

UN MÉCANISME PHYSIOPATHOLOGIQUE CENTRAL À L'ORIGINE DES COMPLICATIONS DU DIABÈTE ?

J.O. DEFRAIGNE (1)

RÉSUMÉ : Le diabète est associé au développement de lésions macrovasculaires et microvasculaires responsables d'infarctus du myocarde, de néphropathie, de rétinopathie et de polyneuropathie. Quatre mécanismes pathogéniques principaux ont été proposés, tous associés à l'hyperglycémie : 1) une augmentation du flux dans la voie des polyols; 2) une augmentation du flux dans la voie des hexosamines; 3) une activation de la voie de la protéine kinase C; et 4) une formation accrue de produits terminaux de la glycation. Il semble qu'un phénomène central joue un rôle dans le déclenchement de ces différentes voies. En effet, une production accrue de radicaux libres par la mitochondrie suite à l'hyperglycémie pourrait être à l'origine des différents troubles métaboliques observés. Cet article fait le point sur cette théorie et sur ses implications thérapeutiques.

MOTS-CLÉS : Complications diabétiques - Hyperglycémie - Stress oxydatif - Mitochondrie

1) INTRODUCTION

Les complications principales du diabète résultent d'atteintes microvasculaires (responsables de rétinopathie, de glomérulosclérose, et de neuropathie) et macrovasculaires (athérosclérose responsable de coronaropathie, d'atteintes cérébro-vasculaires et d'artériopathie périphérique). Le développement de ces lésions est incontestablement lié au degré d'hyperglycémie et à l'insulino-résistance. Rapidement, dans le décours de l'affection, une dysfonction endothélieale s'installe et le flux sanguin microvasculaire est perturbé avec, notamment, une diminution de la libération de monoxyde d'azote (NO), vasodilatateur, et un accroissement de la production d'agents vasoconstricteurs (angiotensine II, endothéline-1) (1). Parallèlement, la perméabilité microvasculaire se modifie de façon irréversible et s'accroît consécutivement aux altérations qualitatives et quantitatives de la matrice extracellulaire. D'autres anomalies sont également observées, comme une production accrue de facteur de croissance vasculaire endothélien (VEGF) et d'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1). Cette expression accrue de PAI-1 semble dépendre d'une voie de transmission et de transduction du signal qui fait intervenir des kinases impliquées dans la transcription et la prolifération cellulaires en réponse à des signaux extracellulaires («Mitogen Activated Protein» kinases = MAP kinases).

A CENTRAL PATHOLOGICAL MECHANISM EXPLAINING DIABETIC COMPLICATIONS ?

SUMMARY : Diabetes mellitus is associated to micro- and macro-vascular lesions responsible for myocardial infarction, nephropathy, retinopathy and polyneuropathy. Four main pathogenic mechanisms have been proposed, all associated with hyperglycaemia : 1) increased flux in the polyol pathway; 2) increased flux in the hexosamine pathway; 3) protein kinase C activation; and 4) increased formation of advanced glycation endproducts. A common mechanism seems to play a central role in the activation of these various pathways. Indeed, an increased production of free radicals by mitochondria induced by hyperglycaemia may be responsible for the observed metabolic disturbances. The present article describes that theory and presents its possible therapeutic implications.

KEYWORDS : Diabetic complications - Hyperglycaemia - Oxidative stress - Mitochondria

2) PROCESSUS MÉTABOLIQUES ACTIVÉS AU COURS DES COMPLICATIONS DIABÉTIQUES

La relation entre l'hyperglycémie et le déclenchement des complications diabétiques est généralement expliquée par 4 hypothèses : 1) un accroissement du flux dans la voie des polyols; 2) une production accrue des produits terminaux de la glycation (AGEs = «advanced glycation end-products»); 3) une transduction du signal par activation de la protéine kinase C (PKC); et 4) une production accrue d'hexosamines (Figure 1).

Nous présenterons chacun de ces processus pour expliquer, ensuite, le mécanisme qui les relie.

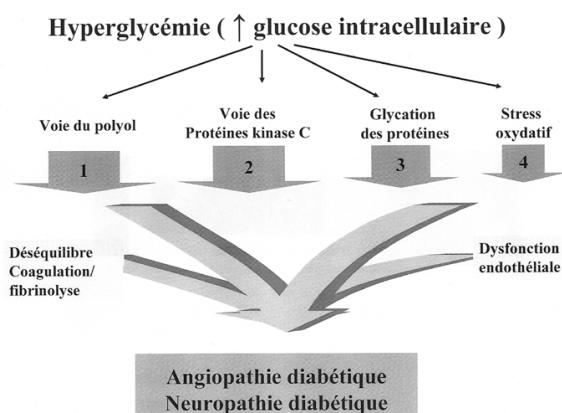


Figure 1 : Mécanismes biochimiques susceptibles d'expliquer la relation entre l'hyperglycémie (et l'augmentation de concentration intracellulaire de glucose) et les complications diabétiques (angiopathie et neuropathie). La production de radicaux libres semble jouer un rôle central dans cette relation (voir figure 2).

