Journal de la Société de Biologie, 195 (4), 401-411 (2001)

De l'oxygène à l'anion superoxyde. Peut-on moduler la NADPH oxydase ?

par S. Delbosc[1], J. P. Cristol[1, 2], B. Descomps[1], J. Chénard[2], P. Sirois[2]

[1] *Laboratoire de Biochime, Laboratoire de Biochimie et Biologie des Lipides, Institut Universitaire de Recherche Clinique, Montpellier, France ;* [2] *Institut de Pharmacologie de Sherbrooke, Faculté de Médecine, Sherbrooke (Quebec) Canada*

Reçu le 13 juillet 2001

RÉSUMÉ

Le stress oxydant est le résultat d'un déséquilibre au sein d'un même organisme entre la production d'espèces réactives de l'oxygène et les mécanismes de défense. Ce déséquilibre, dont les multiples conséquences touchent aussi bien les acides nucléiques que les protéines ou les lipides, peut provenir soit d'une production exagérée de radicaux libres, soit d'une altération des mécanismes de défense. Évaluer le stress oxydant c'est donc estimer la production de radicaux libres, apprécier les mécanismes de défense et enfin quantifier les produits secondaires qui peuvent en résulter.

Dans un premier temps, nous ferons un bref rappel sur l'origine et la production des différents oxydants, avec une attention particulière à la NADPH oxydase. Cette enzyme et la production des Formes Réactives de l'Oxygène (FRO) consécutive à son activation semblent largement impliquées dans le développement de nombreuses pathologies ayant une composante inflammatoire ou des pathologies associées au viellissement. Par la suite, nous envisagerons comment la régulation de la NADPH oxydase pourrait donc être une cible thérapeutique privilégiée dans la prévention de ces maladies.

SUMMARY Generation of superoxide anion by NADPH: a key event in oxidative stress

Oxidative stress which results from an imbalance between oxidant production and antioxidant defense mechanisms can promote modifications of lipids, proteins and nucleic acids. This review focuses on the different pathways leading to Reactive Oxygen Species (ROS) production in particular on NADPH oxidase activation. This enzyme is localized in numerous cells including phagocytes and vascular cells and composed of membran and cytosolic sub-units. The activation of the NADPH oxidase is largely involved in inflammation associated diseases such as asthma, Systemic Inflammatory Response Syndrom and aging associated diseases such as atherosclerosis and neurodeneratives diseases. The modulation of NADPH oxidase could be a way to limit or prevent the developpment of these dieases.

ANION SUPEROXYDE ET FORMES RÉACTIVES DE L'OXYGÈNE

Le stress oxydant est le résultat d'un déséquilibre au sein d'un même organisme entre la production d'espèces réactives de l'oxygène et les mécanismes de défense [1].

Définition et production des formes oxydantes (Tableau I)

L'anion superoxyde est formé à partir de l'oxygène moléculaire O_2 principalement par 6 voies enzymatiques faisant intervenir le système xanthine oxydase [2], la chaîne mitochondriale [3] (production permanente en faible quantité), le cytochrome p450, la NADPH oxydase [4] (production massive et limitée dans le temps), les cyclo-oxygénase et lipoxygénase (Fig. 1).

Parmi ces voies de formation, la NADPH oxydase joue un rôle majeur. La NADPH oxydase est une enzyme présente dans les cellules ayant une origine embryonnaire mésodermique (leucocytes, cellules de la paroi vasculaire, chondrocytes, synoviocytes, podocytes, etc.). Cette enzyme, activée normalement par la phagocytose, peut être aussi stimulée par des agents pro-inflammatoires insolubles comme les anaphylatoxines, les fractions C3 et C5 du complément, les cytokines comme l'IL-1 et le TNF, des agents peptidiques comme la bradykinine, l'angiotensine II, ou des agents lipidiques comme les

TABLEAU I. – Les principales formes oxydantes.

Formes Réactives de l'Oxygène (FRO)	
Anion superoxyde	$O2^{\circ}$
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Radical hydroxyl	OH°
Oxygène singulet	$^1O_2$
Formes Réactives de l'Azote (FRN)	
Monoxyde d'azote	NO°
Peroxynitrite	$ONOO^-$
Nitrates	$NO3^-$
Nitrites	$NO2^-$
Oxydants Chlorés	
Acides hypochloreux	HOCl
Chloramines	R-NHCl

leucotriènes ou le PAF (Platelet Activating Factor). L'absence de cette enzyme dans les cellules phagocytaires est à l'origine de la granulomatose chronique, maladie caractérisée par des infections récurrentes [5-9].

