur les monocytes * Formation de cellules spumeuses * Active la réponse immunitaire |
| * CML | <ul style="list-style-type: none"> * Chimiotactisme direct * Synthèse de PDGF * Synthèse de bFGF | <ul style="list-style-type: none"> * Migration des CML * Migration des CML * Prolifération des CML |

Tableau n°II : Effets des LDL ox sur les cellules de la paroi artérielle (Holvoet 1994)

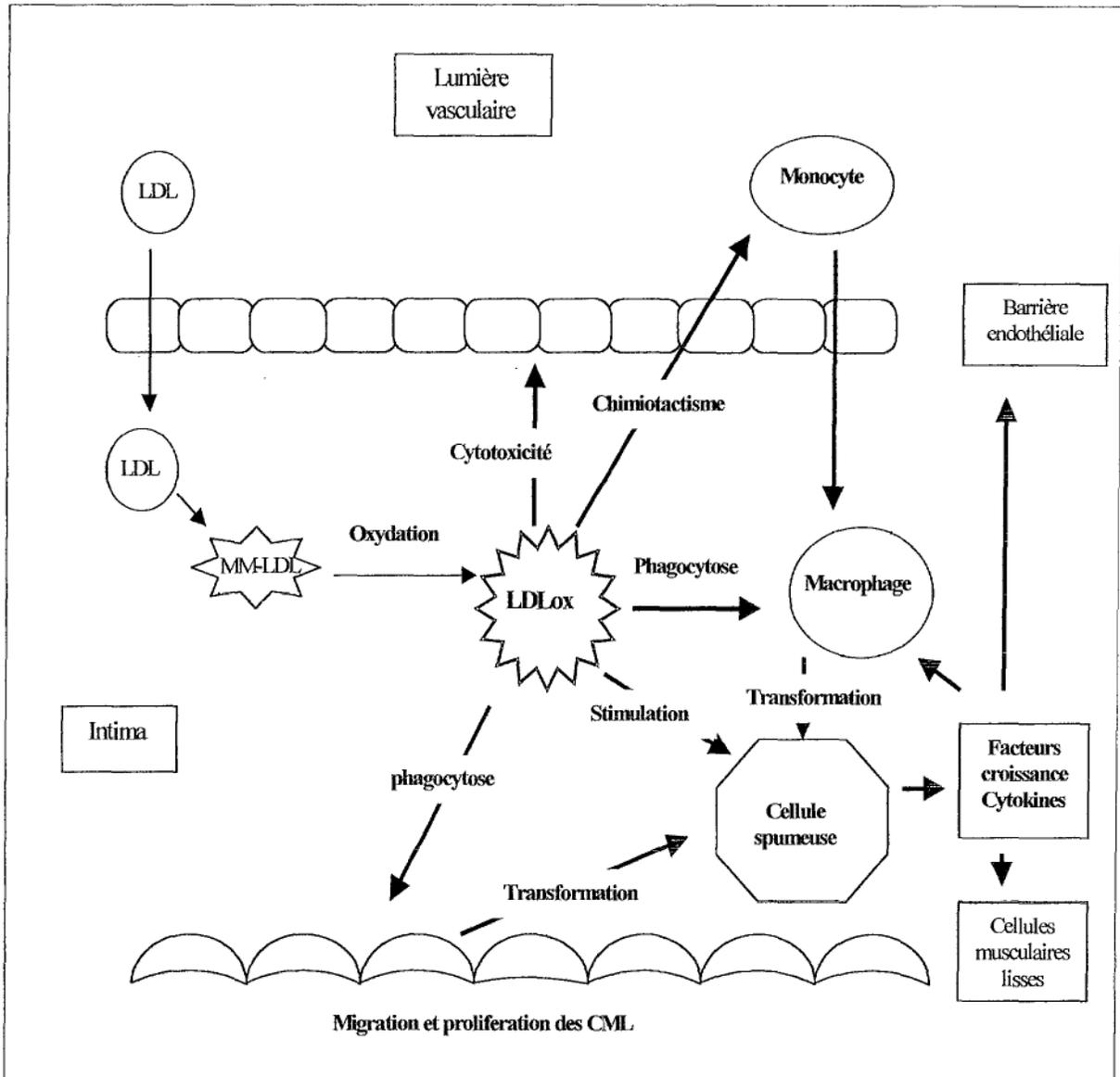


figure n°7 : Activité biologiques des LDL oxydées (Demuth 1995)

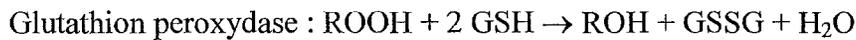
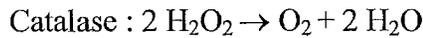
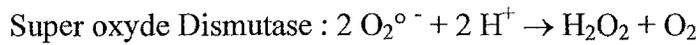
III ROLE ANTIATHEROGENE DES ANTIOXYDANTS

III-1 MECANISMES D'ACTION DES ANTIOXYDANTS

Un antioxydant est une substance susceptible de réagir avec les radicaux libres, pour stopper la propagation du processus d'oxydation et dont la transformation ou la disparition ne va pas être responsable d'une toxicité pour l'organisme. L'organisme dispose d'un ensemble de systèmes antioxydants destinés à limiter les effets pathogènes du stress oxydant. Ces systèmes antioxydants vont pouvoir agir à 2 niveaux :

a) Soit en amont du phénomène en inhibant la phase d'initiation :

* comme les enzymes antioxydantes qui vont réagir avec les groupements réactifs de l'oxygène inhibant ainsi la formation de radicaux libres réactifs.



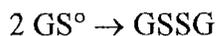
* ou en complexant les métaux de transitions (MT) capables de générer des radicaux libres par réaction avec des peroxydes selon la réaction de Fenton



In vivo ce rôle revient aux protéines de stockage comme la ferritine mais aussi aux protéines de transport comme l'albumine ou aux acides aminés en solution dans le plasma. *In vitro* de nombreux composés présentant des propriétés complexantes, comme l'EDTA, ont des capacités antioxydantes.

b) Soit en inhibant la phase de propagation.

Ce type d'antioxydant est appelé scavenger, ces produits vont réagir avec les radicaux pour stopper la propagation. Ceci est le cas de la vitamine E, des bêta-carotènes mais aussi du glutathion.



La répartition des antioxydants n'est pas uniforme dans l'organisme. En fonction de leur solubilité, ceux-ci auront différentes localisations dans l'organisme. Les antioxydants lipophiles vont se retrouver dans les membranes lipidiques des cellules ou associés aux lipoprotéines circulantes comme la vitamine E ou les bêta-carotènes. Les antioxydants hydrophiles par contre vont se retrouver dans le cytoplasme des cellules ou en solution dans le plasma comme la vitamine C ou le glutathion.

III-2 EPIDEMIOLOGIE

Les effets délétères des LDL sont liés à leur oxydation et cette oxydation est corrélée aux antioxydants présents dans les LDL. Il semble donc logique de penser que l'augmentation de la résistance à l'oxydation des LDL, par leur enrichissement en produits antioxydants, va permettre de limiter la formation de LDLox et leurs effets délétères. L'étude de la bibliographie montre qu'il n'est pas aussi simple d'associer effet antioxydant et bénéfice thérapeutique.

De nombreuses études épidémiologiques descriptives, cas-témoins et prospectives ont établi une corrélation négative entre la consommation de vitamines antioxydantes et la fréquence des maladies cardiovasculaires (Diaz 1997) tableau n°III. Aux vues de ces constatations la supplémentation en antioxydants peut sembler un moyen de protection contre l'athérosclérose. Pour le moment, seule la vitamine E a prouvé, par une étude randomisée en double aveugle, que sa consommation pouvait avoir un effet bénéfique vis-à-vis du développement de l'athérosclérose. (Stephens NG 1996). La supplémentation en antioxydant lipophile comme la vitamine E est, par ailleurs, associée à une augmentation de la résistance des LDL à l'oxydation in vitro (Reaven 1993).

Mais ce résultat ne peut être généralisé, la supplémentation en bêta-carotène, produit antioxydant et lipophile, n'a pas été associée à un effet bénéfique vis-à-vis des maladies cardiovasculaires (ATBC 1994 ; Hennekens 1996)

Si l'effet bénéfique des antioxydants sur l'athérosclérose est admis, les mécanismes par lesquels ces produits vont pouvoir agir sont variés. La résistance des LDL à l'oxydation n'est pas l'unique moyen d'action possible. Les produits antioxydants peuvent agir sur le métabolisme des cellules impliquées dans la constitution de la plaque d'athérosclérose et peuvent présenter un effet protecteur par ce biais. Les antioxydants vont notamment pouvoir influencer la stabilité de la plaque d'athérosclérose, mais vont aussi avoir un rôle dans la régulation du tonus vasculaire et l'activation plaquettaire. (revue Parthasarathy 1999 ; Kromhout 2000)

| ETUDES | POPULATIONS | CONCLUSIONS |
|---------------------------------------|---|--|
| -Descriptive | | |
| *Verlangieri | USA | Relation inverse entre la consommation de fruits et légumes et la mortalité cardiovasculaire |
| *Gey et Puska | 16 régions européennes | Relation inverse entre la concentration plasmatique moyenne en α tocophérol et la mortalité cardiovasculaire |
| -Cas témoins | | |
| *Riemersma | 110 patients avec angine et 394 témoins | Diminution de la concentration en Vit E chez les sujets angineux |
| *Ramirez et Flowers | 101 patients coronariens et 49 témoins | Diminution de la concentration leucocytaire en Vit C chez les coronariens |
| - Etudes prospectives | | |
| *Nurse health Study | 87245 nurses américaines | Relation inverse entre la survenue de coronaropathies et la consommation de Vit E |
| *Health professionals follow up study | 39910 homme americainz professionnels de la santé | Relation inverse entre la survenue de coronaropathies et la consommation de Vit E (chez le fumeur) et de bêta carotène |
| *NHANES | 11349 hommes et femmes américains | Relation inverse entre la mortalité cardiovasculaire et la consommation de Vit C |
| -Randomisée, double aveugle | | |
| *ATBC | 29133 finlandais fumeurs | Pas d'effet ni de la Vit E ni des beta carotènes sur les coronaropathies |
| *Physicians health study | 22071 physiciens americains | Pas d'effets des beta carotènes sur la survenue de coronaropathies |
| *CHAOS | 2002 britanniques avec une coronaropathie | 77% de réduction d'infarctus non mortel chez les sujets prenant de la Vit E par rapport aux témoins prenant un placebo |

Tableau n°III : Etudes épidémiologiques entre la consommation d'anti-oxydants et la survenue de coronaropathies (Diaz 1997)

IV PROPRIETES ANTIOXYDANTES DU SELENIUM

IV-1 GENERALITES

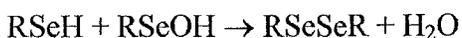
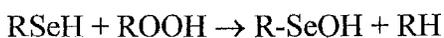
Le sélénium est un élément chimique découvert en 1817. Cet élément se caractérise par son hétérogénéité de répartition sur la surface terrestre. Cette hétérogénéité permet de distinguer des régions dites sélénoprives, tel que la Nouvelle Zélande la Finlande ou certaines régions de Chine, où la teneur des sols en sélénium est inférieure à 0,1 µg/g, et des régions sélénifères, comme le Canada ou les Etats-Unis, où la concentration des sols peut aller de 2 à 100 µg/g.

Son statut d'oligo-élément a été établi dans les années 1960 par la découverte de son implication dans certaines maladies de carence chez les animaux. Chez l'homme, toutes ses fonctions métaboliques ne sont pas encore établies. Cependant la présence de cet élément au sein du site actif de certaines enzymes, impliquées dans le métabolisme des radicaux libres, fait que le sélénium est considéré comme un élément essentiel dans la défense de l'organisme contre le stress oxydant.

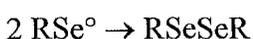
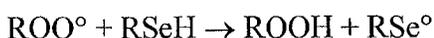
Le sélénium va présenter des propriétés physico-chimiques communes avec le soufre, notamment des états de valence identiques (-2 0 +2 +4). De part son homologie, le Se va pouvoir se substituer à celui-ci au niveau des acides aminés soufrés entraînant la formation de sélénométhionine et de sélénocystine (Chapuis 1991).

Les groupements sélénols (SeH) se différencient des groupements thiols (SH) par une acidité plus importante, responsable de la protonation des groupements SeH au pH physiologique. Le Sélénium présente aussi des propriétés oxydo-réductrices expliquant une partie de ces propriétés biologiques, notamment des propriétés antioxydantes (Ursini 1987) :

- Une action peroxydasique



- Une action donneur d'hydrogène



- Une action complexante vis à vis des métaux.

Les propriétés du sélénium vont être responsables de propriétés biologiques particulières des groupements sélénoles par rapport aux groupements thiols. Des expériences visant à remplacer les groupements sélénoles par des groupements thiols, dans des sélénoenzymes, ont montré que cette substitution provoquait une diminution d'activité de celles-ci. Cette diminution d'activité est liée à la plus faible activité catalytique des groupements thiols par rapport aux groupements sélénoles (Berry 1992).

IV-2 FORMES DU SELENIUM DANS L'ORGANISME

IV-2-1- Absorption et incorporation du sélénium

La valeur normale du sélénium plasmatique varie de 0,8 à 1,25 μM . Le sélénium présent dans l'organisme est apporté par l'alimentation. La teneur en Se d'un aliment va être dépendante de son origine géographique, les aliments issus des régions sélénoprivées auront un taux en sélénium plus faible que les aliments issus des régions sélénofécondes. L'imprégnation en sélénium des populations va être liée à l'origine géographique des aliments consommés.

L'absorption du Se est efficace et ne semble pas être soumise à un contrôle homéostatique. L'apport alimentaire du Sélénium se réalise majoritairement sous forme organique notamment sous forme d'acides aminés sélénoéthionine ou sélénoéthionine contenus dans les protéines alimentaires (Chappuis 1991).

Après absorption digestive, les formes inorganiques du sélénium sélénoates (SeO_4^{2-}) et sélénoites (SeO_3^{2-}) vont être réduites par les érythrocytes en sélénoide (H_2Se) avant d'être transportées par l'albumine aux différents tissus pour permettre son incorporation dans les sélénoéthionines.

Le Se ingéré va être métabolisé pour être incorporé dans la structure primaire des protéines sous forme d'acide aminé. Ces acides aminés sont la sélénoéthionine ou la sélénoéthionine. Les voies métaboliques permettant l'incorporation de ces acides aminés varient en fonction de l'acide aminé et de la forme de sélénium ingérée. Ces différences de voies métaboliques font, qu'en fonction de la nature du dérivé sélénoé ingéré, et du statut en sélénium de l'individu, les effets biologiques seront différents (Lynne 96 ; Leist 99).

Le sélénium peut aussi se fixer sur les protéines sans pour autant être incorporé dans la structure primaire des protéines. En effet le Sélénium peut former des ponts Se-S avec les groupements thiols libres des protéines et permettre ainsi sa fixation sur ces protéines.

Les autres formes organiques de sélénium que l'on retrouve dans l'organisme sont les formes méthylées du sélénium, di et trimethylsélénide, issues du catabolisme du sélénium et excrétées dans l'haleine et les urines.

1) Incorporation de la sélénométhionine dans les protéines

La sélénométhionine est incorporée par le même ARNt que la méthionine. La fixation d'une sélénométhionine à la place d'une méthionine, dans les protéines, est réalisée par compétition vis à vis de la méthionine. La proportion de fixation de la sélénométhionine est dépendante du rapport méthionine/sélénométhionine présent dans l'alimentation. Si ce rapport augmente, la proportion de sélénométhionine fixée diminue.

La quantité de sélénium incorporée, de manière non spécifique notamment dans les protéines musculaires, peut représenter jusqu'à 50% du pool total de sélénium de l'organisme. Ces protéines sont communément appelées protéines séléniées et constituent une forme de réserve de sélénium (Lynne 1996). Le sélénium, assimilé sous forme de sélénométhionine, pourra être réutilisé par l'organisme pour permettre la synthèse de sélénoprotéines, contrairement au sélénium inorganique, et peut donc être considéré comme une réserve de sélénium (Patterson 1993). figure n°8

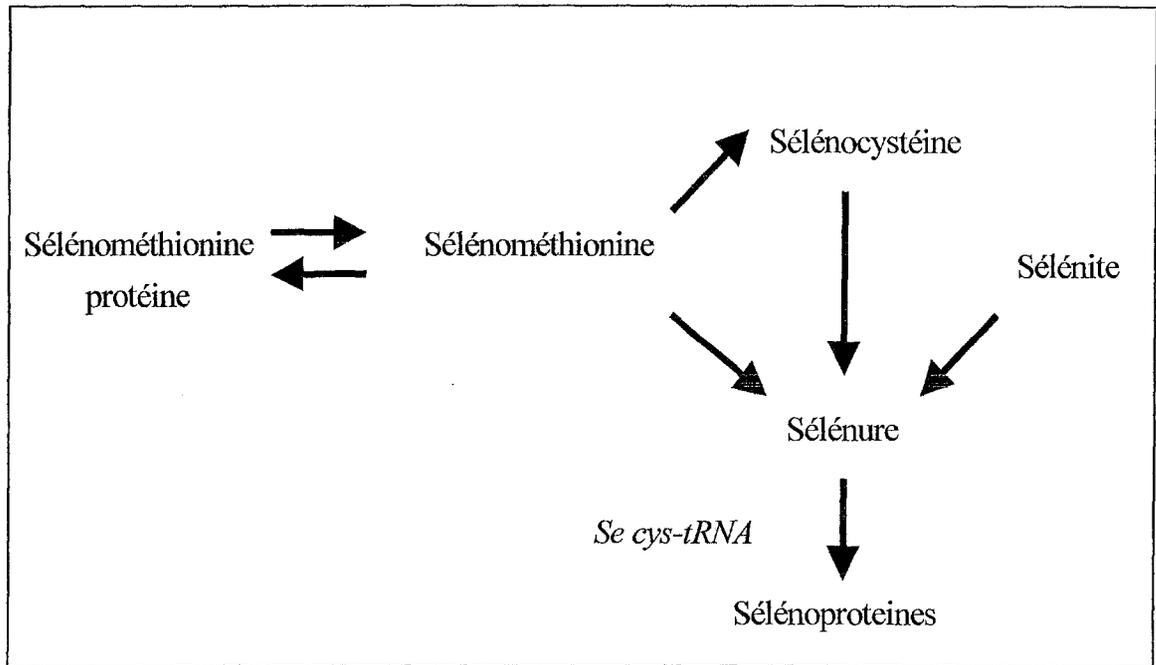


Figure n°8: métabolisme de la sélénométhionine

2) Incorporation de la sélocystéine dans les protéines

Contrairement à la sélénométhionine, l'incorporation de la sélocystéine dans la structure primaire des protéines est réalisée par l'intermédiaire d'un codon spécifique (UGA) codant pour un ARNt porteur de la Sélocystéine (Low 1996). Les protéines porteuses d'une sélocystéine constituent le groupe des sélénoprotéines.

Actuellement 11 sélénoprotéines ont été identifiées (Holben 1999) cependant le rôle biochimique de toutes ces protéines n'est pas toujours connu :

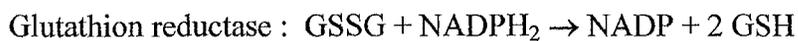
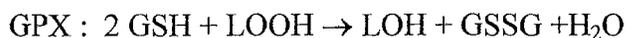
- 4 glutathion peroxydases
- sélénoprotéine P
- 3 iodothyronine déiodinases
- sélénoprotéine W
- thiorédoxine réductase
- sélénophosphate synthétase.

La synthèse des sélénoprotéines va être adaptée à la disponibilité du sélénium. En cas de carence en sélénium, on aura une diminution de la synthèse des sélénoprotéines. Cependant toutes les sélénoprotéines ne diminuent pas dans les mêmes proportions, témoignant d'un système de régulation adapté aux besoins de l'organisme (Burk 1993).

IV-2-2 Propriétés antioxydantes des sélénoprotéines

1) Les glutathions peroxydases (GPX)

La GPX est une enzyme à sélénium capable de réduire les groupements peroxydes susceptibles d'entraîner des dommages cellulaires. Cette enzyme va donc prévenir la génération de radicaux libres liée à la dégradation des groupements peroxydes par les métaux de transition, elle prévient donc de la sorte la peroxydation des lipides.



Elle joue un rôle important dans les mécanismes de protection contre l'athérosclérose mais aussi vis à vis de toutes les pathologies où le stress oxydant intervient de façon délétère. En fonction de leur localisation on distingue 4 types d'enzymes :

- la GPX cellulaire
- la GPX plasmatique
- la phospholipide hydroperoxyde GPX
- la GPX gastro-intestinal

La diminution de l'activité de la glutathion peroxydase va se répercuter à plusieurs niveaux :

→ La diminution de la défense contre les hydroperoxydes lipidiques va entraîner une augmentation de l'effet cytotoxique de ces composés sur la cellule endothéliale (Thomas 1993). La recherche pharmaceutique a tenté de découvrir des molécules chimiques susceptibles de présenter une activité peroxydasique. L'Ebselen est un dérivé sélénié organique issu de cette recherche.