(1) Chargé de Cours, Services de Chirurgie Cardio-vasculaire (Prof R Limet) et de Biochimie et Physiologie Générales et Humaines, CHU Sart Tilman

A) ACCROISSEMENT DU FLUX DANS LA VOIE DES POLYOLS

En raison d'une affinité faible pour le glucose de la première enzyme de la voie des polyols (aldose réductase), cette voie est peu active chez le sujet euglycémique. Par contre, au cours de l'hyperglycémie, un pourcentage significatif du glucose est transformé en sorbitol sous l'action de l'aldose réductase cytosolique dont le coenzyme est le NADPH (Nicotinamide Dinucléotide Phosphate). Par la suite, le sorbitol est oxydé en fructose par la sorbitol déshydrogénase avec réduction du NAD⁺ en NADH (1).

L'activation de cette voie a deux conséquences. Premièrement, le rapport cytosolique NADH/NAD⁺ augmente. Ceci inhibe l'activité de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) qui, dans la glycolyse, transforme le glyceraldéhyde-3-phosphate (G-3-P) en 1,3-bisphosphoglycérate, en utilisant la forme oxydée du coenzyme (NAD⁺) (Figure 2). La concentration en trioses phosphate (DiHydroxy-Acétone Phosphate ou DHAP et G-3-P) augmente, ce qui finalement accentue la formation de produits terminaux de la glycation (cf infra). Deuxièmement, les taux cellulaires de NADPH diminuent. Comme ce dernier est nécessaire à la régénération du glutathion oxydé (GSSG) en glutathion réduit (GSH) par la glutathion réductase, un stress oxydant cellulaire en résulte (1, 2).

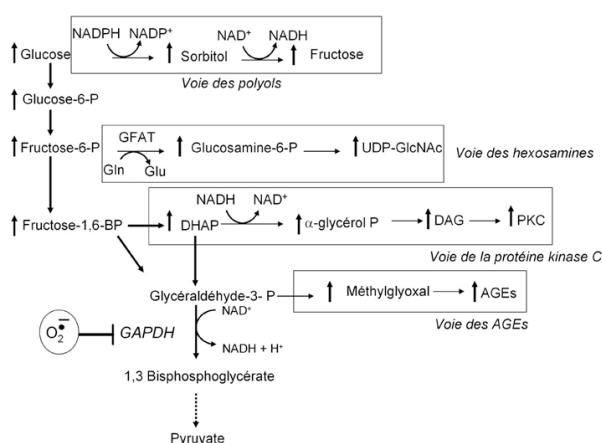


Figure 2 : Relation entre la production de radicaux libres par la mitochondrie et l'activation de différentes voies au cours de l'hyperglycémie. La GAPDH (glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) est partiellement inhibée par l'anion superoxyde. De la sorte, les métabolites de la glycolyse s'accumulent et sont utilisés dans d'autres voies métaboliques. Ceci provoque une augmentation de flux dans la voie des hexosamines, et dans celle des polyols ainsi qu'une production accrue de produits terminaux de la glycation. La transduction du signal via la PKC (protéine kinase C) est enclenchée sous l'effet de l'augmentation de la concentration de DAG (Diacylglycérol). Explications complémentaires dans le texte. Gln = Glutamine; Glu = Glutamate; UDP-GlcNAc = Uridine diphosphate N-acetylglucosamine.

Le pourcentage de glucose introduit dans cette voie varie selon les tissus (33% dans le cristallin de lapin et 11% dans les globules rouges humains). Par conséquent, la contribution de la voie des polyols aux complications diabétiques varie selon les sites et les tissus. Ceci explique, sans doute, les résultats inconstants des études cliniques où l'aldose réductase était inhibée, ce qui a fait douter de la part réelle de la voie des polyols dans les complications diabétiques chez l'homme.

B) PRODUCTION ACCRUE DE PRODUITS TERMINAUX DE LA GLYCATION (AGEs)

Les AGEs se retrouvent en concentrations élevées dans les vaisseaux rétiniens et dans les glomérules rénaux de sujets diabétiques. Leur site de formation est à la fois intracellulaire et extracellulaire (3,4).