L'anion superoxyde (O_2°) ainsi formé va subir de nouvelles transformations enzymatiques et/ou non enzymatiques aboutissant à la production des Formes Réactives de l'Oxygène (FRO) radicalaires (OH°) ou non radicalaires (H_2O_2) (Fig. 1).

En plus des FRO, l'anion superoxyde est aussi directement ou indirectement à l'origine des oxydants chlorés qui comprennent l'acide hypochloreux (HOCl) produit par la myéloperoxydase ainsi que les chloramines [10-12] et les Formes Réactives de l'Azote (FRN) notamment le péroxynitrite (ONOO-) formé à partir du monoxyde d'azote et de l'anion superoxyde [13, 14].

Conséquences fonctionnelles

CIBLES DES FRO ET MARQUEURS (Fig. 2)

Une production accrue de ces formes oxydantes aura des conséquences néfastes sur l'organisme. En effet, le stress oxydant peut conduire à des lésions tissulaires par modification de molécules telles que les protéines, les lipides, les glucides et même le matériel génétique. L'oxydation de ces molécules a de grandes conséquences fonctionnelles : modification des membranes liée à l'oxydation des lipides, perte d'activité enzymatique secondaire à l'oxydation des protéines. Ces modifications oxydatives atteignent aussi les composants intranucléaires : protéines, facteurs de transcription, acide désoxyribonucléique (ADN). Il est cependant bien admis que les lipides, et en particulier les acides gras polyinsaturés (AGPI), sont une cible privilégiée du stress oxydant. En effet, l'oxydation des AGPI, connue sous le terme de peroxydation lipidique, est caractérisée par une réaction

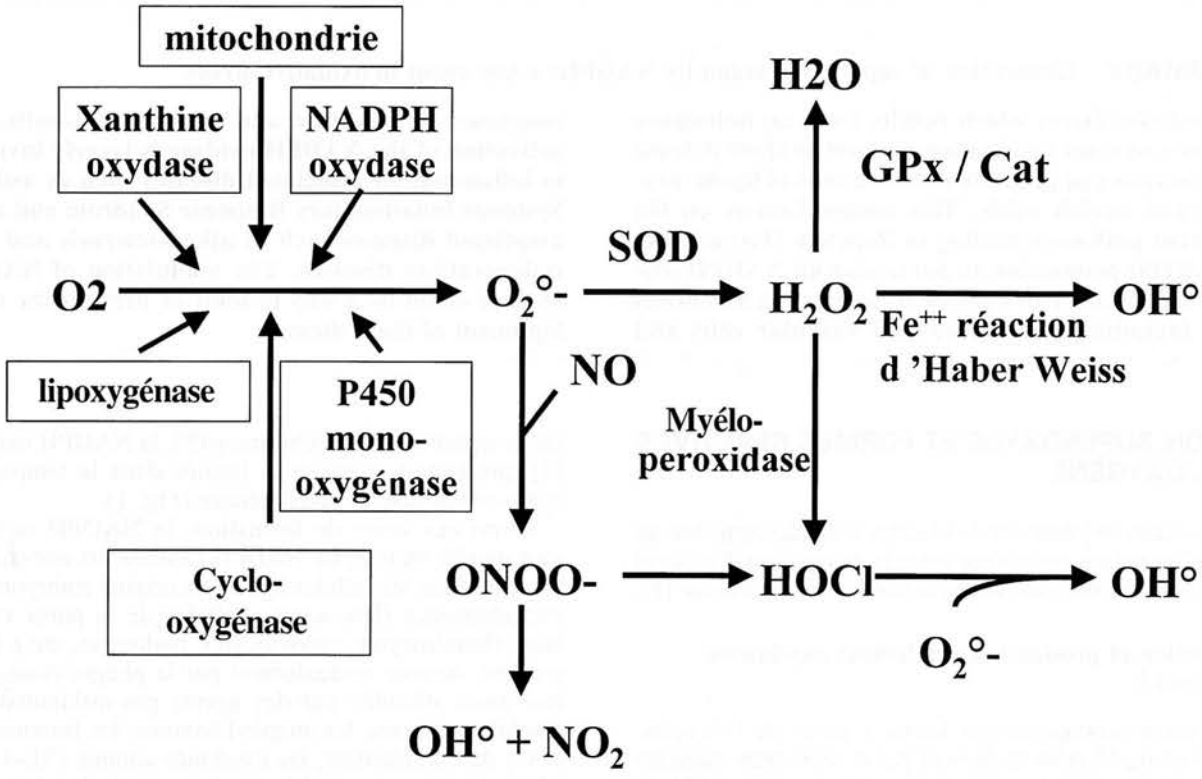

FIG. 1. – Métabolismes des FRO.