→ Le métabolisme de l'acide arachidonique va être modifié par la diminution d'activité de la GPX. Cette modification du métabolisme de l'acide arachidonique va entraîner un déséquilibre au niveau de la cellule endothéliale et des plaquettes, provoquant une augmentation de la synthèse en tromboxane A2 (TX A2), métabolite proaggrégant et vasoconstricteur, et une diminution en prostacycline (PG I), antiaggrégant et vasodilatateur. (Chappuis 1991).

→ Il a été montré que la GPX pouvait réagir avec le peroxyde nitrique et pouvait constituer un moyen de défenses pour l'organisme contre l'oxydation par ce composé. (Siest 1997)

2) La thioredoxine réductase (TR)

La TR a été identifiée en 1996 comme une séléno-protéine. La TR se présente comme un dimère de 57 kDa capable de réduire les ponts S-S des protéines par l'intermédiaire du cofacteur NADPH₂. Cette enzyme intervient dans un système enzymatique en association avec la thioredoxine peroxydase et la thioredoxine (figure n°9). La thioredoxine est une petite protéine qui comporte 5 résidus cystéine susceptibles d'être oxydés pour former des ponts S-S sous l'action de la thioredoxine peroxydase. La thioredoxine n'est pas le seul substrat de la TR. La TR va être aussi capable de réduire directement l'acide ascorbique (Mustacich 2000).

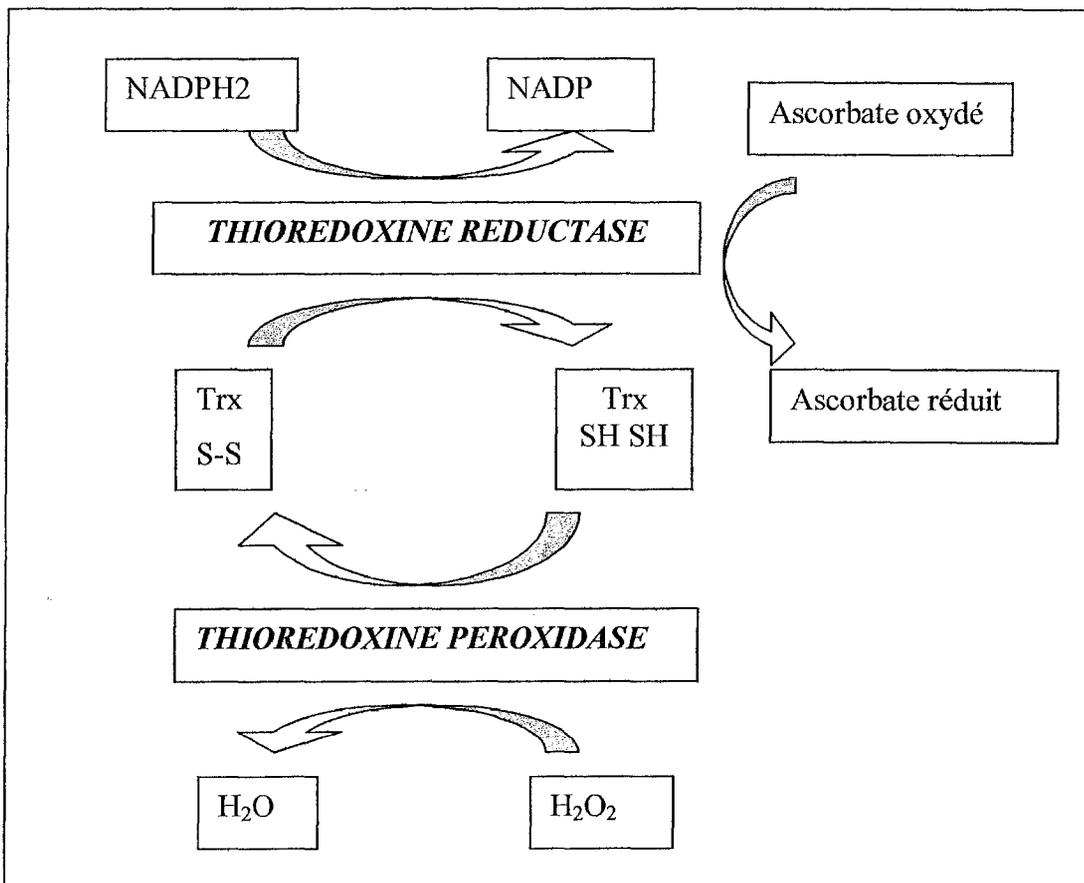


Figure n°9: action métabolique de la thioredoxine réductase

TRX : thioredoxine

3) La Sélénoprotéine P (Se P)

La sélénoprotéine P et la GPX plasmatique sont les principales sélénoprotéines plasmatiques. La fraction de sélénium contenue dans la Se P représente jusqu'à 60% du sélénium plasmatique. La Se P est une protéine de 41 kDa caractérisée par la présence de 10 résidus sélénocystéine.

La Se P va être, elle aussi, sensible au statut en sélénium de l'organisme, mais sa synthèse va être maintenue en priorité par rapport à la GPX. Le rôle biologique de la Se P n'est pas établi, 2 hypothèses sont avancées :

- La Se P pourrait avoir un rôle de transporteur du sélénium dans l'organisme. Cependant, le fait que le sélénium soit inclus dans la structure primaire de la protéine et que la demi-vie plasmatique du sélénium ne soit pas influencée par l'imprégnation en sélénium de l'organisme ne sont pas des arguments en faveur de cette fonction.
- Une autre hypothèse du rôle de la Se P est que la SeP pourrait avoir une activité antioxydante. Il a été montré que la résistance à un stress oxydant, chez des rats carencés en sélénium, était corrélée à la concentration plasmatique en Se P (Burk 1995). La Se P serait plus particulièrement impliquée dans les mécanismes de défense vis-à-vis des peroxydes nitriques (Arteel 1998).

IV-3 STATUT EN SELENIUM ET MALADIES CARDIO-VASCULAIRES

L'hétérogénéité de répartition du sélénium fait que les populations résidant dans des régions sélénoprives sont plus susceptibles de développer des maladies liées à la carence en sélénium. C'est notamment le cas en Chine dans la région de Keshan où la carence sévère en sélénium est à l'origine d'une cardiomyopathie décrite sous le nom de maladie de Keshan.

Les états de carence sévère restent exceptionnels, par contre des états de subcarence sont beaucoup plus fréquents et ne semblent pas, à première vue, entraîner des états pathologiques. Cependant des enquêtes épidémiologiques ont montré qu'une hyposélénémie constituait un facteur de risque dans de nombreuses pathologies, dont l'athérosclérose.

Des enquêtes effectuées en Finlande, région pauvre en sélénium, ont montré qu'une concentration sérique en sélénium inférieure à 45µg/L constituait un facteur de risque pour les maladies cardiovasculaires. Cependant même en Finlande l'association entre maladies cardiovasculaires et taux de sélénium n'est pas toujours retrouvée comme dans l'étude de

Miettinen en 1983 ou de Ringstad en 1986. De plus la concentration plasmatique en sélénium associée à une augmentation du risque d'accidents cardiovasculaires varie fonction des pays. Ainsi le lien entre sélénium et maladies cardiovasculaires n'est pas direct et doit prendre en compte les autres facteurs de risques associés au caractère multifactoriel de la maladie. (Tableau n°IV)

Kok en 1989 a montré qu'il existe une relation statistique positive entre la diminution de la concentration en sélénium dans les phanères, témoins de l'imprégnation à long terme de l'organisme par le sélénium, et le risque d'infarctus du myocarde (Kok 1989).

Salonen a mis en évidence, dans une étude épidémiologique, un effet synergique entre une séléniémie basse et une cuprémie élevée sur le processus athérogène (Salonen 1991).

Ces résultats ont aboutit à la mise en place en 1985 d'un programme d'enrichissement systématique en sélénium des engrais afin d'améliorer le statut en sélénium des Finlandais. Entre 1972 et 1992 la mortalité liée aux maladies cardiovasculaires a chuté de plus de 50% dans la population Finlandaise. Les raisons d'une telle diminution sont liées pour une grande part à une modification des habitudes alimentaires responsables d'une amélioration des paramètres lipidiques de la population, mais l'augmentation de la consommation de produits d'origine végétale et l'amélioration du statut en sélénium de la population interviennent en partie dans ce résultat (Pietinen 1996).

Plusieurs hypothèses sont avancées pour tenter d'expliquer comment une diminution en sélénium va pouvoir représenter un facteur de risque pour les maladies cardiovasculaire.

IV-3-1 Sélénium et bilan lipidique

Le taux de sélénium plasmatique va influencer le bilan lipidique. La baisse de la séléniémie semble être associée à une augmentation du LDL cholestérol et à une baisse du HDL cholestérol. Une relation directe a pu être établie entre la teneur en sélénium du plasma et le taux de HDL cholestérol, pour une population résidente dans une région séléniprive (Chappuis 1991). Cependant ces résultats ne sont pas confirmés par toutes les études et certains travaux n'ont pas mis en évidence de relation entre le statut en sélénium et le bilan lipidique.(Viega-Crespo 1996).

IV-3-2 Sélénium et glutathion peroxydase

Un autre mécanisme expliquant l'implication du sélénium dans les maladies cardiovasculaires est la présence de Sélénocystéine au sein du site actif de la glutathion peroxydase. Une baisse de la séléniémie va entraîner une diminution d'activité des glutathions peroxydases d'où une moindre protection contre le stress oxydant.

IV-3-3 Effet antioxydant du sélénium

Outre son rôle dans la glutathion peroxydase, le sélénium semble être capable de limiter la peroxydation lipidique par d'autres mécanismes. Vinson J et al ont montré que des LDL, issues de cobayes ayant reçu une alimentation enrichie en sélénium, présentaient, *in vitro*, une résistance à l'oxydation par le Cu par rapport aux LDL de cobayes témoins. Pour expliquer ce fait, les auteurs avançaient l'hypothèse que la protection, vis à vis de l'oxydation des LDL, pourrait être due à l'incorporation d'acides aminés séléniés au sein de la structure primaire des apoprotéines à la place des acides aminés soufrés (Vinson 1998).

| Auteur | Pays | Cas/nb observ | Sexe et âge | Se (µg/L) | Risque relatif | MCV |
|-------------------------|--------------------|---------------|-------------------|-----------|----------------------|---------------------------------------|
| Salonen (1982) | Suède/ Finlande | 283/8113 | H et F (39-59) | < 45 | 2.9 2.2 2.1 | Mort MC Mort MCV IM |
| Miettinen (1983) | Suède/ Finlande | 33/1222 | H Moy 48 | 50-105 | NS | |
| Salonen (1985) | Suède/ Finlande | 92/12000 | H et F (30-64) | < 45 | 1.3 | Mort MC |
| Virtamo (1985) | Suède/ Finlande | 141/1100 | H (55-74) | < 45 | 2 1.4 1 3.7 | Mort MCV Mort MC IM Mort AVC |
| Ringstad (1986) | Allemagne | 111/6595 | H (20-49) | 59-197 | NS | |
| Kok (1987) | Hollande | 84/10535 | H et F (37-87) | <105 | 1.6 1.2 2.9 | Mort MCV Mort MC Mort AVC |
| Suadicani (1992) | Danemark | 107/3387 | H (53-74) | <79 | 1.6 | Mort MC |

Tableau n°IV : Sélénium et maladies cardio-vasculaires ; études épidémiologiques
 MC : maladie coronarienne ; MCV :maladie cardio-vasculaire ; IM : infarctus du myocarde ; AVC :accident vasculaire cérébral

IV-4 SELENIUM ET LIPOPROTEINE

Dans le plasma 95% du sélénium se trouve réparti principalement sur 3 protéines (Harrison 1996):

- 55% dans la sélénoprotéine P
- 25% dans la glutathion peroxydase extra érythrocytaire
- 15% sur l'albumine.

Dans le cas de la selenoprotéine P et de la GPX le sélénium se trouve sous forme de sélénocystine incorporé dans la structure primaire de la protéine. L'albumine aurait un rôle de transporteur du sélénium pour permettre la métabolisation de celui-ci au niveau hépatique (Ducros 1994).

Une partie des 5% restant se retrouvent dans les LDL. Dès les années 70 des travaux mentionnent la présence de sélénium sur les lipoprotéines en supposant que celles-ci interviennent dans le transport plasmatique du sélénium.

Des mesures réalisées en 1972 par Morse estimaient à environ 6% la fraction de sélénium plasmatique fixée sur les LDL (Morse 1972).

Des travaux réalisés par Burk en 1974 consistaient à injecter du sélénium radioactif à des volontaires et à étudier la répartition de ce sélénium au cours du temps sur les protéines plasmatiques. Ces travaux ont montré, qu'après injection de sélénium radioactif sous forme de SeO_3^{2-} , bien que la majorité du sélénium se retrouvait lié à l'albumine, une partie de celui-ci était rapidement fixé sur les VLDL et les LDL mais pas sur les HDL. Cependant alors que pour les VLDL la fraction fixée décroît rapidement, la fraction fixée sur les LDL se maintient plus longtemps et est encore détectable 24 heures après l'injection du traceur (schéma n°9). Pour Burk la fixation du sélénium pourrait être due à la formation de ponts Se-S entre le sélénium et les groupements thiols de l'apo B (Burk 1974).

Plus récemment des mesures réalisées par Ducros et Laporte ont confirmé la présence de Sélénium au niveau des LDL. Leurs dosages, réalisés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectrographe de masse, ont estimé à 3% la fraction de sélénium plasmatique fixée sur les LDL. Leurs mesures ont pu démontrer que ce sélénium se retrouvait associé à la fraction protéique des lipoprotéines. Cependant de nombreuses questions restent posées notamment en ce qui concerne la nature du dérivé sélénié fixé et le type de fixation du sélénium sur les lipoprotéines soit comme acide aminé inclus dans la structure primaire des apoprotéines ou bien par formation de ponts Se-S avec les groupements thiols libres de ces mêmes apoprotéines (Ducros 2000). Tableau n°V

| sujet | Choles g/L | Trigly g/L | Apo A1 g/L | Apo B g/L | Plasma Se µg/L | Se VLDL µg/g apo B | Se LDL µg/g apo B | Se HDL µg/g apo A1 | Se VLDL % Se total | Se LDL % Se total | Se HDL % Se total |
|----------------|---------------|---------------|---------------|--------------|-------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 1 | 1.48 | 0.47 | 1.31 | 0.58 | 61.2 | / | 2.14 | 0.64 | / | 1.92 | 1.37 |
| 2 | 2.24 | 0.78 | 1.36 | 0.91 | 68 | 2.32 | / | 0.54 | 0.25 | / | 1.08 |
| 3 | 2.44 | 0.67 | 1.36 | 0.98 | 84.5 | 2.39 | / | 0.33 | 0.21 | / | 0.53 |
| 4 | 1.31 | 0.45 | 1.06 | 0.52 | 84.5 | 3.83 | 2.9 | 0.95 | 0.19 | 1.65 | 1.19 |
| 5 | 1.68 | 0.69 | 0.97 | 0.85 | 88.5 | 3.13 | 2.17 | / | 0.22 | 1.94 | / |
| 6 | 1.75 | 1.28 | 1.52 | 0.77 | 78.2 | 1.22 | 2.31 | 0.51 | 0.45 | 1.42 | 0.99 |
| 7 | 1.69 | 0.50 | 1.20 | 0.67 | 74.3 | 2.54 | 0.92 | 0.63 | 0.2 | 0.76 | 1.02 |
| 8 | 2.86 | 0.66 | 1.65 | 1.07 | 69.5 | / | 1.87 | 0.73 | / | 2.66 | 1.73 |
| 9 | 2.03 | 0.39 | 0.99 | 0.82 | 70.3 | / | 1.59 | 0.81 | / | 1.76 | 1.14 |
| Moyenne | 1.96 | 0.65 | 1.27 | 0.80 | 75.4 | 2.57 | 1.99 | 0.64 | 0.26 | 1.73 | 1.13 |
| SD | 0.49 | 0.27 | 0.24 | 0.18 | 9.1 | 0.87 | 0.62 | 0.19 | 0.1 | 0.58 | 0.34 |

Tableau n°5 :Statut lipidique et teneur en sélénium des différentes fractions lipidiques d'après Ducros 2000

C MATERIEL ET METHODE

Afin de pouvoir répondre aux objectifs précédemment cités nous avons mis en œuvre différentes techniques. Deux groupes types de techniques peuvent être distinguées en fonction des buts recherchés.

Un premier ensemble de techniques va chercher à vérifier l'effet protecteur des acides aminés sélénisés sur l'oxydation *in vitro* des LDL. Pour cela nous avons réalisé l'isolement des LDL puis leur oxydation par deux systèmes oxydants, ceci dans différentes conditions afin de mieux appréhender les mécanismes antioxydants.

Le deuxième ensemble de techniques regroupe l'ensemble des expériences qui ont été réalisées afin d'expliquer les mécanismes antioxydants mis en jeu par nos composés. Comme mécanisme antioxydant possible nous avons retenu comme hypothèse :

- la formation de complexes
- une activité glutathion peroxydase
- un effet scavenger de radicaux libres.

I OXYDATION DES LDL

I-1 RECUEIL DU PLASMA

Le sang, en vue de l'isolement des LDL, est prélevé par ponction veineuse sur tubes vacutener EDTA chez des volontaires à jeun de 12 heures. Les tubes de sang sont rapidement centrifugés 15 mn à 1500 g afin de séparer le plasma des éléments figurés du sang. Les plasmas sont ensuite rassemblés afin de constituer un volume suffisant pour permettre l'isolement des LDL.

I-2 ISOLEMENT DES LDL

La séparation des LDL est réalisée selon le protocole recommandé par la société Beckman ; il s'agit d'une séparation par ultra centrifugation par flottaison. La centrifugeuse

utilisée est le modèle Optima L 90 K de chez Beckman avec le rotor NVT 90. Deux centrifugations successives sont réalisées, une première de 2 heures à 4° C à 645000 g. A l'issue de cette centrifugation le surnageant contenant les VLDL et les chylomicrons est retiré. Le sous nageant est conservé, sa densité est ajustée à 1,064 par apport d'une quantité de KBr donnée par la formule :

$$X = V \times (df-di)/1-(0,312 \times df) = V \times 0,085$$

df : densité finale = 1,063

di : densité initiale = 1,006

V : volume de sous nageant en ml

X : en gramme de KBr

La deuxième centrifugation est réalisée à 4°C à 645000 g pendant 2h15. A la fin de la centrifugation, les LDL se retrouvent dans la partie supérieure des tubes. Elles sont récupérées et un échantillon est conservé pour le dosage de l'Apo B qui est réalisé par le laboratoire de biochimie de l'hôpital de Grenoble.

Les LDL sont dialysées, en chambre froide, contre 3 fois 1 litre de tampon PBS à 0,01 M de phosphate, ajusté à Ph 7,4, pour éliminer l'EDTA. Le tampon a été préalablement saturé en azote pour éviter l'oxydation des LDL. Elles sont ensuite stockées sous vide dans un tube sec à 4°C, à l'abri de la lumière, pour être utilisées dans les 5 jours.

I-3 OXYDATION DES LDL

Les LDL, exemptes d'EDTA, sont diluées dans du tampon PBS pour être amenées à la concentration désirée. L'oxydation des LDL est réalisée par 2 systèmes soit le Cu, soit l'AAPH (Esterbauer 1989).

Ces 2 systèmes oxydants n'agissant pas de la même manière, un produit présentant une activité antioxydante ne sera pas forcément actif dans les 2 systèmes. Pour le Cu les produits présentant une activité complexante de métaux, ou scavenger de radicaux LO° ou LOO°, seront actifs. Alors que pour l'AAPH une activité complexante sera inefficace pour inhiber l'oxydation.

Le cuivre utilisé est apporté sous forme de chlorure de cuivre (CuCl₂). La concentration en cuivre est de 3 µM pour une concentration en LDL de 0,15 g/l en Apo B, ceci dans le cas d'une concentration croissante en produit antioxydant. D'autres oxydations ont été réalisées avec une concentration constante en antioxydant mais des concentrations

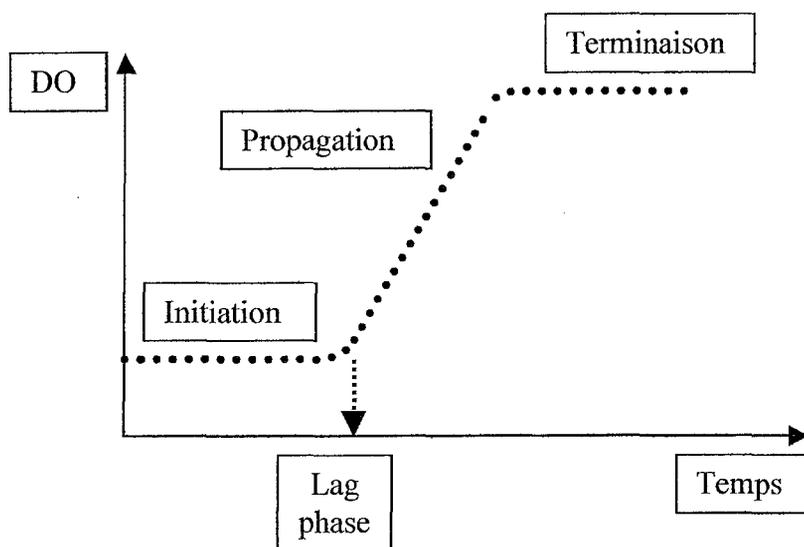
variables en cuivre. Dans ce cas, la concentration en Apo B était toujours de 0,15 g/l pour des concentrations en cuivre allant de 10 μ M à 40 μ M.