Plusieurs mécanismes déclenchés par l'hyperglycémie contribuent à l'apparition d'AGEs : auto-oxydation intracellulaire du glucose en glyoxal, décomposition des produits Amadori (adduits de lysine et de 1-amino-1-déoxyfructose dérivé du glucose) en 3-déoxyglucosone, et fragmentation du G-3-P et du DHAP en méthylglyoxal. Ces dicarbonyls intracellulaires (glyoxal, méthylglyoxal, et 3-déoxyglucosone) réagissent avec les groupes amine des protéines intracellulaire et extracellulaires pour former des AGEs (Figure 2).

Les lésions cellulaires observées sont explicables par les modifications structurelles et fonctionnelles de biomolécules importantes. D'une part, la fonction des protéines intracellulaire est altérée. D'autre part, la modification des protéines de la matrice extracellulaire (laminine, collagène, fibronectine) perturbe non seulement les interactions entre les composants de la matrice, mais aussi celles entre ces composants et les récepteurs cellulaires pour les constituants matriciels (intégrines) (3,4). Dans le collagène de type I, les ponts intermoléculaires («crosslinking») formés par les AGEs augmentent le compactage moléculaire; ceci modifie la fonction vasculaire en provoquant, par exemple, une diminution d'élasticité vasculaire ou une augmentation de la filtration liquidienne au travers des vaisseaux comme cela a été montré au niveau de la carotide chez le rat rendu diabétique. La formation d'AGE au niveau du collagène de type IV, constituant de la membrane basale, perturbe l'association latérale de ces molécules en une structure normale de type réseau. Parallèlement, l'auto-assemblage de la laminine est désorganisé, de même que son association au collagène de type IV et aux protéoglycans (5). La modification du domaine de

liaison cellulaire du collagène réduit l'adhésion des cellules endothéliales et la modification de la séquence promotrice de la croissance de la chaîne A de la laminine réduit significativement la croissance axonale.

Enfin, les protéines plasmatiques modifiées se lient à des récepteurs pour les AGEs présents sur les cellules endothéliales, mésangiales et les macrophages. Au niveau cellulaire, plusieurs protéines capables de lier les AGEs ont, en effet, été identifiées (OST-48, 80 K-H, galectin-3, RAGE...). Parmi celles-ci, certaines contribuent probablement à la clairance et à l'élimination des AGEs. D'autres expliquent les perturbations observables en cultures cellulaires, car certains récepteurs AGEs identifiés contrôlent les effets à long terme des AGEs sur les cibles cellulaires-clés concernées par les complications diabétiques (macrophages, cellules glomérulaires mésangiales et cellules endothéliales). L'activation de ces récepteurs déclenche une production d'espèces oxygénées réactives et active le facteur de transcription pléiotropique NF- κ B («Nuclear Factor κ -B»), ce qui modifie de façon pathologique la transcription génique (6). Parmi les autres conséquences de l'activation de ces récepteurs, on note également l'expression de cytokines et de facteurs de croissance par les macrophages et les cellules mésangiales (interleukine-1, insulin-like growth factor-1 (IGF-1), tumour necrosis factor- α (TNF- α), Transforming Growth Factor (TGF- β), macrophage colony stimulating factor,) (7), ainsi que l'expression de molécules pro-coagulantes et pro-inflammatoires par les cellules endothéliales (thrombomoduline, facteur tissulaire et molécule d'adhésion cellulaire VCAM-1).

En outre, l'activation des récepteurs des AGE endothéliaux semble en partie responsable de l'hyperperméabilité de la paroi capillaire observée au cours du diabète, probablement via l'induction de VEGF («Vascular Endothelial Growth Factor»).

Parmi les différents récepteurs, RAGE est bien caractérisé. Il s'agit d'un membre de la superfamille des immunoglobulines dont le blocage prévient le développement de lésions macrovasculaires chez des souris rendues diabétiques de type 1 et sujettes à l'athérosclérose. Dans divers modèles murins, le blocage de RAGE prévient également le développement de la néphropathie diabétique et améliore la cicatrisation des plaies.

c) ACTIVATION DE LA PROTÉINE KINASE C

La famille des protéines kinases C (PKC) comprend plusieurs isoformes intracellulaires

capables de phosphoryler différentes cibles cellulaires. Certaines sont activées par un messager secondaire dérivé des phospholipides membranaires, le DAG (diacylglycérol). Comme observé dans la rétine et les glomérules rénaux d'animaux diabétiques, l'hyperglycémie intracellulaire augmente la concentration de DAG. Cette augmentation provient d'une synthèse de novo à partir du DHAP (DihydroxyAcétone Phosphate, intermédiaire de la glycolyse) qui est réduit en glycérol-3-phosphate, ce dernier subissant une acylation ultérieure (1,2) (Figure 2).