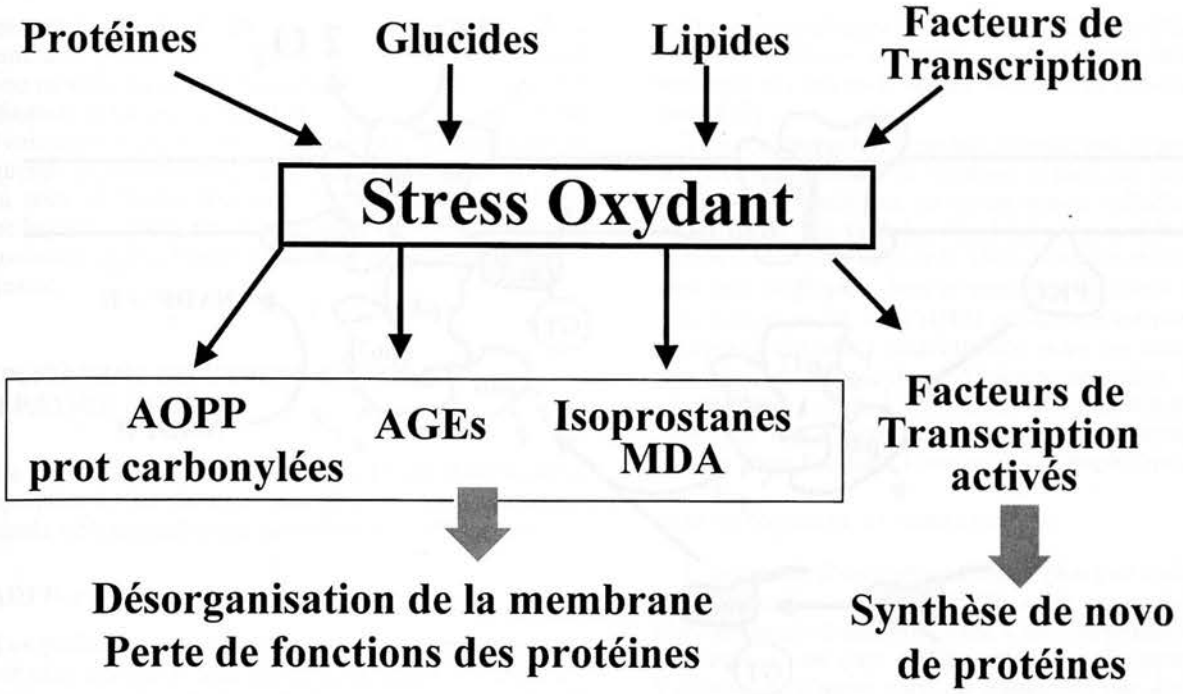

FIG. 2. – Cibles moléculaires du stress oxydant.

en chaîne dans laquelle chaque radical formé, après avoir profondément remanié une chaîne lipidique, s'attaque à la chaîne suivante sans rien perdre de son pouvoir destructeur. Ce processus d'auto-oxydation est une cascade de réactions radicalaires, ce qui explique l'amplification du phénomène [15]. L'oxydation des AGPI aura pour conséquence la formation d'hydroperoxyde d'AGPI espèces très instables difficilement dosables, et qui sont transformées rapidement en produits secondaires de la peroxydation lipidique. Ces produits sont principalement les diènes conjugués, dont l'apparition est due au réarrangement des doubles liaisons des AGPI après extraction d'un hydrogène malonique. Les principaux produits formés sont des aldéhydes [16] : le malonyl dialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonénal (A HNE). Ces deux composés sont largement utilisés comme marqueurs du stress oxydant à cause de leur stabilité dans le temps. Enfin les isoprostanes [17] formés à partir des prostaglandines à l'intérieur des phospholipides sont considérés comme d'excellents marqueurs du stress oxydant. Selon l'AGPI dont ils sont issus on distingue plusieurs classe d'isoprostanes

F_2-IsoP ↔ Acide arachidonique
F_3-IsoP ↔ Acide eicosapentaénoïque
F_4-IsoP ↔ acide docosahexaénoïque

Les protéines sont une autre cible privilégiée du stress oxydant. En effet l'oxydation des protéines peut impliquer des acides aminés spécifiques entraînant la dégradation de la protéine.