La solution d'AAPH est préparée au moment de son utilisation afin d'éviter sa dégradation. La concentration finale de l'AAPH est de 1 mM pour une concentration en Apo B de 0,05 g/l, pour limiter l'absorption UV due à l'AAPH.

Les suspensions de LDL ont été préparées dans la glace pour limiter leur dégradation. Elles ont ensuite été déposées dans des cuves en quartz placées dans le spectrophotomètre uvikon 930 thermostaté à 37 °C. La cinétique d'oxydation est suivie par la mesure de l'augmentation de l'absorbance des diènes conjugués à 234 nm.

I-4 MESURE DES DIENES CONJUGUES

L'oxydation des LDL s'accompagne de la formation de diènes conjugués. Ces composés présentent un pic d'absorption dans U.V à 234 nm. L'enregistrement en continu à 234 nm par un spectrophotomètre va permettre de déterminer la lag-phase, ou phase de latence. La phase de latence correspond à l'intersection de la tangente, de la phase de propagation, avec l'axe des abscisses en minute. Un produit présentant une activité antioxydante va retarder l'oxydation des LDL, ce qui va se traduire par une augmentation de la lag phase.



Courbe cinétique d'oxydation des LDL

I-5 PRODUITS TESTES

Différents dérivés séléniés organiques ont été testés vis-à-vis de leur propriétés antioxydantes.

- l'Ebselen :

L'Ebselen est un composé sélénié organique de synthèse présentant une activité glutathion peroxydase like. Une solution mère à la concentration de 10 mM a été préparée par dilution de l'Ebselen dans l'éthanol absolu. A partir de cette solution des dilutions ont été réalisées pour que la quantité d'éthanol dans l'échantillon n'excède pas 1 %. Pour chaque manipulation une suspension témoin de LDL recevait le même volume d'alcool que l'échantillon.

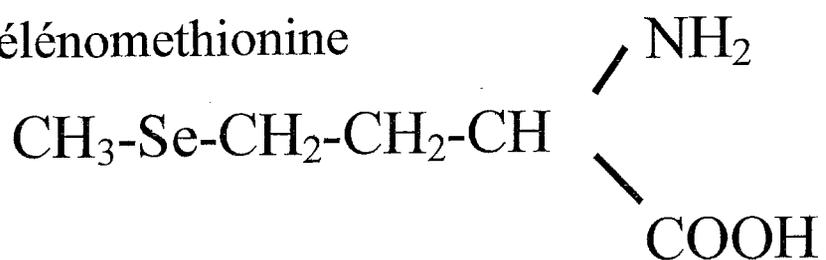
- Selenométhionine et Selenocystine et leurs dérivés soufrés :

L'effet antioxydant de la selenométhionine, de la selenocystine, de la méthionine, de la cystéine et de la cystine, a été évalué sur l'oxydation des LDL par le cuivre et par l'AAPH. Selenométhionine et méthionine ont été testés en parallèle, comme cystéine, cystine et selenocystine, pour limiter les variations inter échantillon.

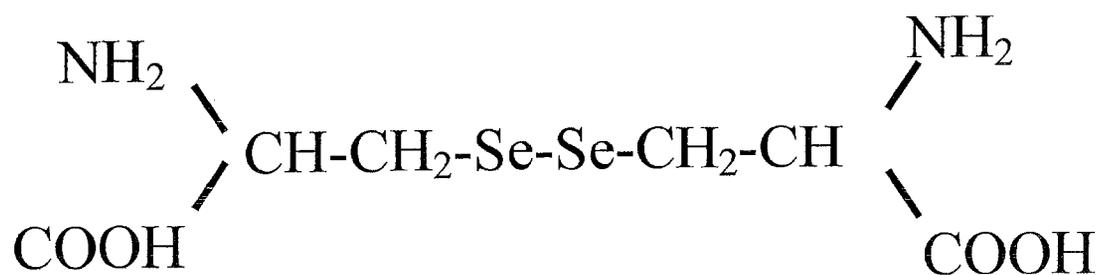
Les solutions mères de cystine et cystéine étaient à 10 mM. Une solution de cystéine était préparée chaque semaine. La solution de selenocystine était à 0.2 mM.

Produits

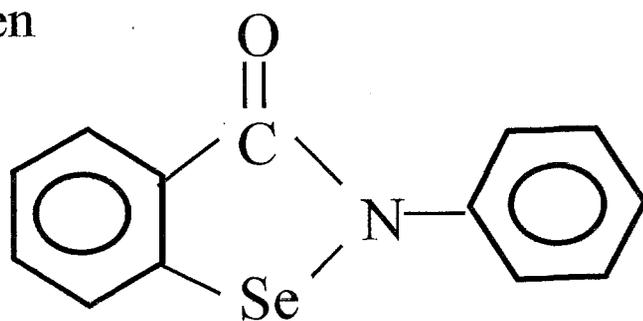
Sélénométhionine



Sélénocystine



Ebselen



I-6 ENRICHISSEMENT DU PLASMA EN SELENOCYSTINE ET EN EBSLEN

Du plasma, issus de sang prélevé sur tube EDTA chez des volontaires à jeun, était enrichi en sélénocystine et Ebselen à différentes concentrations. Le plasma enrichi était incubé pendant 12 heures à 37 degrés sous agitation. Un plasma témoin était traité dans les mêmes conditions. Un échantillon du plasma avant et après enrichissement en dérivé sélénié était conservé afin de déterminer la concentration en sélénium.

A l'issu de l'incubation, les LDL des plasmas sont purifiées et dialysées, comme décrit précédemment. Les LDL sont soumises à une oxydation par le cuivre et par l'AAPH. Une fraction des LDL est conservée pour déterminer la concentration de sélénium présent. La concentration en sélénium est déterminée par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectrographe de masse (Ducros 1992)

II MISE EN EVIDENCE DE LA FORMATION D'UN COMPLEXE

II-1 SPECTRE D'ABSORPTION DANS L'ULTRA VIOLET

Le spectre de chaque composé a été réalisé sur une gamme spectrale de 190 nm à 400 nm, à une concentration de 0,2 mM. Le solvant du composé a été utilisé comme référence, soit de l'éthanol pour l'Ebselen, soit du tampon PBS pour les acides aminés. A la fin de cette mesure des quantités croissantes de CuCl_2 ont été apportées dans la cuve référence et dans la cuve de l'échantillon afin de mettre en évidence une variation du spectre d'absorption du composé liée à la formation d'un complexe entre le composé testé et le cuivre. Puis de l'EDTA a été ajouté dans la cuve de mesure et de référence pour s'assurer que l'éventuel complexe formé était bien dû à l'apport de Cu.

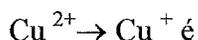
II-2 ETUDE DES COMPLEXES DU CU PAR RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE

Les profils RPE des complexes formés entre le cuivre et les différents composés ont été réalisés à basse température (100 K) dans un mélange tampon PBS/DMSO (1:1, v/v) à pH 7,4. Cependant en raison du manque de solubilité du CuCl_2 le spectre du cuivre libre a été

réalisé dans une solution à pH acide (pH 4). La concentration finale des produits en solution était de 1 mM sauf pour la sélénocystine où la concentration était de 0,1 mM. Après préparation, les échantillons étaient déposés dans une cellule en quartz et congelés par un courant d'azote liquide pour la réalisation de leur spectre. Les mesures ont été réalisées sur le spectromètre Bruker ESR 300. Les tracés ont été réalisés à une fréquence de 9,4 GHz, modulation fréquence 100 kHz, Puissance 1 MW et 2 MW pour la sélénocystine (El marzouki 1993).

II-3 EVALUATION DE L'ACTIVITE OXYDO-REDUCTRICE DES COMPLEXES DE CUIVRE

Afin d'évaluer l'effet de la complexation, sur l'activité oxydo-réductrice du cuivre, nous avons réalisé l'oxydation de l'acide ascorbique par du cuivre en présence des différents composés antioxydants (Retsky 1998). L'oxydation de l'acide ascorbique en acide dehydro ascorbique s'accompagne d'une modification du spectre d'absorption de celui-ci. La cinétique d'oxydation de l'acide ascorbique a été réalisée par mesure de la diminution de l'absorbance à 265 nm.



Une solution d'acide ascorbique à 60 μM a été préparée dans du tampon PBS à Ph 7,4. L'oxydation de la solution était déclenchée par apport d'une quantité de chlorure de cuivre de sorte que la concentration finale en cuivre soit de 3 μM . La même méthode a été réalisée en présence d'antioxydant à la concentration de 10 μM . Un contrôle a été réalisé pour la même concentration d'acide ascorbique et la même concentration de produit testé mais en absence de cuivre.

III ETUDE DU QUENCHING DE FLUORESCENCE DU TRYPTOPHANE PAR LE CUIVRE

Nous avons voulu vérifier que la présence de nos produits antioxydants préservait la fluorescence des groupements tryptophane de l'Apo B 100. La fixation des atomes de cuivre sur les LDL va entraîner un «quenching» de la fluorescence de ces acides aminés et ce de manière proportionnelle à la quantité de cuivre fixé. Un composé susceptible de limiter la

fixation du cuivre sur les LDL devrait donc préserver la fluorescence de ces groupements (Giebauf 1995).

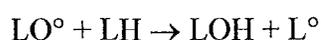
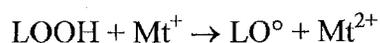
Les mesures de fluorescence du tryptophane de l'Apo B ont été réalisées sur le spectrophotomètre Perkin Elmer LS 50. La longueur d'onde d'excitation était fixée à 282 nm pour une émission à 331 nm et un temps d'intégration de 1 seconde. Les mesures étaient effectuées 10 secondes après l'ajout du cuivre pour que la dégradation des LDL, liée à leur oxydation, ne fausse pas les mesures

Nous avons mesuré la diminution de fluorescence des LDL en fonction de la concentration en cuivre en présence ou en absence d'un produit antioxydant. La concentration en Apo B était de 0,055g/l soit 0,1 μ M de LDL. Une solution de LDL était préparée pour chaque concentration de cuivre étudiée en présence de l'antioxydant. La mesure de fluorescence a été effectuée 1 mn après l'apport du cuivre. Des contrôles ont été réalisés pour le tampon de dilution (PBS) et l'antioxydant seul, afin de vérifier que ces composés n'avaient pas une fluorescence aux longueurs d'ondes utilisées.

Les résultats sont exprimés en % de diminution de la fluorescence, la référence étant la fluorescence des LDL en absence de Cu.

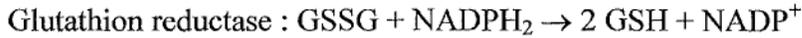
IV MESURE DE L'ACTIVITE GLUTATHION PEROXYDASE DES COMPOSES

Les peroxydes présents au niveau des LDL peuvent être à l'origine de l'oxydation de celles-ci. Par réaction avec les métaux de transition, les peroxydes vont subir une réaction de Fenton, génératrice de radicaux LO° pouvant oxyder les LDL. La réduction des groupements LOOH en LOH est donc un mécanisme de prévention de l'oxydation des LDL. Ce mécanisme est une des hypothèses avancées comme mécanisme d'action de l'Ebselen.



L'activité glutathion peroxydase (GPx) des composés a été mesurée. Le principe du dosage, est basé sur le couplage de réactions enzymatiques faisant intervenir la glutathion peroxydase et la glutathion reductase. L'activité GPx est évaluée par la diminution du NADPH₂. Cette diminution de NADPH₂ est mesurée par la diminution de l'absorbance à 340 nm due à l'oxydation du NADPH₂ en NADP par la glutathion reductase (Gunzler 1974).

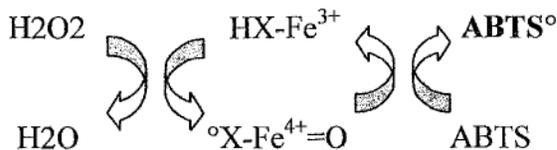
Schéma réactionnel :



Le dosage de l'activité GPx est automatisé sur l'Hitachi 907. La réaction se déroule en deux étapes. Dans un premier temps l'échantillon est incubé avec le réactif N°1 qui est constitué du mélange : NADPH₂, GSH et Glutathion réductase dans du tampon Tris EDTA. Le réactif N°2, constitué de t-butylhydroperoxyde en solution dans l'eau, est apporté au mélange précédent. La mesure de décroissance de l'absorption à 340 nm se réalise après ajout du deuxième réactif. Les résultats sont exprimés en U/mM de produit.

V ETUDE DE LA CAPACITE "SCAVENGER" DE RADICAUX LIBRES DES COMPOSES

L'étude des propriétés "scavenger" de radicaux libres des composés repose sur la capacité des produits à inhiber l'oxydation de l'ABTS (2,2' azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate)) par réaction avec le générateur de radicaux libres, dans ce cas un mélange myoglobine / H₂O₂. Le produit d'oxydation de l'ABTS présentant une absorption à 734 nm, l'évaluation de l'activité «scavenger» est réalisée par mesure du temps nécessaire à l'apparition de l'absorbance à cette longueur d'onde (Miller 1993).



Une solution de réactif contenant 1,5 µM de myoglobine et 75 µM d'ABTS dans du PBS est préparée. Un ml de solution est déposé dans une cuve en polystyrène, la quantité de produit à tester est apportée dans un volume de 20 µl. L'activité « scavenger » a été déterminée pour le produit seul mais aussi en présence de 10 µM de trolox. Le Trolox est un dérivé hydrosoluble de la vitamine E. Comme la vitamine E, ce composé va présenter des propriétés antioxydantes par son activité scavenger de radicaux libres.

La réaction est déclenchée par apport de 20 µl H₂O₂ (concentration finale 80 µM). La lecture se fait à 734 nm contre un blanc constitué du pool réactif sans H₂O₂. Le

spectrophotomètre utilisé est l'Uvikon 930 thermostaté à 30°C. La mesure du temps de latence permet d'évaluer l'activité « scavenger ». La mesure d'un échantillon à 10 µM de trolox seul est effectuée pour chaque série et permet de contrôler le bon déroulement de l'expérience.

D RESULTATS

I EFFET DES MOLECULES SELENIEES SUR L'OXYDATION DES LDL PAR LE CUIVRE

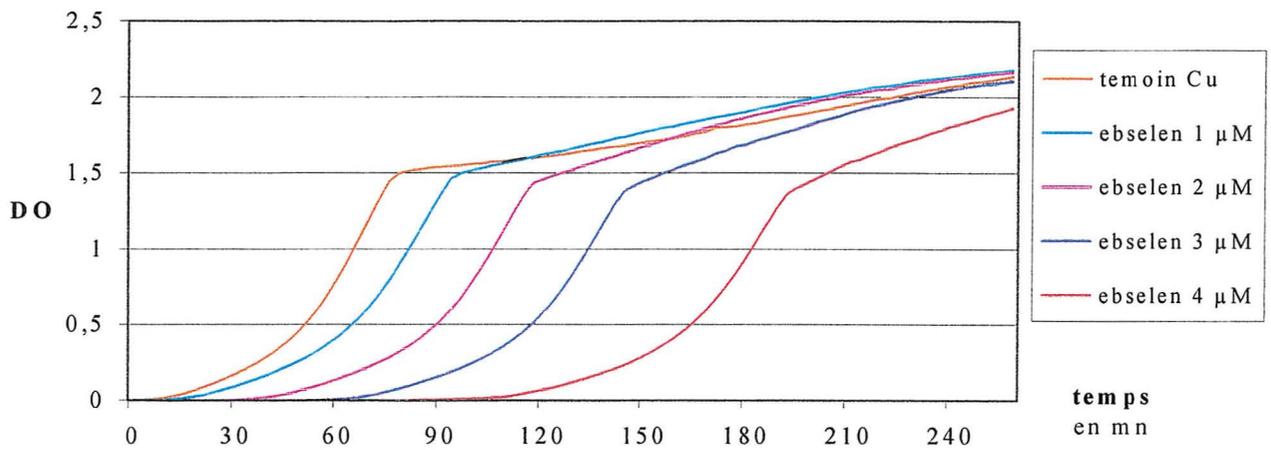
I-1 OXYDATION PAR LE CUIVRE

Les acides aminés sélénisés et soufrés et l'Ebselen présentent un effet antioxydant sur l'oxydation des LDL par le Cu qui se traduit par une augmentation du temps de latence. L'augmentation du temps de latence est dose dépendante. Cependant les composés sélénisés testés n'entraînent pas une modification de la quantité de diènes formés. Dans le cas des acides aminés l'augmentation du temps de latence s'accompagne d'une diminution de la vitesse de la propagation de la réaction se traduisant par une diminution de la pente de la phase de propagation. Pour l'Ebselen (figure 1a), par contre, nous ne constatons pas de diminution de la vitesse de cette phase de propagation.

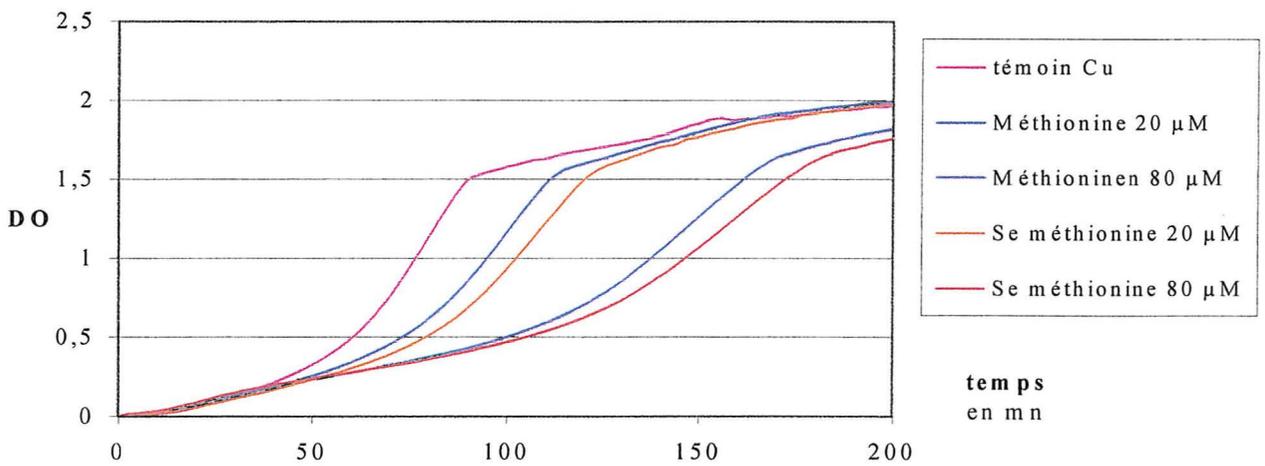
L'effet antioxydant des acides aminés sélénisés, sur l'oxydation des LDL par le cuivre, est variable en fonction des acides aminés. La sélénocystine est plus antioxydante que la sélénométhionine. L'activité antioxydant de la sélénocystine se manifestant pour des concentrations en acides aminés beaucoup plus faibles que pour la sélénométhionine.

Dans le cas de la méthionine, le dérivé sélénisé présente une activité antioxydante faiblement supérieure par rapport au dérivé soufré se traduisant par un temps de latence supérieur pour une même concentration d'acide aminé (figure 1b). Par contre pour la sélénocystine nous ne retrouvons pas ce résultat. L'activité antioxydante de la sélénocystine est supérieure à celle de la cystéine mais est inférieure à celle de la cystine (figure 1c).

1a : oxydation des LDL par le cuivre en présence d'eb-selen



1b: oxydation des LDL par le cuivre en présence selenométhionine



1c : oxydation des LDL par le cuivre en présence de sélénocystine

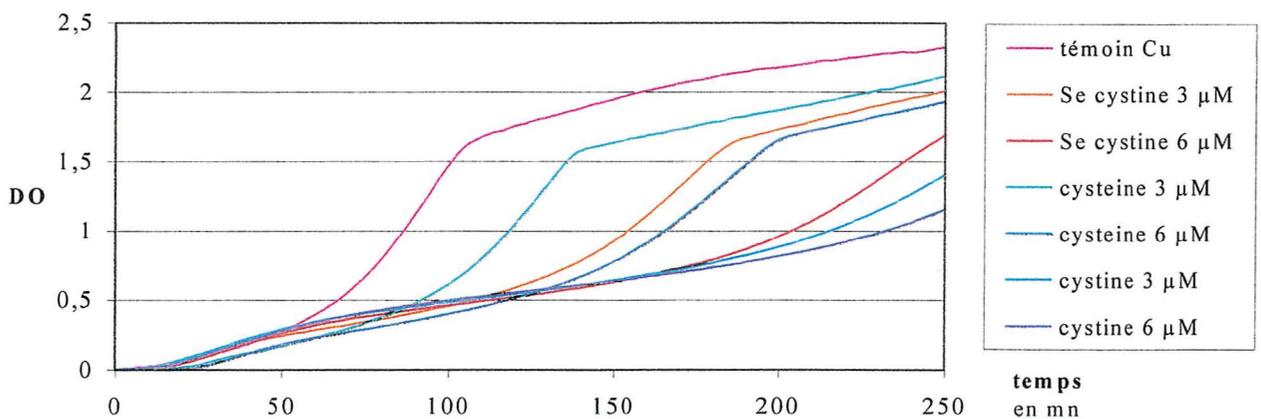


Figure 1 : Cinétique de formation des diènes conjugués lors de l'oxydation des LDL (0,15 g/l) par le cuivre (3µM) en présence d'Ebselen (a), de sélénométhionine (b), de sélénocystine (c).