Dans le diabète expérimental, l'activation des isoformes de PKC contribue aux anomalies des flux sanguins locaux consécutives à la réduction de la production de NO et/ou à l'augmentation de la libération d'endothéline-1. Dans les cellules endothéliales, en effet, la PKC diminue l'expression du mRNA pour la NO synthase normalement induite par l'insuline. Dans les cellules mésangiales glomérulaires, l'activation des isoformes de PKC par l'hyperglycémie augmente l'activité des MAP kinases stimulées par l'endothéline-1. L'activation des PKC augmente également la perméabilité des cellules endothéliales et l'accumulation de protéines matricielles (fibronectine, collagène de type IV) ainsi que l'expression de TGF- β au sein de cultures de glomérules de rats diabétiques. Chez les animaux diabétiques, le traitement par un inhibiteur spécifique de la PKC dans la rétine et dans le glomérule rénal corrige le temps de circulation moyen rétinien et le taux de filtration glomérulaire perturbés par le diabète.

D'autres éléments doivent sans doute intervenir car l'expression accrue de la laminine dans les cultures de cellules mésangiales soumises à une hyperglycémie est indépendante de l'activation de la PKC.

d) L'AUGMENTATION DE FLUX DANS LA VOIE DES HEXOSAMINES

Dans la voie des hexosamines, le fructose-6-phosphate produit à partir du glucose-6-phosphate est dérivé de la glycolyse pour servir de substrat dans des réactions qui aboutissent à la production de UDP-N-acétylglucosamine (Figure 2). Cette dernière est nécessaire pour la synthèse de protéoglycanes ou la formation de protéines O-glycosylées (10,11).

Un flux accru dans la voie des hexosamines modifie la transcription génique, mais les mécanismes responsables restent incertains. On sait que l'hyperglycémie active le promoteur du gène de PAI-1 et que cet effet est normalement régulé par le facteur de transcription Sp1 (1). La mise en évidence de modifications covalentes de Sp1 par la N-acétylglucosamine (GlcNac) (processus

d'acétylglucaminylation) clarifie le lien entre l'activation de la voie des hexosamines et celle de la transcription du gène de PAI-1 induite par l'hyperglycémie. Comme l'ont montré des études effectuées à l'aide d'inhibiteurs enzymatiques, la O-acétylglucaminylation entre en compétition avec la phosphorylation pour les mêmes sites protéiques au niveau de Sp1 (groupes OH de la chaîne latérale de sérine ou de thréonine). Au sein de cellules endothéliales aortiques en culture, l'hyperglycémie multiplie par 2,4 l'activité de la voie des hexosamines avec, pour conséquence, une augmentation de 1,7 fois de la GlcNac liée à Sp1 et une diminution de 70-80 % de la phosphothréonine et de la phosphosérine contenues dans Sp1. Par ailleurs, il est vraisemblable que les variations réciproques de la O-acétylglucaminylation et de la phosphorylation touchent d'autres facteurs de transcription et constituent un mécanisme plus général de régulation de l'expression génique (de gènes autres que ceux de PAI-1) en fonction de la concentration en glucose.

Outre les facteurs de transcription, le processus d'acétylglucaminylation (toujours avec variation réciproque du degré de phosphorylation) concerne de nombreuses protéines nucléaires et cytoplasmiques dont l'activité est modifiée de façon dynamique. Par exemple, le processus d'acétylglucaminylation qui contribue à l'inhibition de la NO synthase endothéliale (au niveau du site Akt de la protéine) et l'activation des différentes isoformes de PKC par la glu-

samine sont régulièrement observés chez les sujets diabétiques.

Cette activation de la voie des hexosamines provoque ainsi de multiples changements dans l'expression génique et dans la fonction des protéines, qui, ensemble, contribuent à la survenue des complications diabétiques.

3) LA MITOCHONDRIE : UN ÉLÉMENT CENTRAL DANS LA PATHOGÉNIE DES LÉSIONS INDUITES PAR L'HYPERGLYCEMIE

Par le passé, plusieurs études ont montré que le diabète et l'hyperglycémie entraînaient un stress oxydant, mais sans que l'origine en soit formellement précisée (12). Des données récentes suggèrent que ce stress oxydant trouve son origine au niveau mitochondrial.

A) LA CHAÎNE RESPIRATOIRE MITOCHONDRIALE

Pour comprendre le mécanisme et clarifier l'origine de ce stress oxydant, il faut se remémorer le sort du glucose au niveau intracellulaire. Au cours de la glycolyse, une molécule de glucose est oxydée en 2 molécules de pyruvate avec production de deux équivalents de réduction à partir du NAD⁺ (2 NADH + H⁺). En conditions anaérobies, le pyruvate est transformé en lactate par la lacticodehydrogénase, ce qui régénère le NAD⁺. En conditions aérobies, les 2 NADH provenant de la glycolyse sont acheminés dans la mitochondrie par la navette malate/aspartate.