Certains acides aminés portant des résidus aromatiques (tyrosine, phénylalanine, tryptophane) ou ayant un noyau imidazole (histidine) et les résidus soufrés de la méthionine et de la cystéine sont préférentiellement oxydés. On assiste alors à de nombreuses modifications notamment la formation de dityrosines [18] et la formation de groupements carbonyles facilement détectables. Récemment, une méthode plus globale de détermination a été proposée : les AOPP (Advanced Oxidation Protein Products) qui semblent corrélés aux dityrosines et aux AGEs (Advanced Glycation End products), produits de dégradation des glucides [19].

FRO ET SIGNALISATION CELLULAIRE

Les FRO produites en faible quantité pourront avoir un rôle informatif et ainsi participer à la signalisation cellulaire et l'expression génique On sait en effet que l'activité de plusieurs facteurs de transcription peut être modulée par l'équilibre redox de la cellule. Ainsi le NF (Nuclear Factor) kB et le système AP (Activator Protein)-1 sont stimulés par les FRO [20-24], en agissant notamment sur les voies de signalisation placées en amont : les MAP (Mitogen Activated Protein) Kinases. Ces deux facteurs de transcription sont largement impliqués dans l'expression des gènes pro-inflammatoires tels que les molécules d'adhésion [25-27], la iNOS (NO synthase inductible) [28-31], les cytokines [28-31]. Le SO pourrait donc par l'intermédiaire de l'activation de ces facteurs de transcription être impliqué dans l'entretien de la réponse inflammatoire.

De la même facon, l'activation de la NADPH oxydase semble impliquée dans la prolifération des cellules musculaires lisses [32, 33]. Enfin, plusieurs études confirment que la production de FRO pourrait moduler l'activité des métalloprotéinases [34, 35].

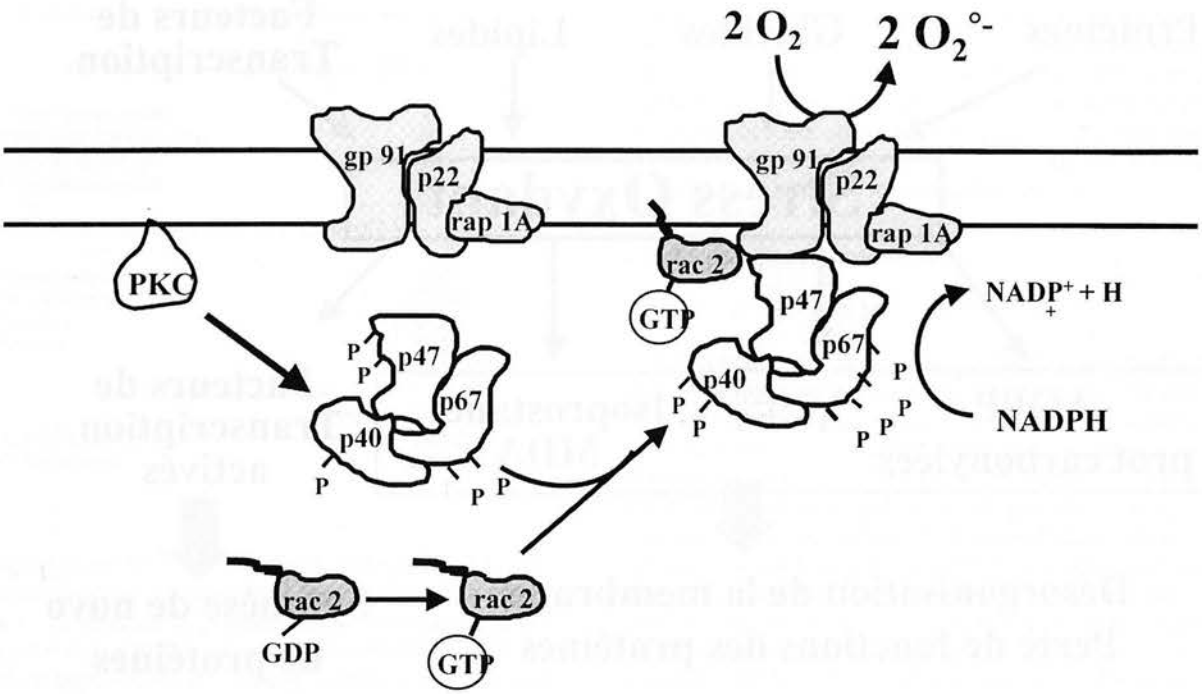

FIG. 3. – Mécanisme d'activation de la NADPH oxydase.