I-2 OXYDATION DES LDL PAR LE CU APRES ENRICHISSEMENT DU PLASMA EN SELENOCYSTINE ET EN EBSELEN

L'enrichissement du plasma en sélénocystine provoque l'augmentation de la concentration en sélénium des LDL. Ce résultat montre que les LDL peuvent fixer la sélénocystine, cependant la nature de la liaison et le site de fixation de la sélénocystine sur les LDL reste inconnu.

Pour l'Ebselen la concentration en sélénium dans les LDL n'a pu être déterminée cependant d'autres expériences ont montré que l'on retrouvait du sélénium dans les LDL après enrichissement du plasma. Pour ce qui concerne les fortes concentrations en sélénium, du plasma témoin, celles-ci semblent dues à une contamination lors de la manipulation.

| | Concentration en Se plasmatique (mg/l) | Concentration en Se dans les LDL (µg/g apo B) |
|---------------------------|---|---|
| Temoin | 0,78 µM/l → 0.061 mg/l | 6.71 |
| Se Cystine 20 µM/l | 35,73 µM/l → 2.82 mg/l | 46,98 |
| Se Cystine 40 µM/l | 68,82 µM/l → 5.44 mg/l | 100,56 |
| Se Cystine 80 µM/l | 132,49 µM/l → 10.50 mg/l | 123,06 |
| Temoin | 5,64 µM/l → 0,445 mg/l | / |
| Ebselen 150 µM/l | 134,7 µM/l → 10,63 mg/l | / |
| Ebselen 400 µM/l | 354,6 µM/l → 28 mg/l | / |

Tableau n°1 : Enrichissement du plasma en sélénocystine et en Ebselen

oxydation des LDL par le cuivre et par AAPH

a) Pour la sélénocystine

Bien que l'on retrouve de la sélénocystine dans les LDL nous n'avons pas pu mettre en évidence un effet protecteur sur l'oxydation des LDL par le cuivre et par l'AAPH dans la gamme des concentrations étudiées (figure 2a).

b) Pour l'Ebselen

L'enrichissement du plasma en Ebselen entraîne une protection des LDL vis à vis de l'oxydation par le cuivre et par l'AAPH. Cet effet est dose dépendant et est plus important lors de l'oxydation des LDL par le cuivre que lors de l'oxydation par l'AAPH. L'Ebselen provoque une augmentation du temps de latence mais n'agit ni sur la vitesse de propagation de l'oxydation, ni sur la quantité de diènes formés (figure 2b).

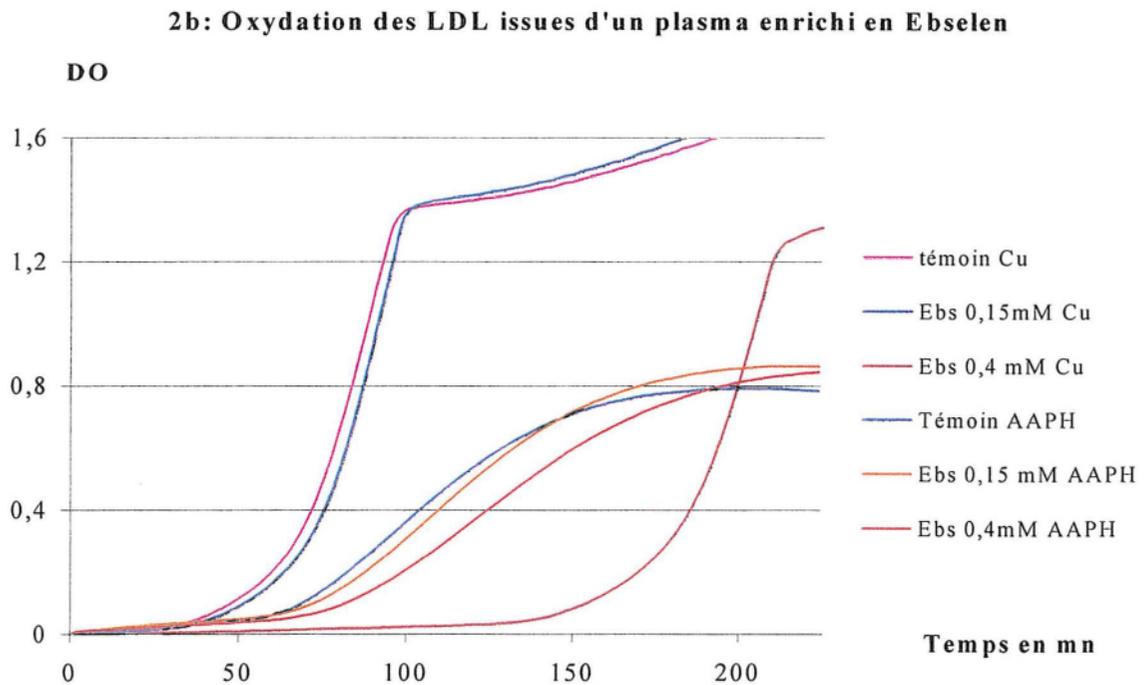
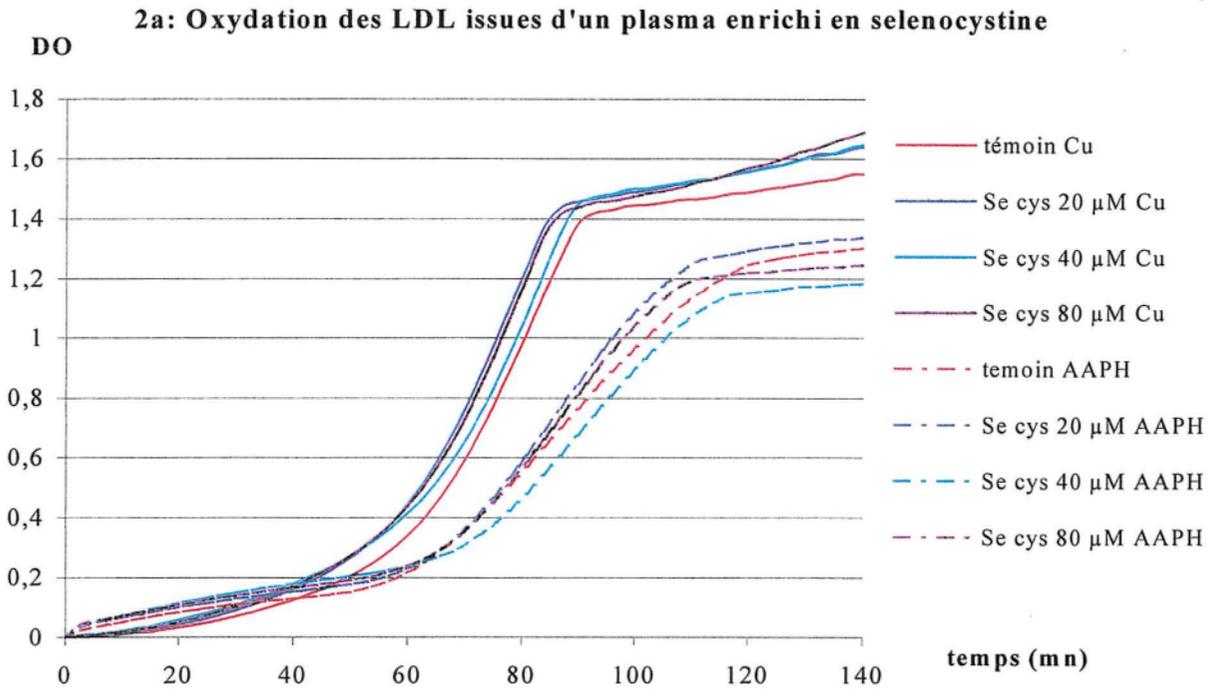


Figure 2 : Oxydation par le Cu (3µM) ou l'AAPH (1 mM) des LDL (0,15 ou 0,05 g/l), issues d'un plasma enrichi en sélénocystine (a), en Ebselen (b)

II- RESULTATS EN FAVEUR DE LA FORMATION DE COMPLEXES

II-1 EFFET DE L'AUGMENTATION DE LA CONCENTRATION EN CUIVRE

Si l'effet antioxydant des dérivés séléniés passe par la formation d'un complexe, la saturation des produits complexants, par une augmentation de la concentration en cuivre, doit permettre de restaurer l'activité oxydante du cuivre.

Pour les acides aminés (figures 3ab 4ab) nous constatons que l'augmentation de la concentration de cuivre permet de restaurer l'effet oxydant de celui-ci. Dans le cas de la cystéine, bien que l'effet antioxydant soit moins important que celui de la cystine, l'augmentation de la concentration en cuivre est moins efficace que pour la cystine et ne permet pas la récupération de l'activité oxydante du cuivre.

Pour l'Ebselen l'augmentation de la concentration en cuivre ne permet pas de restaurer l'activité oxydante du cuivre. Ceci montre que le mécanisme antioxydant de l'Ebselen est différent de celui des acides aminés (figure 4c).

Figure 3 : Cinétique de formation des diènes conjugués lors de l'oxydation des LDL (0,15 g/l) par le cuivre en concentration croissante en présence d'acides aminés(10 μ M). cystéine et cystine (a), sélénocystine (b).

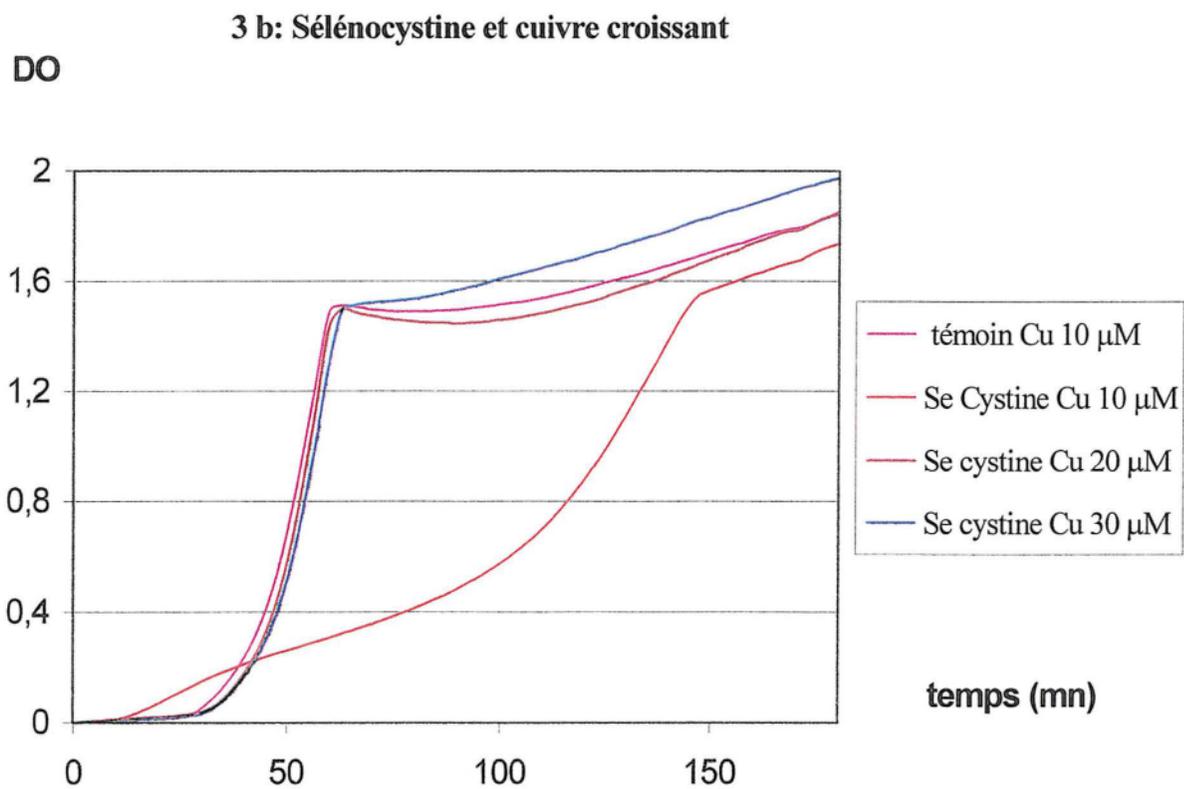
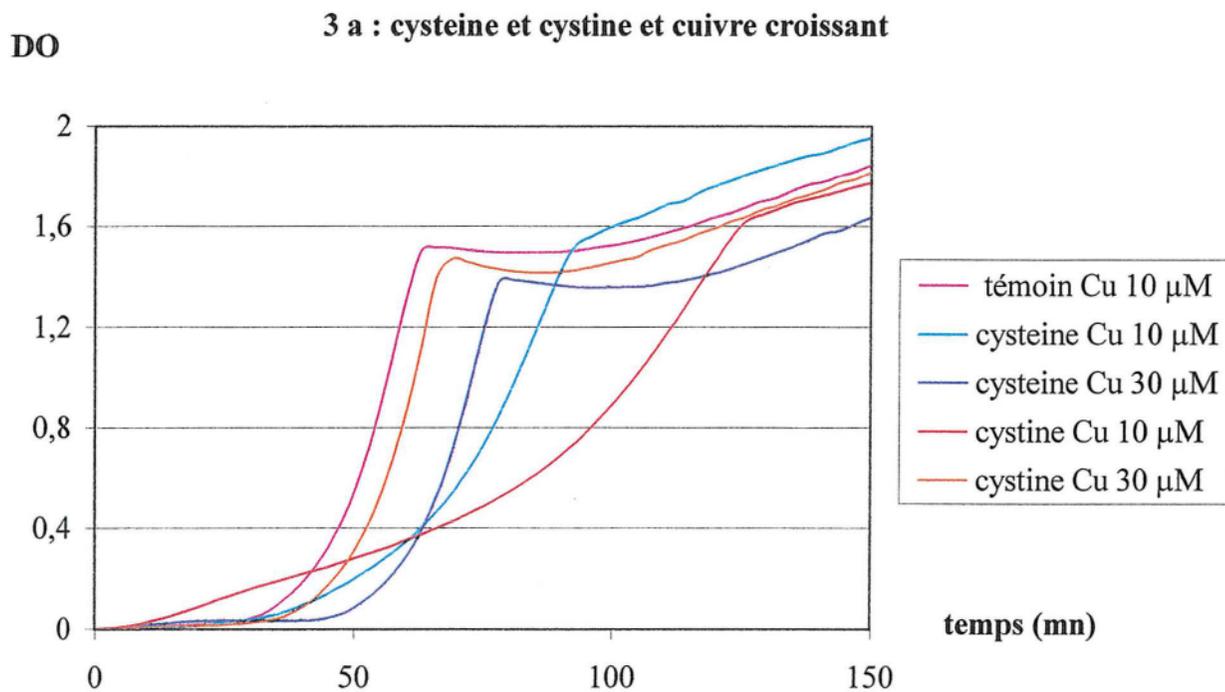
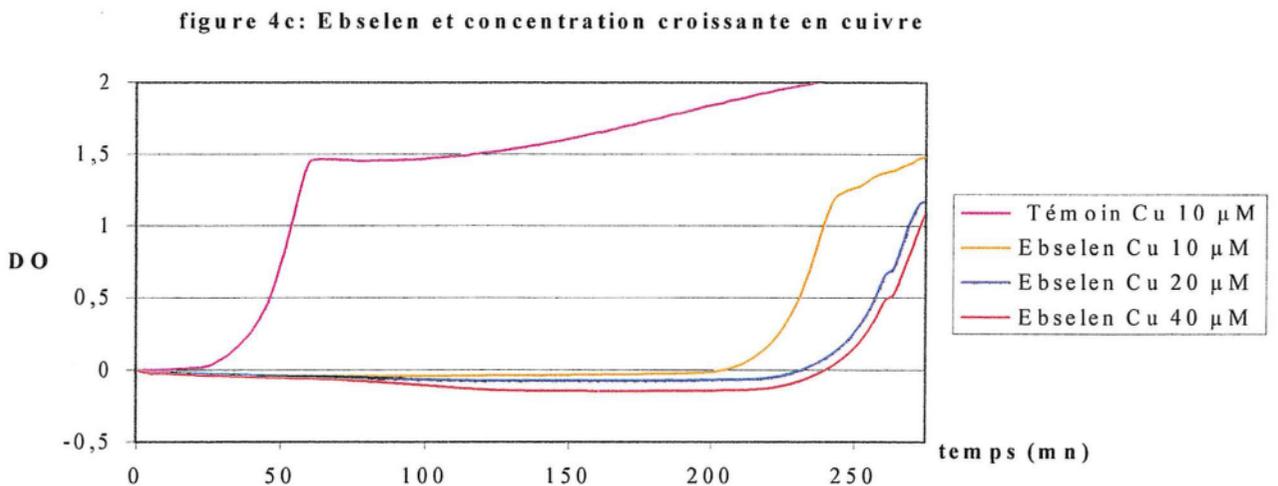
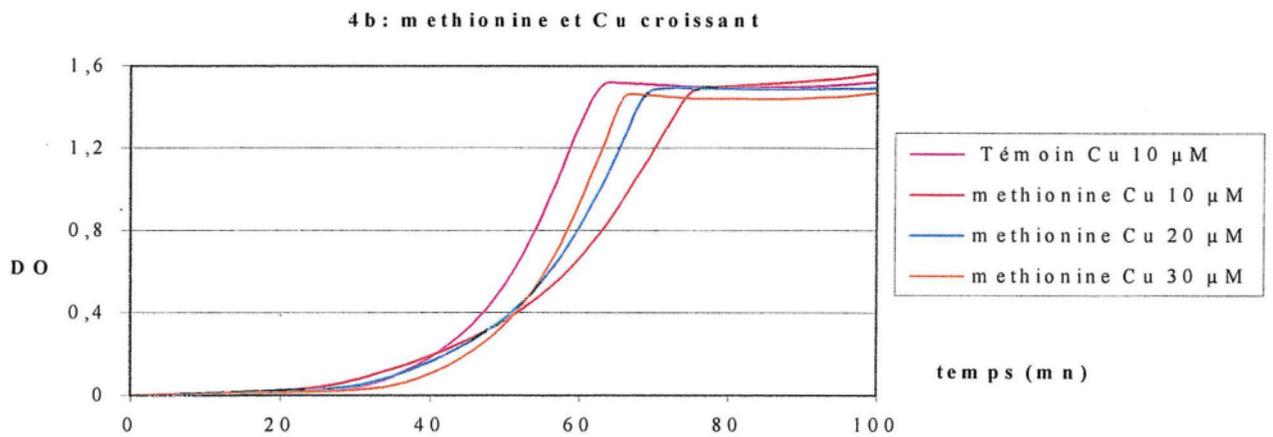
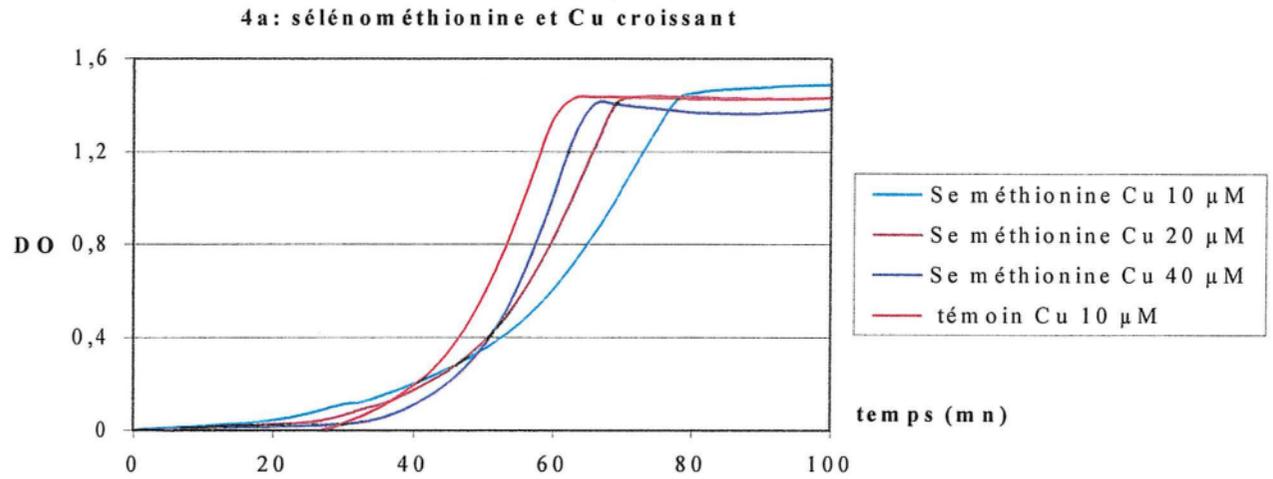


Figure 4 : Cinétique de formation des diènes conjugués lors de l'oxydation des LDL (0,15 g/l) par le cuivre en concentration croissante en présence d'acides aminés (40 μ M). sélénométhionine (a), méthionine (b) et d'Ebselen 4 μ M (c).