Lorsque les signaux hormonaux sont adéquats, chacun des 2 pyruvates est acheminé dans

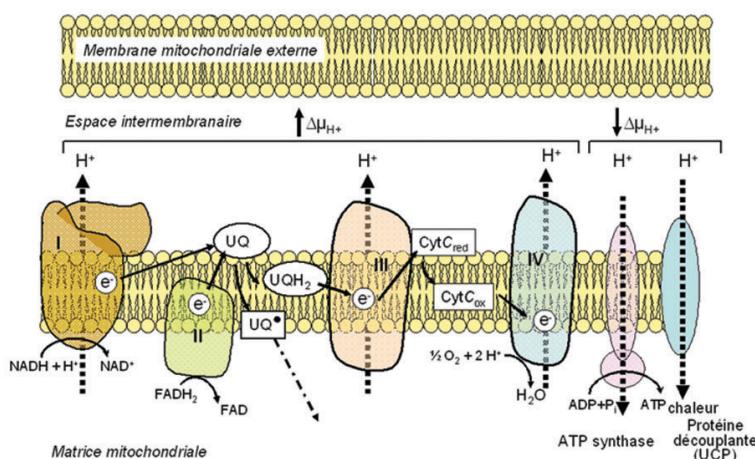


Figure 3 : Chaîne de transport d'électrons mitochondriale. Le transfert d'électrons au niveau des complexes I, III et IV s'accompagne d'un pompage de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire. Ceci crée une différence de potentiel électrochimique ($\Delta\mu_{H^+}$) au travers de la membrane mitochondriale interne. La dissipation de ce gradient libère de l'énergie libre. Lorsque ce gradient est dissipé à travers l'ATP synthase (ou complexe V), l'ATP est produit. Un dégagement de chaleur est observé lorsque ce gradient est dissipé via des protéines découpantes. En conditions normales, moins de 2% de l'oxygène sont transformés en anion superoxyde (O_2^-). Lorsque le gradient de protons est augmenté, le complexe III est inhibé, ce qui augmente la proportion d'ubiquinone (UQ) transformée en forme semiquinone (UQ_·). Cette forme radicalaire du coenzyme Q peut alors transférer ses électrons directement à l'oxygène moléculaire pour produire l'anion superoxyde. Explications complémentaires dans le texte. NADH (forme réduite du Nicotinamide Adénine Dinucléotide) ; NAD⁺ (forme oxydée du Nicotinamide Adénine Dinucléotide); FADH₂ (forme réduite du Flavine Adénine Dinucléotide) ; FAD (forme oxydée du Flavine Adénine Dinucléotide); UQH₂ (ubiquinol = forme réduite du coenzyme Q); Cyt Cox (cytochrome C oxydé); Cyt Créd (forme réduite du cytochrome C)

la matrice mitochondriale par un antiport (pyruvate/OH⁻) pour être transformé en acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase avec production de NADH + H⁺. Par acétyl-CoA oxydé dans le cycle de Krebs localisé dans la matrice mitochondriale (cycle des acides tricarboxyliques), 3 NADH et 1 FADH₂ sont produits. Les équivalents de réduction produits lors des différentes étapes d'oxydation sont réoxydés lorsqu'ils transfèrent leurs électrons à la chaîne respiratoire mitochondriale localisée sur la membrane mitochondriale interne (Figure 3).

Dans la chaîne respiratoire, le flux d'électron est assuré par 4 complexes enzymatiques dont le potentiel de réduction est croissant. Le cytochrome C et le coenzyme Q (ubiquinone), transporteur mobile dans le plan de la membrane, assurent un relais entre ces complexes. Le NADH produit par différentes sources cellulaires (glycolyse en conditions aérobie, bêta-oxydation, cycle de Krebs, ...) cède ses électrons au complexe I (NADH : ubiquinone oxydo-réductase) qui les transfère au coenzyme Q (ubiquinone qui devient l'ubiquinol). Le coenzyme Q peut aussi être réduit par les électrons du FADH₂ qui sont introduits au niveau du complexe II (succinate : ubiquinone oxydo-reductase). Les électrons du coenzyme Q réduit sont alors transférés au complexe III. Puis, le transport d'électrons s'effectue ensuite via le cytochrome C, le complexe IV. L'oxygène moléculaire constitue l'accepteur final d'électrons.

Lors des transferts d'électrons au niveau des complexes I, III et IV, la quantité d'énergie libre libérée est déterminée par les différences de potentiels d'oxydo-réduction. En même temps que les électrons sont transférés, des protons (H⁺) sont pompés de la matrice mitochondriale et sont expulsés dans l'espace intermembranaire. Il en résulte un gradient électrochimique au travers de la membrane mitochondriale interne ($D\mu H^+$, différence de voltage et de pH). La plus grande partie de l'énergie contenue dans ce gradient électrochimique est utilisée pour produire de l'ATP. Sans entrer dans le détail du mécanisme complexe de fonctionnement de l'ATP synthase, le collapsus de ce gradient au travers de l'ATP synthase (complexe V) permet la production d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique. L'énergie libre emmagasinée dans le gradient peut aussi être dissipée, non pas au travers de l'ATP synthase, mais via différentes protéines découpantes (UCPs, «Uncoupling Proteins») qui créent des «pores» dans la membrane mitochondriale interne. La dissipation du gradient ne conduit pas à la production d'ATP, mais à un dégagement de chaleur.

La chaîne respiratoire a pour particularité de transformer un système qui accepte les électrons par paire (le NAD⁺ accepte deux électrons à la fois) en un système qui permet le transfert d'un électron à la fois. Sous sa forme oxydée, l'ubiquinone peut, en effet, accepter un électron pour devenir une forme semiquinone radicalaire, caractérisée par la présence d'un électron célibataire. L'acceptation d'un deuxième électron par la forme semiquinone aboutit à la formation d'ubiquinol, UDH₂, forme réduite du coenzyme Q. Les étapes inverses sont observées lorsque l'ubiquinol cède ses électrons. Ceci est impératif car l'oxygène moléculaire, accepteur final d'électrons au niveau du complexe IV, ne peut accepter qu'un seul électron à la fois; il subit une réduction complète tétravalente.

b) PRODUCTION D'ANION SUPEROOXYDE PAR LA MITOCHONDRIE

L'efficacité de la chaîne respiratoire et, en particulier, des mécanismes intervenant au niveau du complexe IV est telle que 98% de l'oxygène consommé au niveau de la mitochondrie sont transformés en eau. Des «fuites» dans le système entraînent néanmoins une faible production d'une espèce radicalaire, l'anion superoxyde (obtenu par réduction univaleure de l'oxygène). La mitochondrie dispose cependant de superoxyde dismutase (MnSOD, forme mitochondriale à manganèse) qui transforme l'anion superoxyde en oxygène et en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Ce peroxyde d'hydrogène est alors transformé en eau par la catalase également présente dans la mitochondrie.

Cependant, dans certaines circonstances (ischémie suivie de reperfusion, par exemple), la proportion de forme semiquinone contenue dans la mitochondrie augmente. Dans ce cas, la forme semiquinone transfère ses électrons directement à l'oxygène, ce qui conduit à une production accrue de radical libre superoxyde. De même, lorsque la différence de potentiel électrochimique à travers la membrane mitochondriale interne est élevée, le transport d'électrons dans le complexe III est partiellement inhibé; ceci augmente la proportion de forme semi-radicalaire de l'ubiquinone (ubisemiquinone). La prolongation de la durée de vie de l'ubisemiquinone conduit à un fort accroissement de la production d'anion superoxyde. Il semble exister une valeur seuil de potentiel au-delà de laquelle la production d'anion superoxyde est fortement accrue (1, 13, 14).

Différents arguments suggèrent que l'hyperglycémie est impliquée dans ce processus, en particulier parce que les mécanismes de régulation de la chaîne respiratoire sont perturbés. En effet,

suite à une production excessive d'équivalents de réduction (de donneurs d'électrons) par le cycle de Krebs, l'hyperglycémie augmente le gradient de protons au-delà de cette valeur-seuil, comme cela a été démontré dans des cellules endothéliales en culture. Néanmoins si, toujours en culture de cellules, on induit une surexpression de la MnSOD et de la protéine de découplage-1 (UCP-1) qui entraîne le collapsus du gradient électrochimique mitochondrial, le signal enclenché par l'hyperglycémie est aboli (1).

c) LIEN ENTRE LA PRODUCTION D'ANION SUPEROOXYDE ET LES COMPLICATIONS DU DIABÈTE

Le processus d'accroissement de la production d'anion superoxyde semble lié aux autres mécanismes, mentionnés plus haut, et qui sont impliqués dans l'apparition des complications diabétiques. En effet, la surproduction d'anion superoxyde provoque une diminution de 66% de l'activité de la GAPDH («Glycéraldéhyde Phosphate Déshydrogénase»), même si ce mécanisme n'est vraisemblablement pas le seul impliqué (la déplétion en NAD⁺ interviendrait également). Différentes données suggèrent que l'inhibition de la GAPDH joue un rôle-clé (1,15), car :

1) l'effet de l'hyperglycémie sur la voie des polyols peut provenir de l'accumulation de substrats de la glycolyse (y compris le glucose) consécutive à l'inhibition de la GADPH;