II-2 OXYDATION PAR L'AAPH

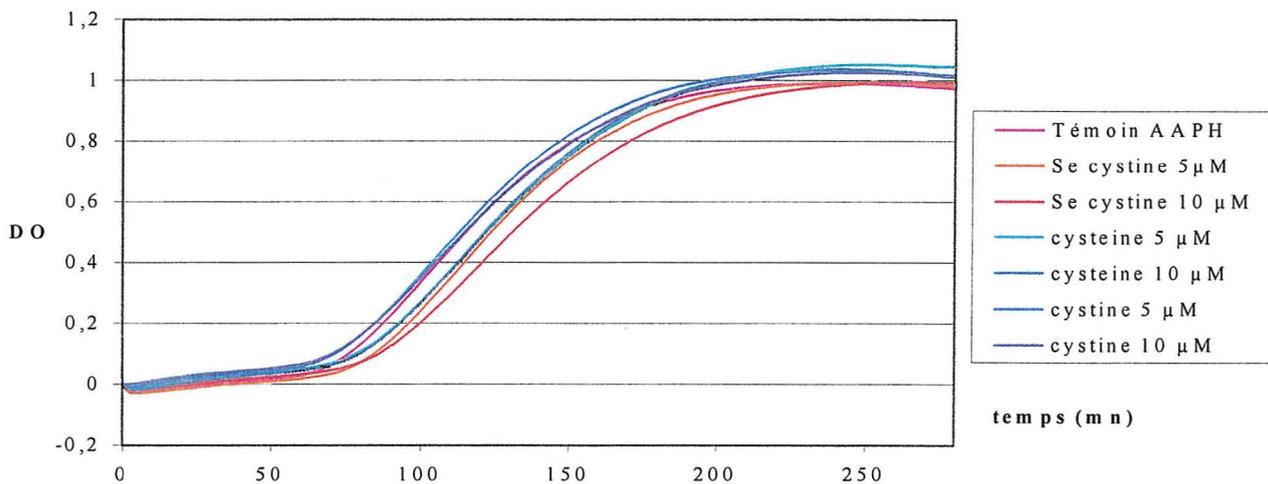
Les acides aminés testés, sélénométhionine sélénocystine et leurs équivalents soufrés, ne présentent pas d'effet protecteur sur l'oxydation des LDL par l'AAPH, dans la gamme des concentrations étudiées (figure 5ab).

L'Ebselen présente par contre une activité antioxydante avec AAPH. Cette activité est dose dépendante. Comme pour l'oxydation par le cuivre, l'Ebselen ne modifie pas la cinétique de la phase de propagation de l'oxydation, l'effet antioxydant de l'Ebselen se manifeste par une augmentation du temps de latence.(figure 5c).

L'effet antioxydant de l'Ebselen sur AAPH est moins important que sur le cuivre et se manifeste pour des concentrations en Ebselen plus importantes.

Figure 5 : Cinétique de formation des diènes conjugués lors de l'oxydation des LDL (0,05 g/l) par l'AAPH (1 mM) en présence de sélénocystine (a), de sélénométhionine (b), d'Ebselen (c)

figure 5a: sélénocystine, cystine, cysteine et AAPH



5b: Selenomethionine et AAPH

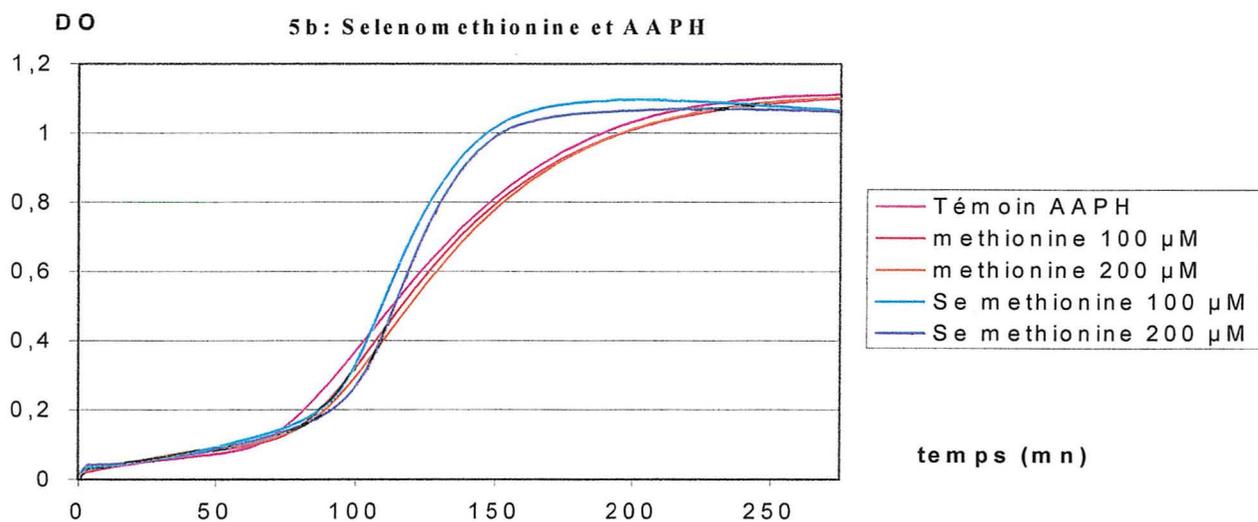
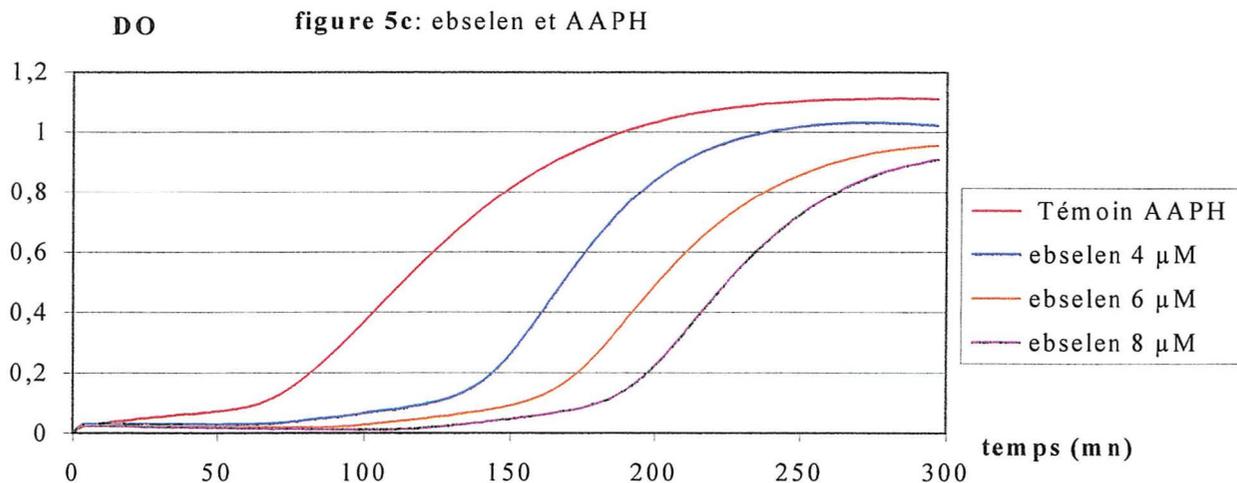


figure 5c: ebselen et AAPH



II-3 SPECTRE D'ABSORPTION DANS L'ULTRA-VIOLET

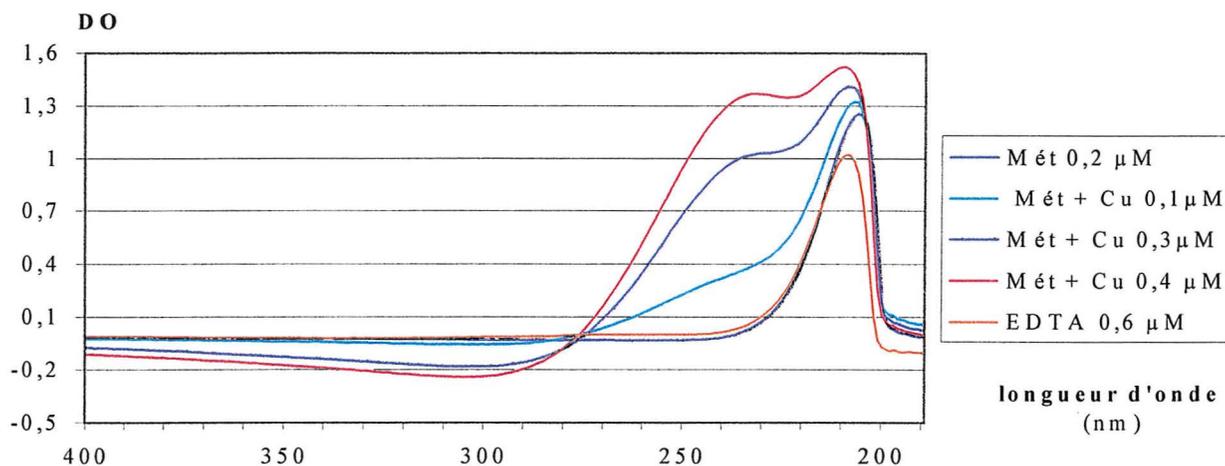
L'augmentation de la concentration en cuivre dans les solutions d'acides aminées entraîne une modification du spectre d'absorption U.V de ces acides aminés. Cette modification du spectre U.V des acides aminés se traduit par l'apparition d'un pic d'absorption compris entre 230 et 240 nm correspondant à la formation d'un composé entre le cuivre et les différents acides aminés. L'apport de l'EDTA entraîne une diminution de cet épaulement traduisant la réversibilité du produit formé entre le cuivre et les acides aminés (figures 6 a,b,d,e,f).

Dans le cas de la cystéine (figure 6 f) on constate que la présence de l'EDTA provoque une diminution du pic compris entre 230 et 240 nm, mais ne permet pas de retrouver le spectre initiale de la cystéine.

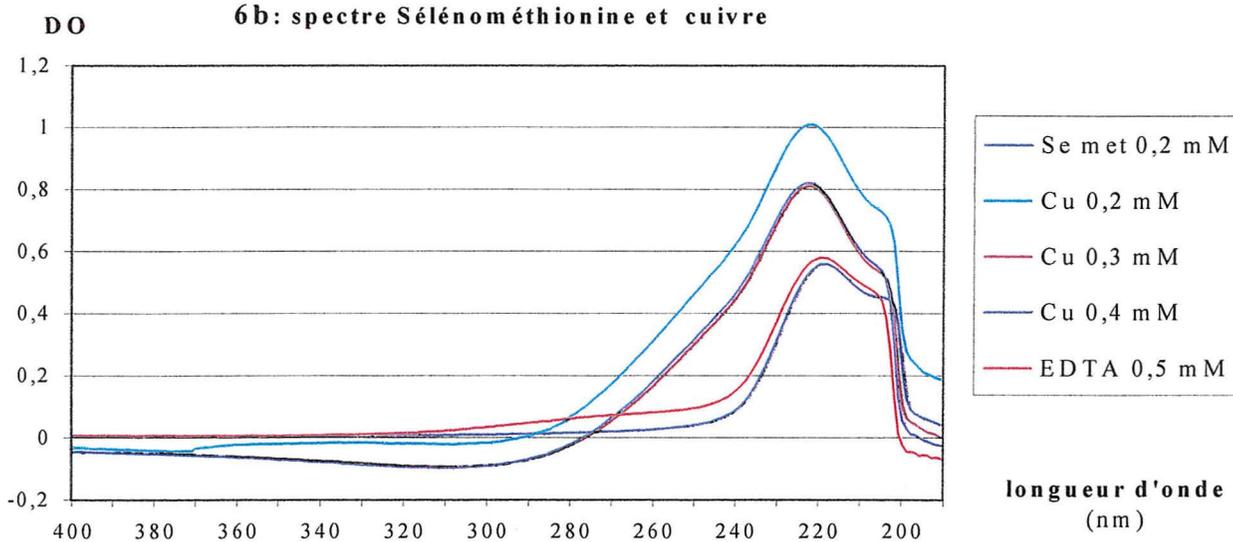
Le spectre de l'Ebselen n'est pas modifié par l'ajout de cuivre, laissant supposer l'absence de réaction entre l'Ebselen et le Cuivre (figure 6c).

Figure n°6: Modification du spectre UV des acides aminés (0,2 mM) et de l'Ebselen (0,2 mM) en présence de cuivre. Méthionine (a), Sélénométhionine (b), Ebselen (c), Sélénocystine (d), Cystine (e), Cystéine(f).