2) cette inhibition de la GAPDH est suivie d'une élévation des taux intracellulaires de trioses phosphates; la fragmentation des trioses produit du méthylglyoxal qui est à l'origine des AGEs intracellulaires;

3) l'élévation des taux de DHAP, consécutive à l'inhibition de la GAPDH, provoque une synthèse *de novo* de diacylglycérol (DAG); comme cela a été mentionné précédemment, celui-ci active la PKC, situation caractéristique au cours de l'hyperglycémie;

4) enfin, l'inhibition de la GAPDH accroît la vitesse du flux métabolique dans la voie des hexosamines; davantage de fructose-6-Phosphate est, en effet, disponible pour la GFAT («Glutamine : fructose-6-phosphate amidotransférase») qui catalyse l'étape limitante de la synthèse (transformation du fructose-6-phosphate en glucosamine-6-P);

5) en présence d'une glycémie normale, l'utilisation d'oligonucléotides antisens pour la GADPH provoque aussi des augmentations identiques de l'activité des PKC, du flux dans la voie des hexosamines, et des taux d'AGEs.

Des études visant à atténuer la production mitochondriale d'anion superoxyde ont fourni des arguments indirects. Dans les cellules endo-

théliales, l'inhibition par la MnSOD ou les protéines découpantes de la surproduction mitochondriale de superoxyde prévient les accroissements des flux dans les voies des polyols et des hexosamines, ainsi que la production intracellulaire accrue d'AGEs (1,16). Parallèlement, l'adhésion des monocytes, l'inhibition de la NO synthase et de la prostacycline synthase, et la stimulation de l'agrégation plaquettaire par l'hyperglycémie sont prévenues, ce qui constitue autant d'effets protecteurs contre l'athérosclérose.

Enfin, chez des souris transgéniques rendues diabétiques, une surexpression de l'UCP-1 ou de la MnSOD corrige un ensemble de phénotypes induits par l'hyperglycémie au sein de cellules qui sont autant de cibles pour le déclenchement des complications diabétiques. Par exemple, on observe une diminution de la synthèse de collagène par les cellules mésangiales glomérulaires mises en culture, et une réduction du taux d'apoptose des neurones ganglionnaires. Par rapport aux souris témoins, cette correction atténue l'albuminurie, et restaure un contenu glomérulaire normal en collagène de type IV. L'activation du facteur de transcription pléiotropique sensible à l'équilibre redox NF-κB est aussi prévenue par l'inhibition de la surproduction mitochondriale de superoxyde.

4) IMPLICATIONS FUTURES ET CONCLUSIONS

Ce processus central de déclenchement des 4 mécanismes principaux impliqués dans la pathogénèse des complications diabétiques permet d'entrevoir une base de recherches futures. Des essais cliniques à large échelle sont cependant nécessaires avant de transposer à l'homme ces notions obtenues en culture de cellules ou à partir de modèles animaux. Trois axes semblent se dégager.

Premièrement, ce mécanisme pourrait expliquer - tout au moins partiellement - le phénomène de «mémoire hyperglycémique» bien décrit chez l'animal et qui semble aussi exister chez l'homme (1). En effet, après une période d'hyperglycémie prolongée, on peut observer une progression de la rétinopathie et de la néphropathie diabétiques, même si la glycémie est maintenue normale de façon durable. Parallèlement aux augmentations de flux dans les voies des polyols et des hexosamines, de la formation d'AGEs, et de l'activité de la PKC, la production mitochondriale accrue d'anion superoxyde induite par l'hyperglycémie provoquerait des mutations dans le DNA mitochondrial. L'encodage par le DNA mitochondrial muté de transporteurs d'électrons défectueux conduirait à une production accrue d'anion superoxyde, même en cas de glycémie normale; ceci

perpétuerait l'activation continue des 4 voies décrites, en dépit de la correction de l'hyperglycémie.

Deuxièmement, on sait qu'il existe des prédispositions familiales aux complications microvasculaires et macrovasculaires du diabète (17, 18). Dans le futur, les gènes qui prédisposent à ces complications ainsi que leur implication dans les phénomènes métaboliques permettront de cibler les individus à risque.

Troisièmement, si interrompre la surproduction mitochondriale d'anion superoxyde permet réellement de contrôler les activations anormales des différentes voies métaboliques, il faut alors se pencher sur les possibilités offertes par les thérapeutiques antioxydantes. Bien que l'efficacité observée avec les traitements antioxydants chez l'animal ne soit pas toujours reproductible chez l'Homme, on sait, par exemple, que la vitamine C améliore la vasodilatation dépendante de l'endothélium chez le sujet diabétique (1). Le scepticisme vis-à-vis des traitements antioxydants est parfois lié à la publication des résultats d'études qui méritent une critique qui dépasse la simple prise de connaissance de chiffres. Ainsi, dans l'étude HOPE (19), en terme de modification du risque cardio-vasculaire chez le sujet diabétique, l'administration combinée d'un supplément de vitamine E et d'un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine n'apportait pas de bénéfice complémentaire par rapport au traitement par l'inhibiteur seul. Il a été majoritairement conclu que le stress oxydant ne devait pas jouer un rôle significatif. Néanmoins, l'inhibiteur possédait par lui-même une activité antioxydante et l'alpha-tocophérol avait été administré alors qu'en terme de propriétés antioxydantes, le gamma-tocophérol est plus efficace. Or une administration exogène d'alpha-tocophérol diminue les taux tissulaires de gamma-tocophérol.

Il est possible que des cocktails d'antioxydants recourant à des substances aux propriétés catalytiques proches de celles de la SOD ou de la catalase s'avéreront efficaces; seules des études prospectives randomisées portant sur un large échantillon de patients nous apporteront une réponse à cette question essentielle.

RÉFÉRENCES

- Brownlee M.— Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 2001, **414**, 813- 820.
- Lee AY, Chung SS.— Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J*, 1999, **13**, 23-30
- Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW.— Chemical modification of proteins by methylglyoxal ? *Cell Mol Biol*, 1998, **44**, 1139-1145.
- Tanaka S, Avigad G, Brodsky B, Eikenberry EF.— Glycation induces expansion of the molecular packing of collagen. *J Mol Biol*, 1988, **203**, 495-505.
- Federoff HJ, Lawrence D, Brownlee M.— Non enzymatic glycosylation of laminin and the laminin peptide CIK-VAVS inhibits neurite outgrowth. *Diabetes*, 1993, **42**, 509-513.
- Yerneni KK, Bai W, Khan BV, et al.— Hyperglycemia-induced activation of nuclear factor kappaB in vascular smooth muscle cells. *Diabetes*, 1999, **48**, 855-864.
- Kirstein M, Aston C, Hintz R, Vlassara H.— Receptor-specific induction of insulin-like growth factor I in human monocytes by advanced glycosylation end product-modified proteins. *J Clin Invest*, 1992, **90**, 439-446.
- Craven PA, Studer RK, DeRubertis FR.— Impaired nitric oxide-dependent cyclic guanosine monophosphate generation in glomeruli from diabetic rats. Evidence for protein kinase C-mediated. *J Clin Invest*, 1994, **93**, 311-320.
- Glogowski EA, Tsiani E, Zhou X, et al.— High glucose alters the response of mesangial cell protein kinase C isoforms to endothelin-1. *Kidney Int*, 1999, **55**, 486-499.
- Kolm-Litty V, Sauer U, Nerlich A, et al.— High-glucose induced transforming growth factor β 1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cell. *J Clin Invest*, 1998, **101**, 160-169.
- Marshall S, Bacote V, Traxinger RR.— Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. *J Biol Chem*, 1991, **266**, 4706-4712.
- Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G.— Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care*, 1996, **19**, 257-267.
- Brownlee M.— A radical explanation for glucose-induced β cell dysfunction. *J Clin Invest*, 2003, **112**, 1788-1790.
- Khorshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA.— High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive species in mitochondria. *FEBS Lett*, 1997, **416**, 15-18.
- Giardino I, Edelstein D, Brownlee M.— BCL-2 expression or antioxidants prevent hyperglycemia-induced formation of intracellular advanced glycation endproducts in bovine endothelial cells. *J Clin Invest*, 1996, **97**, 1422-1428.
- Craven PA, Melham MF, Philipp SL, De Rubertis FR.— Overexpression of Cu²⁺/Zn²⁺ superoxyde dismutase protects against early diabetic glomerular injury in transgenic mice. *Diabetes*, 2001, **50**, 2114-2125.
- Quinn M, Angelico MC, Warram JH, Krolewski AS.— Familial factors determine the development of diabetic nephropathy in patients with IDDM. *Diabetologia*, 1996, **39**, 940-945.
- The Diabetes Control and Complications Trial Research Group.— Clustering of long-term complications in families with diabetes in the diabetes control and complications trial. *Diabetes*, 1997, **46**, 1829-1839.
- Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators.— Effect of ramipril on cardiovascular and microvascular outcomes in people with diabetes mellitus : results of the HOPE study and MICROHOPE substudy. *Lancet*, 2000, **355**, 253-259.

Les demandes de tirés à part sont à adresser au
Pr. J-O Defraigne, Service de Chirurgie Cardiovasculaire, CHU Liège Sart-Tilman
E-mail: JO.Defraigne@ulg.ac.be