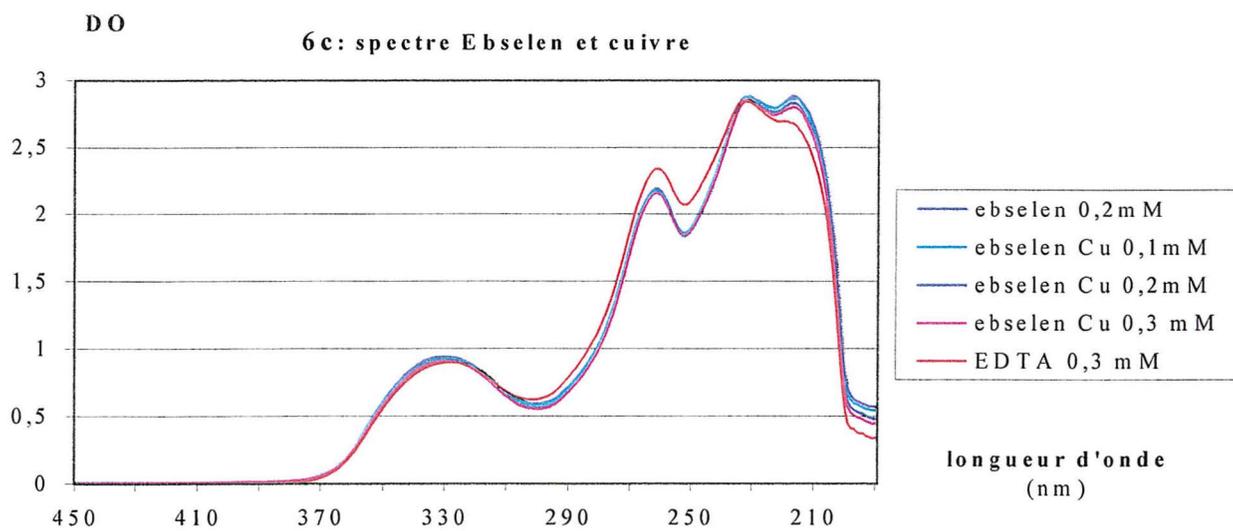
6a: spectre methionine et cuivre



6b: spectre Sélénométhionine et cuivre

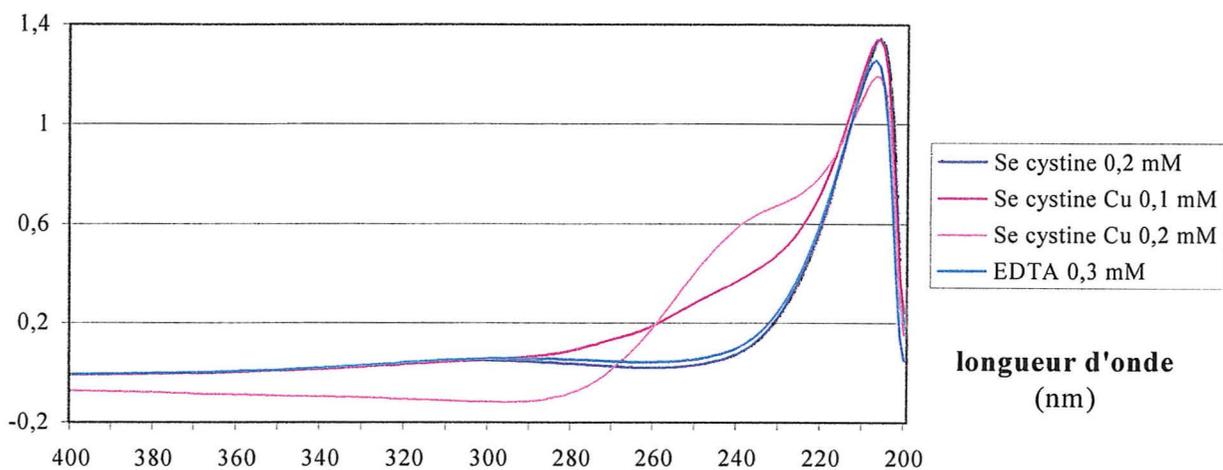


6c: spectre Ebselen et cuivre



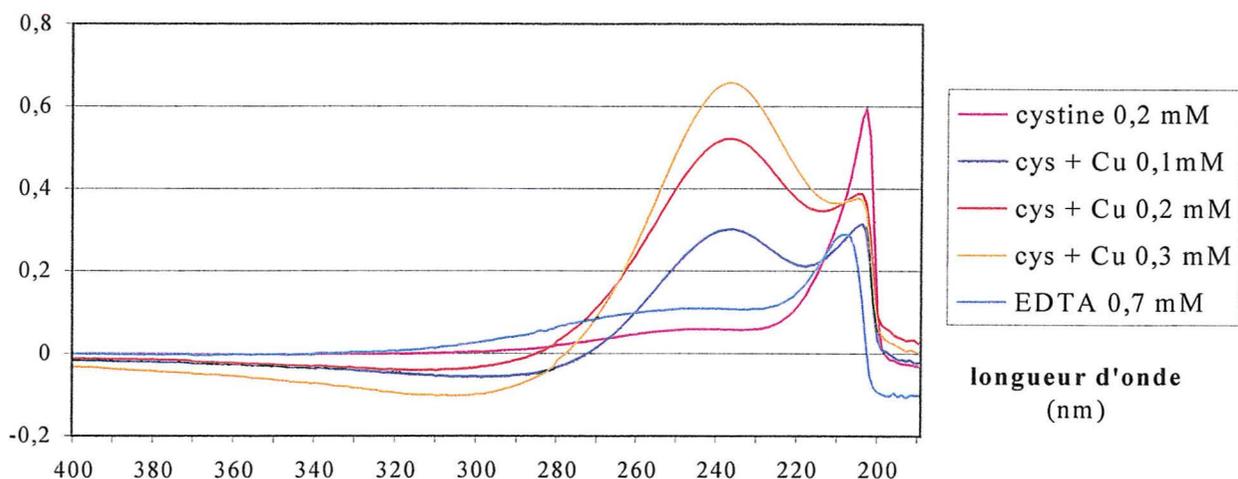
DO

6d: spectre de la sélénocystine et cuivre



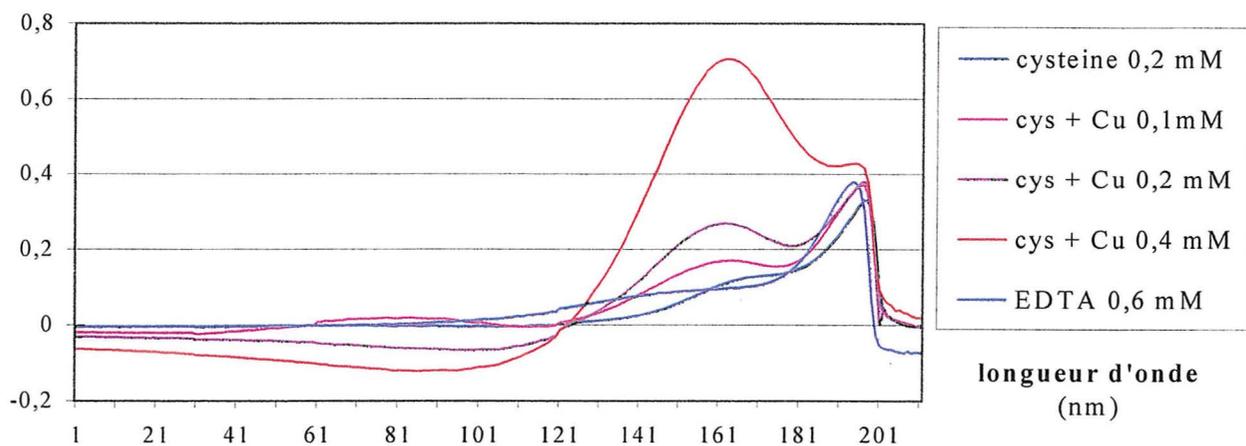
6e: spectre de la cystine et du cuivre

DO



6f: spectre cysteine et cuivre

DO



II-4 SIGNAL RPE

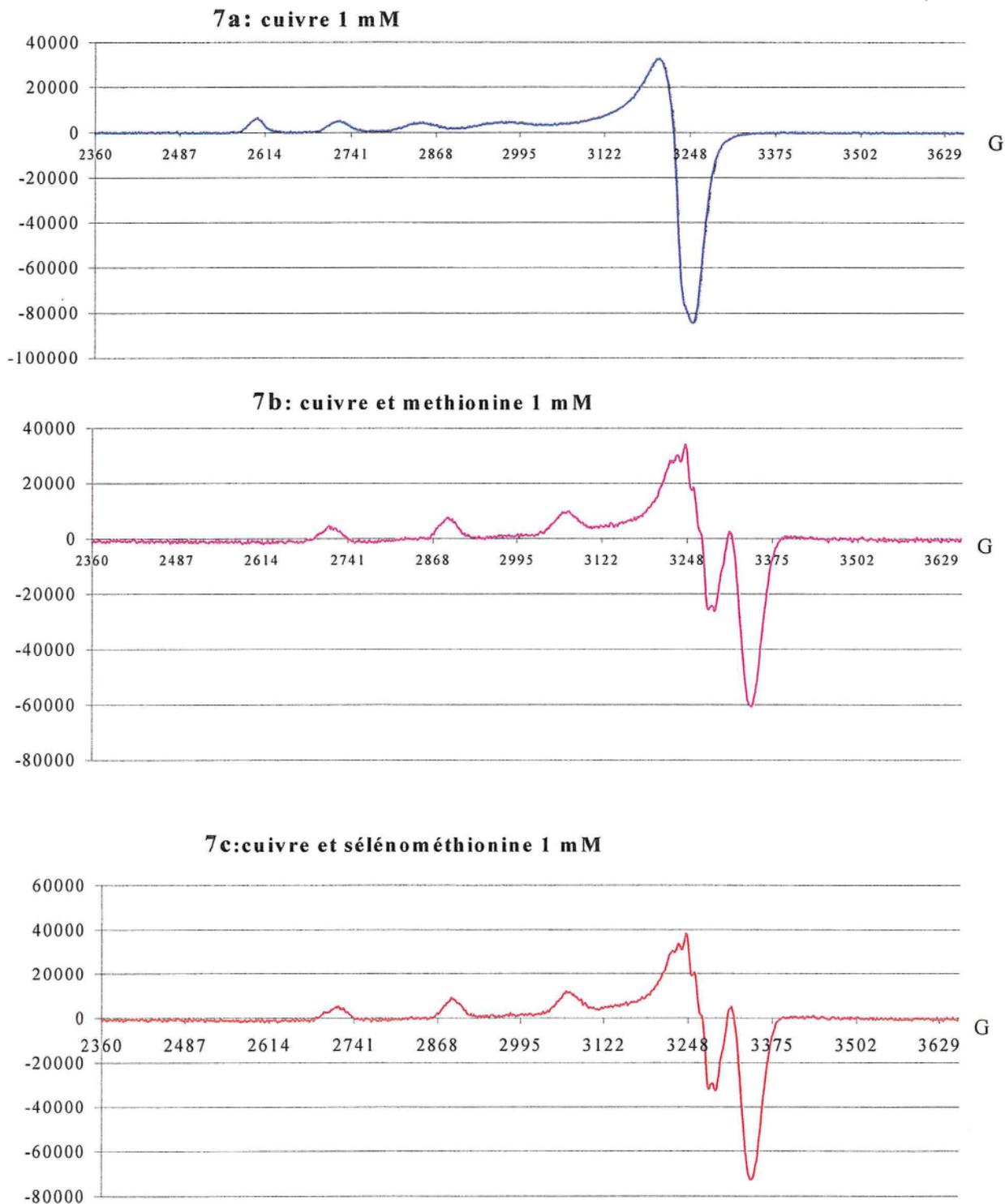
Le cuivre II possédant un seul électron célibataire produit un signal caractéristique en RPE. Le noyau de l'atome de cuivre ayant un spin nucléaire $I=3/2$ un signal à 4 raies est donc obtenu. Le signal de la solution à pH 4 de CuCl_2 à 1 mM est caractéristique de l'atome de cuivre (figure 7a).

Une solution à 1 mM d'Ebselen pour 1 mM de Cu ne donne pas de signal RPE. Ceci peut s'expliquer soit par l'absence de formation de complexe entre le Cu et l'Ebselen, soit par la formation d'un produit insoluble au pH de la solution.

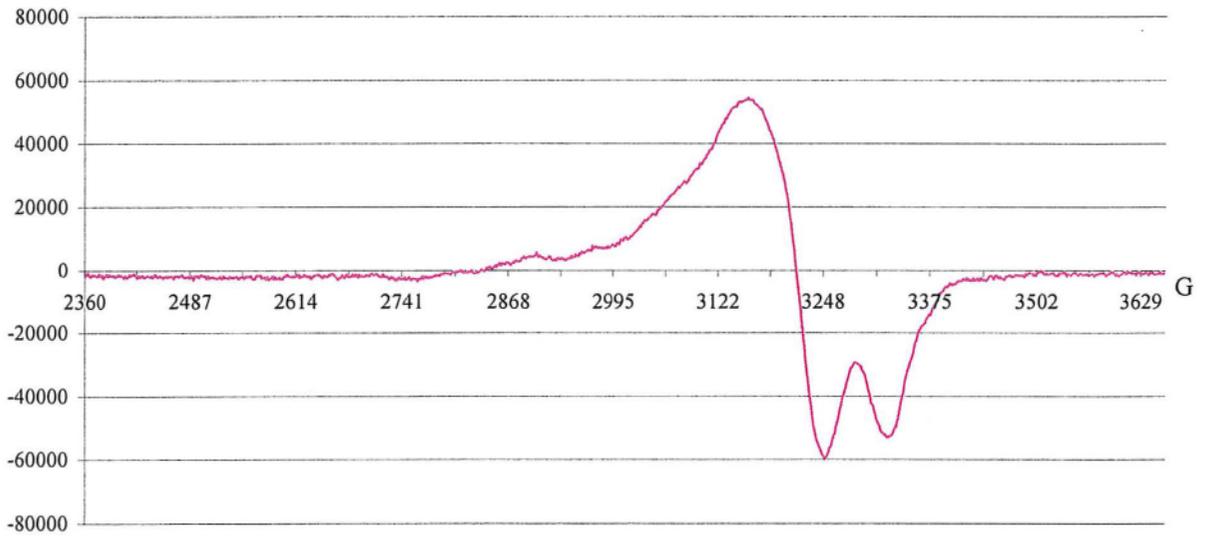
Pour la méthionine et la sélénométhionine une solution à 1 mM d'acide aminé pour 1 mM de Cu donne un signal RPE. Ce signal est différent du signal du Cu libre obtenu à pH 4. Il y a donc bien formation d'un complexe entre la méthionine, ou son dérivé sélénié, et le Cu. Par intégration de la surface du signal la stœchiométrie du complexe à 2 acides aminés pour 1 Cu a pu être déterminée (figures 7 bc).

Dans le cas de la cystéine de la cystine et de la sélénocystine on obtient aussi un signal RPE différent du signal RPE du Cu libre démontrant la formation d'un composé entre ces acides aminés et le Cu. Dans le cas de ces composés un large signal RPE est obtenu laissant supposer l'existence de plusieurs types de complexes en solution. (figures 7 d,e,f).

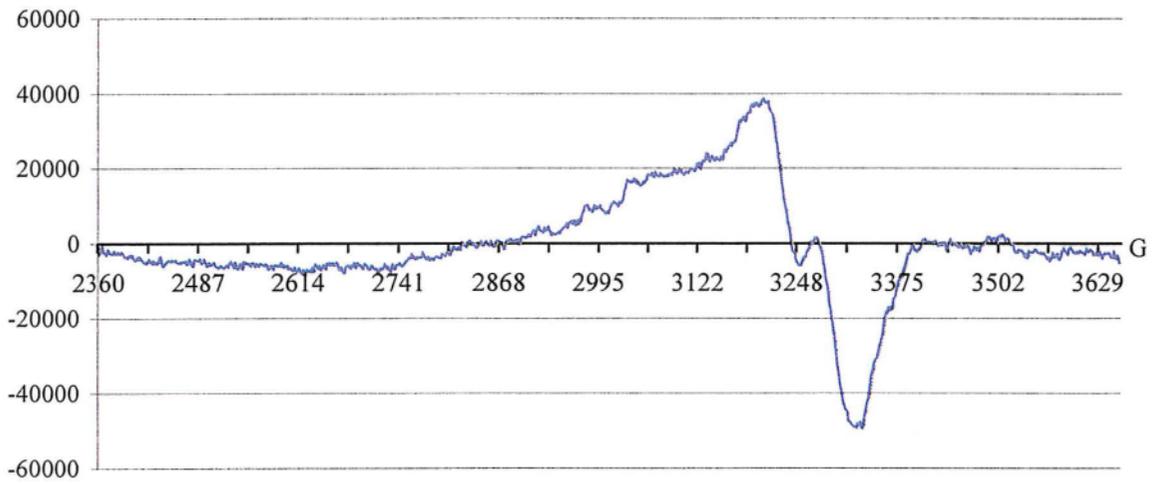
Figure n°7 : spectre RPE des acides aminés et du cuivre (a) , méthionine (b), sélénométhionine (c), cystine (d), séléncystine (e), cystéine (f).



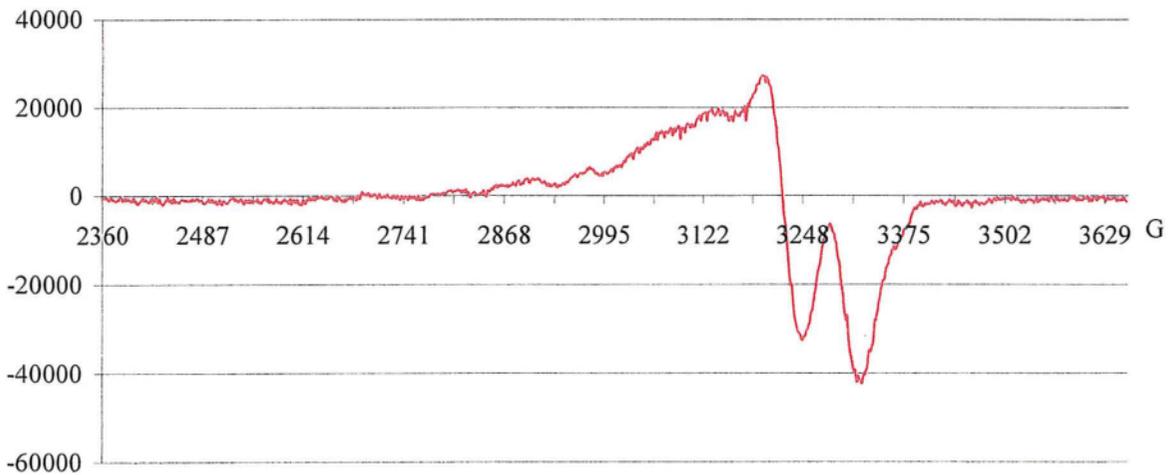
7d: cuivre et cystine 1 mM



7e: cuivre et sélénocystine 0,1 mM



7f: cystéine et cuivre 1 mM



III DIMINUTION DE LA FLUORESCENCE DU TRYPTOPHANE

L'Apo B 100 contient 37 résidus tryptophanes. Une fraction de ces résidus tryptophane va avoir sa fluorescence inhibée par la fixation des atomes de Cu sur l'Apo B 100 des LDL. Ce « quenching » de fluorescence des tryptophanes est un phénomène rapide qui est dépendant de la quantité de Cu fixé sur les LDL.

L'apport de quantités croissantes de cuivre s'accompagne d'une diminution de la fluorescence des LDL. Dans le cas de l'Ebselen on constate que la présence du produit n'empêche pas le « quenching » de fluorescence par le cuivre ceci signifie que l'Ebselen n'interfère pas avec la fixation du Cu sur les LDL.

Pour les acides aminés et leurs dérivés séléniés la diminution de fluorescence est moins importante que pour les LDL témoins, ceci pour une concentration de cuivre identique. Ces résultats montrent que les acides aminés testés réagissent avec le cuivre en limitant sa fixation sur les LDL (figure n°8).

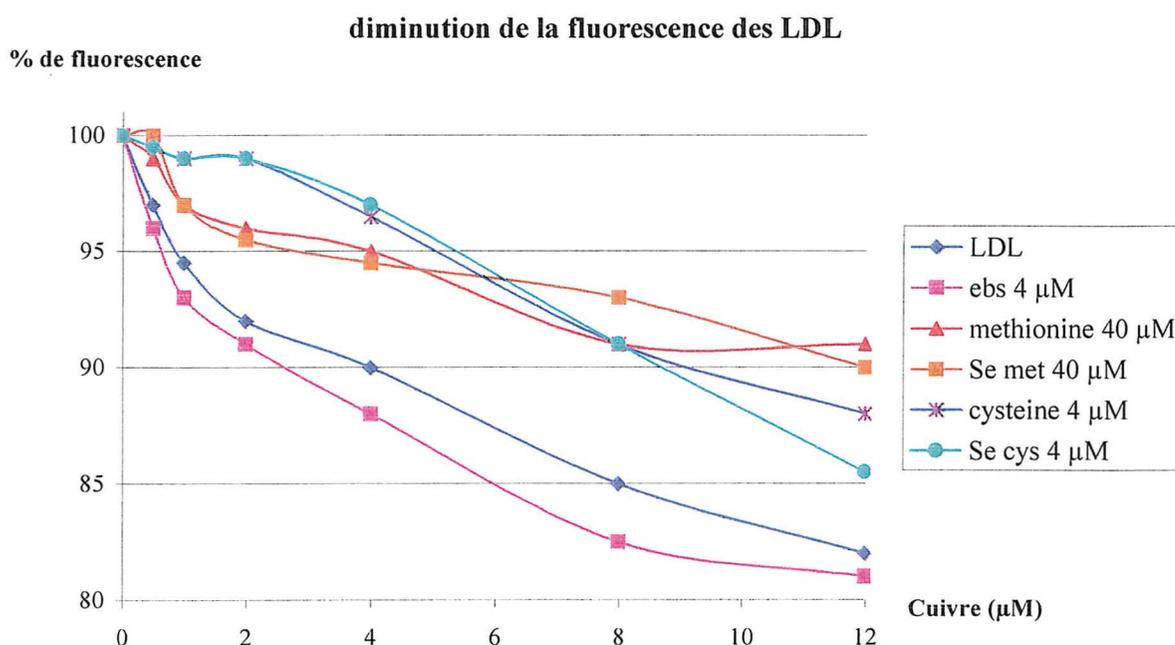


Figure n°8: Etude de la fixation du cuivre sur les LDL par mesure de la diminution de la fluorescence des LDL en % (ref LDL sans Cu)

IV MESURE DE L'ACTIVITE GLUTATHION PEROXYDASE

Les produits sélénés présentent une activité glutathion "peroxydase like". Cette activité est la plus élevée pour l'Ebselen. Cependant la séléno-cystine et dans une bien moindre mesure la séléno-méthionine présentent aussi cette activité.

Dans le cas de la séléno-méthionine la faible activité constatée et la structure de l'acide aminé nous font penser que l'activité mesurée pourrait être due à des produits de dégradation.

Dans le cas de la cystéine et de la cystine nous avons une diminution de la concentration en NADPH₂ mais celle-ci précède l'ajout de T-butylhydroperoxyde dans le milieu réactionnel et ne peut donc pas être considérée comme une activité glutathion peroxydase. Cette consommation de NADPH₂ peut s'expliquer par la réduction des ponts S-S en SH₂ par le NADPH₂, ces ponts S-S pouvant se former entre les acides aminés soufrés et le glutathion présent dans le milieu.

Tableau I : Activité glutathion peroxydase des produits

| produit | methionine | Séléo methionine | cystéine | cystine | Séléo cystine | Ebselen |
|---------------------|------------|---------------------|----------|---------|------------------|---------|
| Activité en U/mM | 0 | 7 | 0 | 0 | 1700 | 1900 |

V ACTIVITE "SCAVENGER" DE RADICAUX LIBRES

L'activité "scavenger" de radicaux libres se traduit par l'apparition d'un temps de latence vis-à-vis de l'oxydation de ABTS. Seule la cystéine et notre témoin de trolox présentent une activité « scavenger » vis à vis des radicaux testés dans la gamme de concentration utilisées.

L'activité de la cystéine est plus faible que celle du trolox. Pour la cystéine cette activité « scavenger » du produit s'additionne à celle du trolox lorsqu'ils sont ensemble en solution. Les autres acides aminés n'ont pas d'activité scavenger même en présence de trolox.

L'Ebselen seul en solution ne présente pas d'activité "scavenger". Par contre en solution avec le trolox on constate une augmentation de l'activité du trolox. Cette augmentation d'activité augmente avec la dose d'Ebselen apportée. L'Ebselen potentialise l'activité scavenger de radicaux libres du trolox (figure n°9).

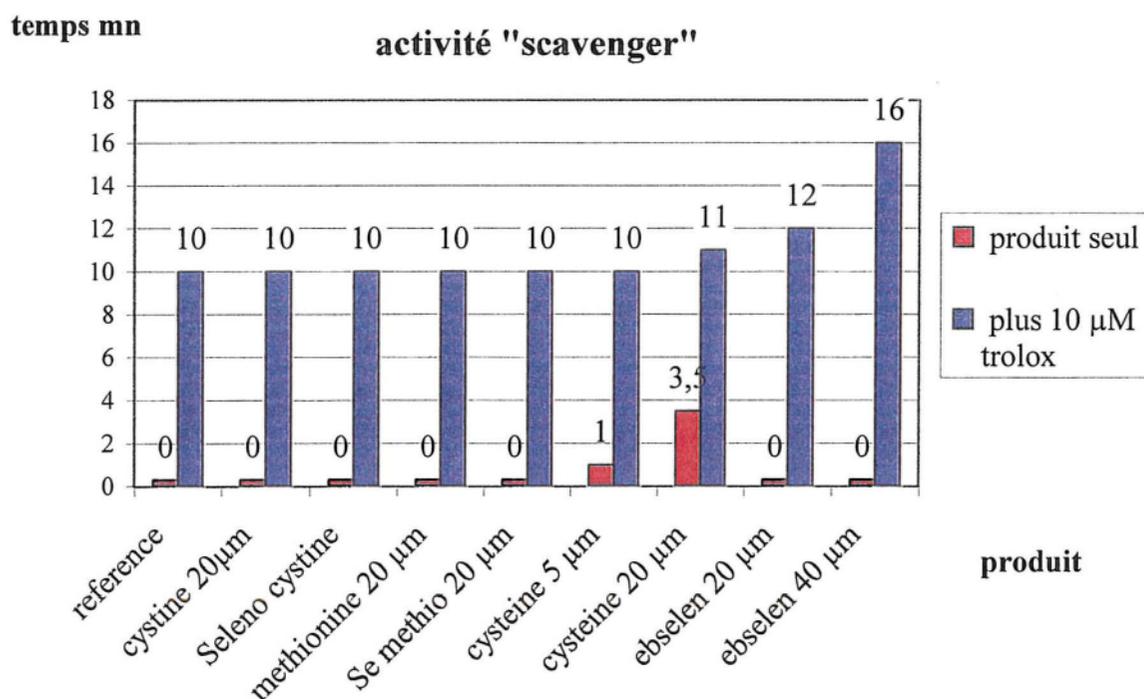


Figure n° 9: Activité « scavenger » de radicaux libres

VI EFFET DE LA COMPLEXATION SUR L'ACTIVITE OXYDO-REDUCTRICE DU CUIVRE

La présence du cuivre provoque l'oxydation de l'acide ascorbique qui se traduit par la diminution de son absorbance à 265 nm. En absence de cuivre on constate aussi une faible diminution de l'absorbance de l'acide ascorbique liée à son oxydation spontanée (figure 12 b).

La présence des molécules antioxydantes va moduler la cinétique d'oxydation de l'acide ascorbique. L'effet des produits antioxydants testés varie en fonction de la molécule testée et de la présence ou de l'absence de cuivre dans le milieu réactionnel. (figure 12 a ,b).

* L'Ebselen ne modifie pas la cinétique d'oxydation de l'acide ascorbique par le cuivre. La présence d'Ebselen en solution avec l'acide ascorbique ne provoque pas l'oxydation de l'acide ascorbique. Ce résultat est en accord avec l'absence de formation de complexes entre le cuivre et l'Ebselen. L'effet antioxydant de l'Ebselen n'est pas du à une interaction avec le Cu.

* La sélénométhionine et la méthionine ne provoquent pas l'oxydation d'une solution d'acide ascorbique. Par contre l'oxydation de l'acide ascorbique, par le cuivre, va être favorisée par la méthionine et la sélénométhionine. La formation de complexes entre le cuivre et ces acides aminés augmente le pouvoir oxydant du cuivre vis à vis de l'acide ascorbique.

* La complexation du cuivre par la cystéine va diminuer la vitesse d'oxydation de l'acide ascorbique par le cuivre. Par contre la cystéine seule en solution, avec l'acide ascorbique, ne provoque pas l'oxydation de l'acide ascorbique.

* La sélénocystine et la cystine vont se différencier des autres molécules par leur capacité à provoquer l'oxydation de l'acide ascorbique en absence de cuivre. En présence de cuivre ces deux molécules vont augmenter le pouvoir oxydant du cuivre vis-à-vis de l'acide ascorbique.

figure 12b: diminution de l'absorbance de l'acide ascorbique en absence de cuivre. Acide ascorbique 60 μ M, antioxydants 10 μ M, cuivre 3 μ M

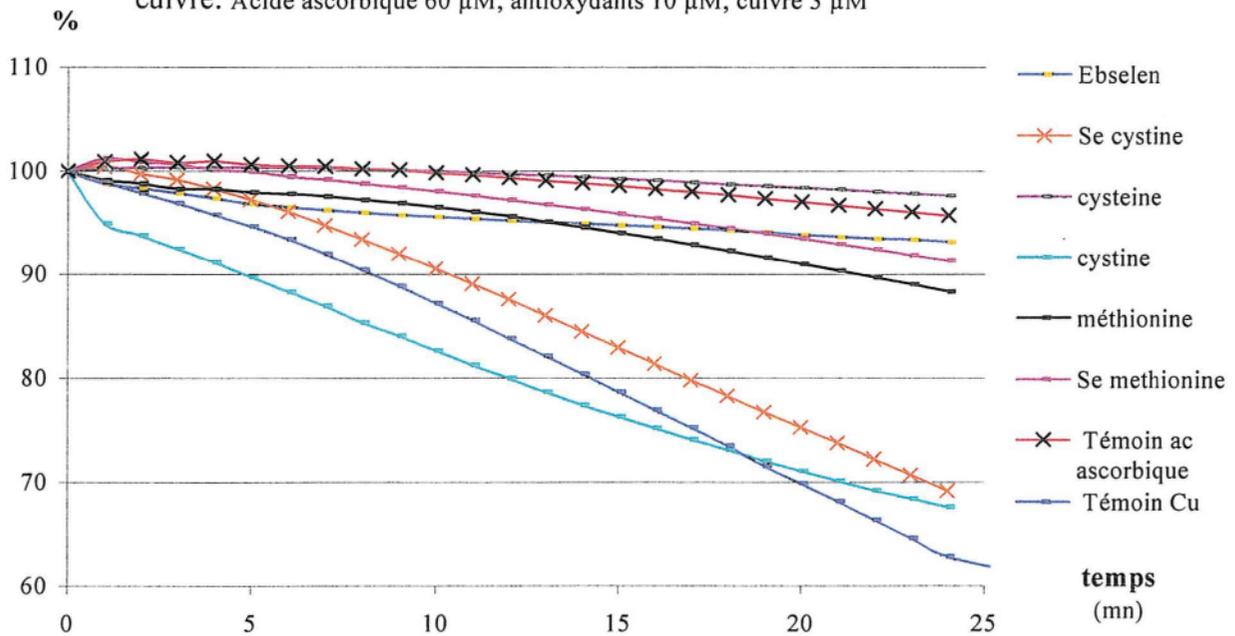
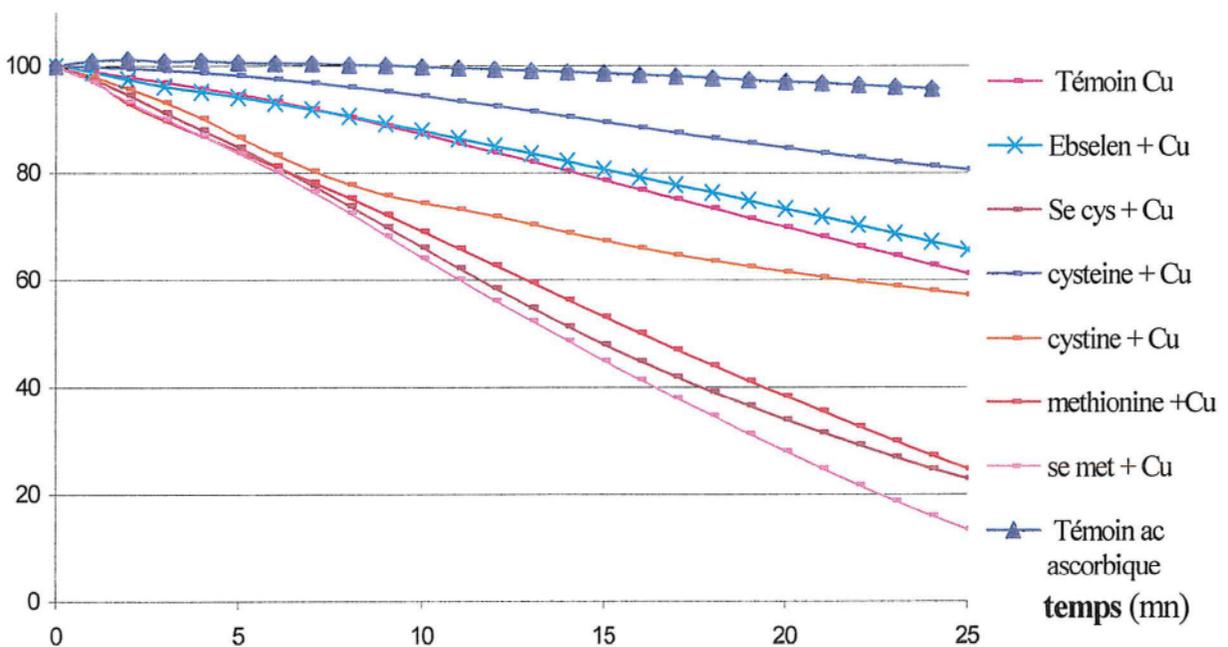


figure 12 a: diminution de l'absorbance de l'acide ascorbique en présence de cuivre. Cuivre 3 μ M, Antioxydant 10 μ M, Ac ascorbique 60 μ M



E DISCUSSION

L'origine de ce travail est basée sur le fait qu'une fraction du sélénium plasmatique ce retrouve préférentiellement dans les LDL par rapport aux autres lipoprotéines. Le sélénium est un composé qui intervient dans les systèmes de défense de l'organisme contre le stress oxydant. C'est pourquoi nous avons voulu évaluer l'effet antioxydant du sélénium sur l'oxydation in vitro des LDL. De précédentes manipulations n'avaient pas montré d'effets antioxydant des sélénates et des sélénites sur l'oxydation des LDL par le cuivre aussi avons nous recherché un effet antioxydant pour les acides aminés séléniés et l'Ebselen. En parallèle les acides aminés soufrés ont été testés afin d'évaluer le bénéfice du sélénium par rapport au soufre.

I EFFET ANTIOXYDANT

Nous avons réalisé oxydation des LDL par de 2 systèmes différents, le Cu et AAPH. Ces produits n'ont pas le même mécanisme oxydant ce qui nous donne des information sur les mécanismes antioxydants de nos produits séléniés.

Notre travail met en évidence un effet antioxydant des acides aminés séléniés vis à vis de l'oxydation des LDL par le cuivre mais pas d'effet protecteur pour l'oxydation par l'AAPH.

En ce qui concerne l'activité des acides aminés soufrés nos résultats confirment le rôle protecteur de ces acides aminés vis à vis de l'oxydation des LDL par le Cu. Cet effet a été montré précédemment pour la méthionine et la cystéine (Lynch 1997 ; Patterson 1998).

Les résultats concernant les capacités antioxydantes de la cystine sur l'oxydation des LDL par le cuivre varient selon les auteurs. Les travaux menés par Lynch n'ont pas montré d'effet antioxydant pour la cystine (Lynch 1997),. alors que Santanam a trouvé un effet protecteur de la cystine sur l'oxydation des LDL par le Cu (Santanam 1995 ; Graham 1998 revue). Cependant l'effet antioxydant, de la cystine, n'avait pas été évalué sur les mêmes critères. Lynch avait mesuré la modification de la mobilité électrophorétique des LDL en utilisant un temps d'oxydation beaucoup plus long (24 heures). L'évaluation de l'oxydation des LDL, par la modification de mobilité électrophorétique, va s'intéresser aux produits générés par l'oxydation mais ne prendra pas en compte la cinétique de l'oxydation. Santanam,

par contre, avait utilisé la même méthode que nous, c'est à dire la mesure de la formation des diènes conjugués.

La différence d'activité entre le sélénium et le soufre est difficile à évaluer. Pour l'oxydation des LDL par le Cu, nous trouvons un effet antioxydant faiblement supérieur dans le cas de la sélénométhionine par rapport à la méthionine alors que l'activité antioxydante de la sélénocystine est inférieure à celle de la cystine.

Pour l'Ebselen nous avons un effet antioxydant pour l'oxydation des LDL par le cuivre et par l'AAPH. Cet effet protecteur avait été rapporté dans des précédentes publications. (Noguchi 1994 ; Lass 1996)

Les différences de résultats entre l'Ebselen et les acides aminés :

- protection par l'Ebselen des LDL vis-à-vis de l'oxydation par l'AAPH,
- absence de restauration de l'activité oxydante du cuivre par augmentation de sa concentration, en présence d'Ebselen,
- absence de modification de la vitesse de propagation de l'oxydation quel que soit la concentration en Ebselen,
- effet protecteur sur les LDL issues d'un plasma enrichi en Ebselen,

laissent présager que les mécanismes antioxydants des acides aminés et de l'Ebselen sont différents.

Nous avons envisagé 3 mécanismes antioxydants possibles :

- La formation de complexes
- Une activité scavenger de radicaux libres
- Une activité glutathion peroxidase

II FORMATION DE COMPLEXES

L'oxydation des LDL par le Cu nécessite la fixation préalable des atomes de Cu sur ces LDL. Cette fixation se réalise sur la partie protéique de la lipoprotéine et semble mettre en œuvre deux types de sites de fixation. Les acides aminés histidines présents dans l'apo B 100 pourraient constituer un de ces sites (Kuzuya 1992). Le cuivre se fixe aussi sur un autre site de fixation de nature inconnu qui permettra la réduction du cuivre en Cu⁺. (Wagner 1997)

La formation de complexes entre le cuivre et des composés présents dans le milieu réactionnel va empêcher la fixation du cuivre sur les LDL. La fixation du cuivre étant une étape indispensable pour permettre l'oxydation des LDL, la formation de complexes va donc

empêcher l'oxydation des LDL en limitant la fixation du cuivre sur les LDL (Lodge 1998). Une autre possibilité envisagée est que la formation de complexes entre les acides aminés testés et le cuivre puisse modifier la capacité oxydo-réductrice du cuivre.

La recherche de la formation de complexes entre nos composés et le cuivre a été réalisée de différentes manières.

- Par spectrophotométrie U.V.
- Par RPE en milieu gelé

La capacité oxydo-réductrice du cuivre a été évaluée par la cinétique d'oxydation de l'acide ascorbique par le cuivre

II-1 FORMATION DE COMPLEXES PAR LES ACIDES AMINES

Patterson a montré que la chaîne latérale des acides aminés intervenait dans la protection des LDL vis à vis de l'oxydation par le cuivre (Patterson 1998). L'étude RPE des complexes Cu/acides aminés, réalisée par Rotilo, a mis en évidence le rôle des atomes de soufre et d'azote, de la cystéine et de la méthionine, dans la structure de ces complexes (Rotilo 1971). Bien que cette publication n'ait pas étudiée les acides aminés sélénisés, il est probable que les complexes formés entre ces acides aminés et le cuivre aient la même structure.

Les résultats des spectres U.V. et RPE montrent la formation de complexes entre les acides aminés testés et le cuivre. Les cinétiques d'oxydation des LDL par le cuivre nous montrent que l'effet antioxydant des acides aminés se manifeste par l'augmentation du temps de latence mais aussi par une diminution de la vitesse de la phase de propagation. La diminution de la vitesse de la phase de propagation est un phénomène que l'on retrouve lorsque l'on réalise l'oxydation des LDL par le cuivre en présence de molécules complexantes du cuivre comme EDTA. D'autre part, l'augmentation des concentrations en cuivre permettent de restaurer l'activité oxydante de celui-ci; ces deux remarques vont dans le sens de la formation de complexes entre le cuivre et les acides aminés.

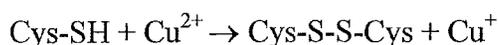
Nous avons voulu savoir comment la formation de complexes entre les acides aminés et le cuivre empêcher l'oxydation des LDL, soit en limitant la fixation du cuivre sur celles-ci, soit en modifiant le pouvoir oxydo-reducteur du cuivre.

La fixation du cuivre sur les LDL a été évaluée par mesure du "quenching" de fluorescence des groupements tryptophane par le cuivre. On constate une moindre diminution de fluorescence des groupements tryptophane des LDL en présence de cuivre et d'acides

aminés. Ce qui est en faveur d'une diminution de la fixation du cuivre sur les LDL en présence d'acides aminés.

L'expérience avec l'acide ascorbique a montré que seule la complexation avec la cystéine entraîne une diminution du pouvoir oxydant du cuivre. Au contraire avec les autres acides aminés la complexation du cuivre augmente ce pouvoir oxydant. La formation de complexes entre le cuivre et les acides aminés ne peut donc pas être considérée comme responsable d'une diminution des capacités oxydo-réductrices du cuivre, excepté pour la cystéine.

Dans le cas de la cystéine il semblerait que cet acide aminé n'agisse pas comme un simple complexant du cuivre. La récupération partielle de l'activité oxydante du cuivre lors de l'augmentation de la concentration en cuivre et la modification du spectre UV après ajout de EDTA font penser que d'autres mécanismes interviennent. La cystéine est une molécule instable en solution, qui en présence de cuivre va être rapidement oxydée en cystine en même temps que le cuivre est réduit.



La réduction du cuivre peut participer au mécanisme antioxydant de la cystéine.

L'enrichissement du plasma en sélénocystine a montré que la présence de sélénocystine liée aux LDL ne permettait pas à celle-ci d'exprimer son pouvoir antioxydant. Il semble donc que la présence de sélénocystine, sous une forme libre soit nécessaire, pour que celle-ci agisse comme antioxydant en vers le cuivre. Ce résultat est favorable à l'hypothèse de formation de complexes entre le cuivre et la sélénocystine.

La formation de complexe et la réduction de fixation du cuivre sur les LDL, qui en résulte, semble donc intervenir dans le mécanisme antioxydant des acides aminés, excepté peut être pour la cystéine.

II-2 FORMATION DE COMPLEXES AVEC L'EBSELEN

Comme la structure de l'Ebselen le laissait prévoir, les spectres U.V et RPE n'ont pas permis de mettre en évidence la formation d'un complexe entre le cuivre et l'Ebselen. Les résultats de mesure de fluorescence, des acides aminés tryptophane des LDL, semblent

indiquer l'absence de modification de la fixation du cuivre sur les LDL par l'Ebselen. La cinétique d'oxydation de l'acide ascorbique par le cuivre n'est pas modifiée par la présence d'Ebselen dans le milieu réactionnel.

Les cinétiques d'oxydation des LDL par le Cu nous montrent que, contrairement aux acides aminés testés, la présence d'Ebselen augmente le temps de latence, sans pour autant modifier la vitesse de la phase de propagation comme cela est le cas lorsque le cuivre est complexé. Nous pouvons donc écarter l'hypothèse de la formation d'un complexe pour expliquer le mécanisme antioxydant de l'Ebselen. La formation d'un complexe entre l'Ebselen et le fer avait déjà été réfutée par Noguchi. (Noguchi 1992)

III EFFET " SCAVENGER " DE RADICAUX LIBRES

L'effet scavenger de radicaux libres de nos composés a été évaluée par la mesure de l'oxydation de l'ABTS par le mélange Myoglobine/ H₂O₂.

III-1 POUR LES ACIDES AMINES

De tous les acides aminés testés seule la cystéine a présenté une activité " scavenger " de radicaux libres. Cette activité est liée à la présence de groupements SH libres (Lim 1993). Cette activité peut représenter un mécanisme antioxydant possible pour la cystéine. Cependant la cystéine n'a pas montré d'effet protecteur contre l'oxydation des LDL par l'AAPH. L'AAPH étant un générateur de radicaux libres on pourrait s'attendre à ce qu'un composé scavenger de radicaux libres présente une activité antioxydantes vis à vis de ce produit. Cette absence d'effet antioxydant pourrait être liée à la stabilité en solution de la cystéine qui subit rapidement une auto-oxydation en cystine *in vitro* (Lynch 1997). Cependant, l'existence de systèmes réducteurs *in vivo* pourrait permettre à ce composé d'exprimer ce mécanisme antioxydant, en stabilisant cet acide aminé sous forme cystéine. Les groupements thiols libres de l'apo B 100, liées à la présence d'acides aminés cystéine, étant considérés comme des antioxydants des LDL . (Ferguson 1997)

Les autres acides aminés sont dépourvus de groupements SeH ou SH libres, ils n'ont pas montré d'activité scavenger de radicaux libres ni d'effets antioxydants contre AAPH. Cependant il n'est pas impossible, pour la sélénocystine, qu'une activité scavenger de radicaux libres se manifeste *in vivo* après réduction du pont Se-Se.

III-2 EFFET DE L'EBSELEN

Nos manipulations n'ont pas mis en évidence d'effet " scavenger " sur les radicaux générés avec la myoglobine. Cependant l'Ebselen a montré des propriétés antioxydantes avec l'AAPH. Les données fournies par la littérature sont contradictoires en ce qui concerne la capacité scavenger de radicaux libres de l'Ebselen.

Lass a montré que l'Ebselen présentait un effet antioxydant avec l'AAPH et qu'il pouvait réagir avec le radical généré par l'AAPH ; Lass retenait l'effet scavenger de radicaux libres comme un mécanisme d'action possible de l'Ebselen (Lass 1996). D'autres travaux montraient que l'Ebselen avait un effet scavenger vis-à-vis des radicaux du trichlorométhyle peroxyde. Cependant les travaux réalisés par Noguchi n'avaient pas trouvé d'effet antioxydant de l'Ebselen avec l'AAPH et présentaient l'Ebselen comme un produit ayant une faible activité " scavenger ". (Noguchi 1992/1994)

L'absence d'effet de l'Ebselen vis à vis de l'ABTS ne sont pas en faveur d'un effet scavenger de radicaux libres. Les propriétés antioxydantes de l'Ebselen sur l'oxydation des LDL par AAPH peuvent être dues à un autre mécanisme d'action faisant intervenir la vitamine E que nous discuterons ultérieurement.

IV ACTIVITE GLUTATHION PEROXYDASE

L'inhibition de l'activité oxydante du cuivre peut être due à la réduction des groupements peroxydes des LDL en alcools. Ces groupements peroxydes réagiraient avec les métaux de transitions, selon une réaction de Fenton, pour former des LO° susceptibles d'initier la peroxydation lipidique. La glutathion peroxydase est une enzyme à sélénium, capable de réduire les groupements peroxydes, et prévenir de la sorte la peroxydation lipidique.

IV-1 EFFET DES ACIDES AMINES

Une activité glutathion peroxydase " like " de la sélénocystine a été mise en évidence. Cette activité peut donc représenter un mécanisme antioxydant possible pour la sélénocystine

vis-à-vis de l'oxydation des LDL par le Cuivre. Mais d'autres résultats vont à l'encontre de cette hypothèse.

En effet, on a constaté que l'augmentation de la concentration en cuivre lors de l'oxydation des LDL permettait de restaurer l'activité oxydante de celui-ci, or si la sélénocystine agissait par réduction des groupements peroxydes présents, l'augmentation de la concentration en cuivre ne devrait pas permettre la restauration de son activité sur l'oxydation des LDL.

D'autre part nous avons aussi montré que l'incubation du plasma avec de la sélénocystine ne modifiait pas la cinétique d'oxydation des LDL, or la réduction des groupements peroxydes par la sélénocystine devrait entraîner la résistance à l'oxydation, par le Cu, des LDL issues de ce plasma.

Cependant ces deux remarques ne sont justifiées que si l'initiation de l'oxydation des LDL par le cuivre est dépendante de la présence de groupements peroxydes dans les LDL. L'hypothèse a été avancée que cette initiation pourrait mettre en jeu d'autres composés notamment la vitamine E (Iwatsuki 1995).

La possibilité d'un rôle prooxydant de la vitamine E permet d'expliquer en parti le mécanisme oxydant du cuivre sur les LDL :

- . Pour être actif le cuivre doit être réduit en Cu^+ or le tocopherol peut réagir avec le Cu^{2+} pour former un radical tocophéryl et du Cu^+ .
- On a constaté que l'oxydation des LDL par le Cuivre pouvait se réaliser même en absence de groupement peroxydes détectables or le radical tocophéryl peut réagir avec les LH pour donner des radicaux L° prooxydant (Lynch 1995).

D'autre part si l'activité peroxydasique mise en évidence pour la sélénocystine ne semble pas suffisante pour protéger les LDL de l'oxydation *in vitro* il n'est pas exclu que cette propriété se manifeste de manière bénéfique *in vivo* en limitant la formation des peroxydes lipidiques.

IV-2 EFFET DE L'EBSELEN

Nous avons trouvé une activité glutathion peroxydase pour l'Ebselen. La réduction des groupements hydroperoxydes des LDL, a été proposée par de nombreux auteurs comme le mécanisme d'action antioxydant de l'Ebselen (Noguchi 1992). Nos résultats d'oxydation des LDL sont en accord avec cette hypothèse :

- Effet protecteur lors de l'oxydation des LDL par le Cu,
- Pas de récupération de l'effet oxydant du Cu quand on augmente sa concentration,
- Persistance de l'effet lors de l'enrichissement du plasma.

Cependant si on exclut un rôle scavenger de radicaux libres pour l'Ebselen l'explication du pouvoir antioxydant sur AAPH devient difficile.

Lass a émis l'hypothèse que la réduction des hydroperoxydes n'était pas le seul mécanisme d'action de l'Ebselen et que se produit pouvait agir en régénérant la Vitamine E présente dans les LDL (Lass 1996).

V INTERACTION AVEC LE TROLOX

La vitamine E est un anti-oxydant présent au niveau des LDL. Nous avons voulu savoir si les produits testés pouvaient avoir un effet antioxydant par réaction avec la vitamine E. Pour cela, nous avons réalisé la mesure de l'activité scavenger de radicaux libres par ABTS en présence de nos composés et d'un dérivé hydrosoluble de la vitamine E : le trolox

Motoyama avait montré, à partir d'une suspension de liposomes, que la L cystéine en solution aqueuse pouvait, par réaction avec le radical tocophéryl situé en phase lipidique, régénérer du tocophérol (Motoyama 1989). Bien que l'on constate une augmentation de l'activité du trolox en présence de cystéine cette augmentation d'activité semble liée à l'addition des actions de la cystéine et du trolox et non pas à la potentialisation de l'activité du trolox.

En ce qui concerne une éventuelle synergie entre les acides aminés et la vitamine E lors de l'oxydation *in vitro* des LDL nos résultats ne sont pas favorables à cette hypothèse. L'absence d'effet antioxydant des acides aminés lors de l'oxydation par AAPH n'est pas en faveur d'un tel mécanisme d'action.

Lass a proposé un mécanisme d'action antioxydant pour l'Ebselen lié à la régénération de la vitamine E. Il a démontré que l'Ebselen était capable de réagir avec le radical α -tocophéryl pour donner de l' α -tocophérol. La régénération de l' α -tocophérol permettant de protéger les LDL de l'oxydation par le cuivre et par AAPH.(Lass 1996)

Bien que nous ayons effectué nos manipulations avec du trolox, qui est un dérivé hydrosoluble de la vitamine E, nous constatons que l'activité " scavenger " du trolox est

augmentée alors que l'Ebselen ne présente pas d'activité "scavenger" propre. Cette augmentation de l'effet du Trolox s'explique par la régénération de celui-ci par l'Ebselen. Il n'est pas possible d'après nos résultats d'extrapoler que lors de l'oxydation des LDL en présence d'Ebselen l'effet antioxydant de celui-ci est en partie lié à la régénération de la vitamine E. Cependant les résultats obtenus avec le trolox vont dans le sens de l'hypothèse formulée par Laas

EFFETS DES DERIVES SELENIES ORGANIQUES SUR L'OXYDATION *IN VITRO* DES LDL.

CONCLUSION

L'athérosclérose est une maladie dont l'évolution est favorisée par le stress oxydant. Le fait que des enquêtes épidémiologiques aient montré que la consommation de produits ayant des propriétés antioxydantes était bénéfique contre l'athérosclérose renforce l'hypothèse du rôle du stress oxydant dans le développement de cette maladie. L'oxydation va provoquer des altérations des différentes classes des lipoprotéines, notamment des LDL. Ces LDLox vont présenter de nouvelles propriétés biologiques proathérogènes.

Le sélénium est un oligo-élément qui intervient de différentes manières dans le métabolisme antioxydant développé par les organismes. Cet élément présente des propriétés physico-chimiques antioxydantes qui expliquent son rôle biologique. Une fraction du sélénium plasmatique est en outre présent dans les LDL.

Le but de notre travail était de préciser si le sélénium présent, au niveau des LDL, pouvait protéger celles-ci du stress oxydant et participer, de la sorte, à la lutte contre l'athérosclérose.

Nos résultats montrent que les acides aminés séléniés présentent un effet antioxydant vis-à-vis de l'oxydation *in vitro* des LDL par le cuivre mais ne protègent pas les LDL de l'oxydation par l'AAPH. La sélénométhionine ne montre qu'une faible activité antioxydante supérieure à la méthionine alors que le pouvoir antioxydant de la sélélocystine est inférieur à celui de la cystine.

Bien qu'une activité glutathion peroxydase ait été mise en évidence pour la sélélocystine, le mécanisme antioxydant des acides aminés semble reposer sur la formation de complexes avec le cuivre. Cependant il n'est pas exclu que cette activité peroxydasique puisse se révéler bénéfique *in vivo* en limitant la formation des peroxydes et leurs effets cytotoxiques.

L'Ebselen, autre composé sélénié testé, montre un effet antioxydant lors de l'oxydation des LDL par le cuivre et par l'AAPH. Contrairement aux acides aminés, ce

composé ne forme pas de complexes avec le cuivre et ses propriétés antioxydantes reposent sur son activité glutathion peroxydase et éventuellement son interaction avec la vitamine E.

Il est difficile à partir de ces résultats de prédire l'effet *in vivo* de ces composés. Le rôle bénéfique de ces composés va dépendre de l'affinité de ceux-ci pour les LDL et du mécanisme antioxydant mis en jeu. Les expériences d'enrichissement du plasma avec ces composés peuvent nous apporter des renseignements sur ce point.

Ces expériences ont montré que l'Ebselen présentait une affinité pour les LDL et que l'effet antioxydant du composé subsistait. Ce composé, développé par l'industrie pharmaceutique pour devenir un médicament anti-inflammatoire, pourrait ainsi présenter un rôle bénéfique dans la protection contre l'athérosclérose.

Pour la sélénocystine, seul acide aminé testé dans ces mêmes conditions, on a pu montrer là aussi une affinité de ce composé pour les LDL. Mais, bien que les concentrations en sélénium retrouvées aient été supérieures à celles mesurées *in vivo*, ce produit n'a pas montré d'effets antioxydants.

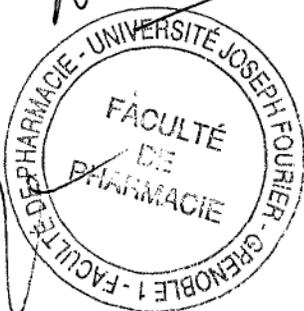
L'extrapolation des résultats *in vitro* à l'*in vivo* est difficile. En effet de nombreux points restent inconnus en ce qui concerne la nature et le mode de fixation du sélénium dans les LDL. De plus les mécanismes oxydants mis en jeu *in vivo* n'étant pas encore identifiés, ce sélénium pourrait agir sur ces mécanismes sans que nos expériences puissent le mettre en évidence.

VUE ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble le 26 Mai 2003



Le Doyen



P DEMENGE

Le President du Jury



A. M ROUSSEL

H REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Arteel GE, Mostert V, Oubrahim H, Briviba K, Abel J, Sies H. Protection by selenoprotein P in human plasma against peroxynitrite-mediated oxidation and nitration. *Biological chemistry*, 1998 ; **379 (8-9)** : 1201-1205
2. Ascherio A, Willett WC. Are body iron stores related to the risk of coronary heart disease?. *New England journal of medicine* 1994; **330**: 1152-1154.
3. Berry MJ, Maria AL, Kieffer JD, Harney JW, Larsen PR. Substitution of cystéine for selenocysteine in type I iodotyronine deiodinase reduces the catalytic efficiency of the protein but enhances its translation. *Endocrinology* ;1992, **131**:1848-52
4. Bonnet J, Elias A. Athérosclérose et plaque d'athérome. *Encyclopédie médicale et chirurgicale(Elsevier Paris) Cardiologie et angéiologie* ;1997, **11-605-A-10**, 19p
5. Brown MG, Goldstein JL. A receptor mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, 1986 ; **232** :34-47
6. Burk R, Hill K. Regulation of selenoproteins. *Annual review of nutrition*. 1993 ; **13** : 65-81
7. Burk RF, Hill KE, Awad JA, Morrow JD, Kato T, Cockell KA, Lyons PR. Pathogenesis of diquat-induced liver necrosis in selenium deficient rats : assessment of the roles of lipid peroxidation and selenoprotein P. *Hepatology* 1995 ; **21(2)** : 561-569
8. Burk RF. In vivo ⁷⁵Se binding to human plasma proteins after administration of ⁷⁵SeO₃. *Biochimica et Biophysica Acta* 1974 ; **372** : 255-265.
9. Chappuis P. Les oligo-éléments en médecine et biologie. Editions médicales internationales ; Lavoisier tec & doc .1991 : 450-451.
10. Demuth K, Myara I, Moatti N. Biologie de la cellule endothéliale et athérogenèse. *Annales de biologie clinique* ; 1995,**53** :171-189
11. Diaz M, Frei B, Vita J, Keaney J. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *The New England Journal of Medicine* 1997 ; **337** ; **6** ; 408-416.
12. Ducros V, Laporte F, Belin N, David A, Favier A. Selenium determination in human plasma lipoprotein fraction by mass spectrometry analysis. *Journal of inorganic biochemistry*, En cours de publication
13. Ducros V, Richard M J, Favier A. The distribution of selenium in human plasma proteins for 24 hours after ingestion of ⁷⁴Se (in sodium selenite form). *Journal of inorganic biochemistry*, 1994 ; **55** :157-163
14. Ducros V, Favier A. *Journal of chromatography*, 1992; **583**: 35-44

15. El Marzouki A . Propriété physicochimiques de complexes du cuivre, modèles synthétiques de la superoxyde dismutase. Thèse de chimie 1993 université Joseph Fourier Grenoble 1.
16. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free radical in biology & medicine* ;1992, **13** :341-390
17. Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, Roheneder M. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radical Research Communication* 1989 ;**6** : 67-75.
18. Favier A. Le stress oxydant: intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. *Annales de biologie clinique* 1997; **55 (1)**:9-16.
19. Ferguson E, Jit Singh R, Hogg N, Kalyanaraman B. The mechanism of apolipoprotein B-100 thiol depletion during oxidative modification of low-density lipoprotein. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1997 ; **341,2** : 287-294
20. Ferrieres J, Douste Blazy Ph, Bernadet P, Douste Blazy L. Lipoprotéines oxydées et athérogénèse. *Cahier de nutrition diététique* ;1992, **XXVII** :13
21. Giebauf A, Steiner E, Esterbauer H. Early destruction of tryptophan residues of apolipoproteine B is a vitamin E-independent process during copper-mediated oxidation of LDL. *Biochimica et Biophysica Acta* 1995 ; **1256** : 221-232.
22. Graham A. Cellular thiol production and oxidation of low-density lipoprotein. *Free Rad Res* 1998 ; **28** : 611-621.
23. Gunzler WA, Kremers H, FloheL. An improved coupled test for glutathion peroxidase in blood. *Z. Klin Chem Klin Biochem* 1974 ; **12** : 444-448.
24. Harrison I, Littlejohn D, Fell G. Distribution of selenium in human blood plasma and serum. *Analyst* 1996 ; **121**: 189-194
25. Heinecke J. Mechanisms of oxidative damage of low density lipoprotein in human atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology* 1997 ; **8** : 268-274.
26. Hennekens CH, Buring JE, Manson JE et al. Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *The new England journal of médecine.* 1996 ;**334** : 1145-9
27. Holben D, Smith A. The diverse role of selenium within selenoproteins : A review. *Journal of the American dietetic association,* 1999, **99** ; **7** :836-843
28. Holvoet P, Collen D. Oxidised lipoproteins in atherosclerosis and thrombosis. *FASEB J* ;1994,**8**:1279-1284

29. Iwatsuki M, Niki E, Stone D, Darley-usmar V. α -Tocopherol mediated peroxidation in the copper and met myoglobin induced oxidation of human low density lipoprotein: The influence of lipid hydroperoxides. *FEBS* 1995; **360**: 271-276.
30. Kok F et al. Decreased sélénium levels in acute myocardial infarction. *JAMA*, 1989, **261** :1161-1164
31. Kromhout D. Fatty acids, antioxidants, and coronary heart disease from an epidemiological perspective. *Lipids* 1999; **34 Sup** : S27-S31
32. Kuzuya M, Yamada K, Hayashi, Funaki C, Naito M, Asai K, Kuzuya F. Role of lipoprotein-copper complex in copper catalysed-peroxidation of low-density lipoprotein. *Biochimica et Biophysica Acta* 1992 ; **1123** : 334-341.
33. Lass A, Witting P, Stocker R, Esterbauer H. Inhibition of copper and peroxy radical-induced LDL lipid oxidation by Ebselen : antioxidant action in addition to hydroperoxide reducing activity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1996 ;**1303** : 111-118.
34. Leist M, Maurer S, Schultz M, Elsner A, Gawlik D, Brigelius-Flohe R. Cytoprotection against lipid hydroperoxide correlates with increased glutathione peroxidase activities, But not selenium uptake from different selenocompounds. *Biological trace element research*, 1999 ; **68** :159-174
35. Lim Y, Cha M, Kim H, Uhm T, Park J, Kim K, Kim I. Removals of hydrogen peroxide and hydroxyl radical by thiol-specific antioxidant protein as a possible role in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1993 ;**192,1** : 273-280.
36. Lodge J, Traber M, Packer L. Thiol chelation of Cu^{2+} By dihydrolipoic acid prevents human low density lipoprotein peroxydation. *Free Radical Biology and Medicine* 1998 ;**25,3** :287-297.
37. Low S, Berry M. Knowing when not to stop : selenocysteine incorporation in eukaryotes. *TIBS*, 1996 ; **21** :203-208
38. Lynch S, Frei B. Physiological thiol compounds exert pro- and anti-oxidant effects, respectively, on iron- and copper-dependent oxidation of human low density lipoprotein. *Biochimica et Biophysica Acta* 1997 ;**1345** :215-221.
39. Lynch S, Frei B. Reduction of copper, but not iron, by human low density lipoprotein. *The Journal of Biological Chemistry* 1995 ; **270, 10** : 5158-5163.
40. Lynne A. Daniels. Selenium Metabolism and bioavailability. *Biological Trace Element Research* 1996 ; **54** :185-199.
41. Miller N, Rice-evans C, Gopinathan V, Davies MJ, Milner A. A new automated method for estimating plasma antioxydant activity and its application to the investigation of antioxidant status in premature neonates. *Free radicals and antioxydants in nutrition* 1993 richelieu press : 153-168.

42. Morse SG, Ralston HR, Olcott HS. Selenium determination in human serum lipoprotein fractions by neutron activation analysis. *Analytical biochemistry*, 1972 ; **49** : 598-601
43. Motoyama T, Miki M, Mino M, Takahashi M, Niki E. Synergistic inhibition of oxidation in dispersed phosphatidylcholine liposomes by a combination of vitamin E and Cysteine. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1989 ;**270,2** : 655-661.
44. Mustacich D, Powis G. Thioredoxine reductase. *Biochemical journal* 2000; **346**: 1-8.
45. Niki E. Free radical initiators as source of water or lipid soluble peroxy radicals. *Methods in Enzymology* 1990 ; **186** : 100-108.
46. Noguchi N, Naohiro G, Niki E. Effects of Ebselen and probucol on oxidative modifications of lipid and protein of low density lipoprotein induced by free radicals. *Biochimica et Biophysica Acta* 1994 ; **1213** : 176-182.
47. Noguchi N, Yoshida Y, Kaneda H, Yamamoto Y, Niki E. Action of Ebselen as an antioxidant against lipid peroxidation. *Biochemical Pharmacology* 1992 ; **44** , 1 : 39-44.
48. Parthasarathy S, Santanam N, Ramachandran S, Meilhac O. Oxidants and antioxidants in atherogenesis: an appraisal. *Journal of lipid research* 1999; **40**: 2143-2157.
49. Patterson B H, Zech L A, Swanson C A, Levander O A. Kinetic modeling of sélénium in humans using stable isotope tracers. *Journal trace element electrolytes health disease*, 1993 ; **7** : 117-120
50. Patterson R, Leake D. Human serum, cysteine and histidine inhibit the oxidation of low density lipoprotein less at acidic pH. *FEBS Letters* 1998 ; **434** : 317-321.
51. Pietinen P, Vartiainen E, Seppanen R, Aro A, Puska P. Changes in diet in Finland from 1972 to 1992: impact on coronary heart disease risk. *Prev Med* 1996; **25(3)**: 243-250.
52. Reaven PD, Khouw A, Beltz WF, Parthasarathy S, Witztum JL. Effect of dietary antioxidant combinations in humans; protection of LDL by vitamine E but not beta-carotene. *Artherosclerosis and trombosis* 1993;**13**: 590-600
53. Retsky K, Chen K, Zeind J, Frei B. Inhibition of copper-induced oxidation by vitamine C is associated with decreased copper binding to LDL and 2-oxohistidine formation. *Free radical biology and medicine*, 1999 ; **26(1/2)** : 90-98
54. Rice Evans C, Leake D, Bruckdorfer R, Diplock A. Practical approaches to low density lipoprotein oxidation: why, wherefore and pitfalls. *Free radical research*;1996, **25,4** :285-311
55. Rotilio G, Calabrese L. EPR study of Cu(II) complexes of tridentate amino acids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1971 ; **143** : 218-225.
56. Salonen JT, Salonen R, Seppanen K, Kantola M, Suntioinen S, Korpela H. Interaction of copper, selenium, and low density lipoprotein cholesterol in atherogenesis. *British Medical Journal* 1991 ; **302** : 756-760.

57. Santanam N, Parthasarathy S. cellular cysteine generation does not contribute to the initiation of LDL oxidation. *Journal of Lipid Research* 1995 ; **36** : 2203-2211.
58. Siest H, Sharov V, Klotz L, Briviba K. Glutathion peroxydase protects against peroxy-nitrite mediated oxidations. *The journal of biological chemistry*. 1997 ; **44** : 27812-27817
59. Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge heart antioxidant study (CHAOS). *Lancet* 1996; **347**: 781-786
60. The alpha tocopherol, beta carotene cancer prevention study group. The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *The new england journal of medicine*. 1994 ; **330** : 1029-35
61. Thomas J, Geiger P, Girotti A. Lethal damage to endothelial cells by oxidized low density lipoprotein : role of selenoperoxidases in cytoprotection against lipid hydroperoxide and iron mediated reactions. *Journal of lipid research*, 1993 ; **34** : 479-490
62. Ursini F, Bindoli A. The role of selenium peroxydases in the protection against oxidative damage of membranes. *Chemistry and Physics of Lipids* 1987 ; **44** : 255-276.
63. Viegas-crespo AM et al. Selenium status and cardiovascular risk factors in populations from different portuguese regions. *Natural antioxidants and food quality in atherosclerosis and cancer prevention..* Edited by Kumpulainen J, Salonen J : 188-194
64. Vinson J A, Stella J M, Flanagan T J. Selenium yeast is an effective in vitro and in vivo antioxidant and hypolipemic agent in normal hamsters. *Nutrition Research* 1998 ; **18** , **4** : 735-742.
65. Virtamo J, Valkeila E, Alfthan G, Punsar S, Huttunen J, Karvonen M. Serum sélénium and the risk of coronary heart disease and stroke. *American journal of epidemiology*, 1985 ; **122** ; **2** : 276-282
66. Wagner P, Heinecke J. Copper ions promote peroxydation of low density lipoprotein lipid by binding to histidine residues of apolipoprotein B100, but they are reduced at other sites on LDL. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 1997 ; **17** ; **11** : 3338-3346.
67. Witztun J. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *The Lancet* 1994 ; **344** : 793-795.

EFFETS DES DERIVES SELENIÉS ORGANIQUES SUR L'OXYDATION *IN VITRO* DES LDL.

L'athérosclérose est une maladie favorisée par le stress oxydant. L'oxydation va provoquer des altérations des différentes classes des lipoprotéines, notamment des LDL, qui vont acquérir de nouvelles propriétés biologiques proathérogènes. Le sélénium est un oligo-élément qui intervient dans le métabolisme développé par les organismes pour lutter contre le stress oxydant. Une fraction du sélénium plasmatique est en outre présente dans les LDL. Le but de notre travail était de préciser si le sélénium, présent au niveau des LDL, pouvait protéger celles-ci du stress oxydant et participer, de la sorte, à la lutte contre l'athérosclérose.

Pour cela nous avons réalisé l'oxydation *in vitro* des LDL par le cuivre et par l'AAPH en présence de dérivés sélénés organiques : sélénométhionine, sélénocystine et Ebselen afin d'évaluer l'activité antioxydante de ces molécules. Dans un deuxième temps nous avons voulu révéler les différents mécanismes antioxydants mis en jeu par ces molécules.

Nos résultats montrent que les acides aminés sélénés présentent un effet protecteur vis-à-vis de l'oxydation *in vitro* des LDL par le cuivre mais pas vis-à-vis de l'AAPH. L'Ebselen, par contre, montre un effet antioxydant lors de l'oxydation des LDL par le cuivre et par l'AAPH. L'effet antioxydant des acides aminés semble lié à leur capacité à former des complexes avec le cuivre, alors que pour l'Ebselen l'effet antioxydant semble reposer sur une activité glutathion peroxydase et une éventuelle interaction avec la vitamine E.

Il est difficile de prédire l'effet des acides aminés sélénés sur l'oxydation *in vivo* des LDL, de nombreux points restent inconnus en ce qui concerne la nature et le mode de fixation du sélénium dans les LDL. Par contre, les propriétés montrées par l'Ebselen ; affinité pour les LDL et effet antioxydant du composé ; laissent espérer que ce composé, développé par l'industrie pharmaceutique pour devenir un médicament anti-inflammatoire, pourrait présenter un rôle bénéfique dans la protection contre l'athérosclérose.

MOTS CLEFS : Athérosclérose, LDL, Oxydation, sélénium, sélénométhionine, sélénocystine, Ebselen, complexes.

JURY

Président : Madame le Professeur **A.M ROUSSEL**

Membres : Monsieur le Professeur **X. LEVERVE**

Madame le Docteur **V. DUCROS**

Monsieur le Docteur **F. LAPORTE**

Date de la soutenance : 30 juin 2000