MÉCANISME D'ACTIVATION DE LA NADPH OXYDASE

Dans des cellules phagocytaires quiescentes, la NADPH oxydase est composée d'un complexe, formé du cytochrome b558 et de la petite protéine G Rap 1A, localisé au niveau de la membrane des granules de sécrétion et de plusieurs sous unités cytosoliques associées. Lors de l'activation, le complexe cytosolique constitué de la p47^{phox}, de la p67^{phox} et de la p40^{phox} et la protéine p21 Rac ainsi que les granules de sécrétion seront transloqués au niveau de la membrane plasmique pour former la NADPH oxydase active [36] (Fig. 3).

Le complexe membranaire

Le cytochrome b558 : Il est formé de la gp91^{phox}, protéine glycosylée, dont le rôle est d'assurer le transfert des electrons du NADPH vers l'oxygène moléculaire [37], et de la p22^{phox}.

La protéine Rap 1A : Elle pourrait participer à la desactivation de la NADPH oxydase [38, 39].

Les sous unités cytosoliques

À l'état quiescent les sous unités cytosoliques p47^{phox}, p67^{phox} et p 40^{phox} forment un complexe de 240-250 kDa.

La p47^{phox} : Le rôle de cette protéine est le transport des sous-unités cytosoliques vers le complexe membranaire. Afin d'effectuer son rôle de transporteur, la p47^{phox} doit être largement phosphorylée. Cette phosphorylation se fait essentiellement en deux étapes. Dans un premier temps, la p47^{phox} associée aux autres protéines cytosoliques est phosphorylée dans le cytosol, cette phosphorylation permet la translocation de la protéine au niveau du complexe membranaire. Une fois liée au complexe membranaire, la p47^{phox} subit une nouvelle série de phosphorylations. Il semblerait qu'*in vitro*, la p47^{phox} ne soit pas indispensable à l'activation de la NADPH oxydase [40]. En effet, dans un système recombinant en absence de p47^{phox} mais avec des concentrations élevées en p67^{phox} et p21 Rac 2, la NADPH oxydase est active. La p47^{phox} agit donc comme une protéine adaptatrice en augmentant de 50 à 100 fois la liaison des deux autres sous-unités cytosoliques.

La p67^{phox} : contrairement à la p47^{phox}, elle est absolument nécessaire, elle active le transfert des électrons à l'intérieur du cytochrome [36, 41] Elle possède un site de fixation pour le NADPH.

La p40^{phox} : à l'état quiescent, la p40^{phox} est phosphorylée et elle subit de nouvelles phosphorylations lors de l'activation. Son rôle est peu connu ; elle pourrait avoir un rôle inhibiteur et maintiendrait le complexe cytosolique dans un état inactif.

La p21 Rac : elle appartient à la famille des GTPases Rho. Dans les cellules quiescentes, elle est associée à une protéine inhibitrice, la protéine Rho GDI (GDP Dissociation Inhibitor). Lors de l'activation cellulaire, la protéine Rho GDI va se dissocier et le GDP sera échangé en GTP. Parallèlement, l'activation de la NADPH oxydase

nécessite l'ancrage de la protéine Rac au niveau de la membrane plasmique, ceci se fait par l'intermédiaire d'une modification post traductionnelle qui correspond à la fixation d'un groupement isoprène (dérivé de l'acide mévalonique) au niveau du carboxy terminal de la séquence peptidique [42]. Une fois que la protéine Rac sera sous sa forme liée au GTP, elle pourra interagir avec la p67^{phox} [43] et permettre ainsi la translocation des sous-unités cytosoliques au niveau du complexe membranaire.

IMPLICATION DU STRESS OXYDANT EN PATHOLOGIE

Le stress oxydant est largement impliqué dans le développement de nombreuses pathologies ayant une composante inflammatoire ou associées au viellissement.

NADPH oxydase et inflammation

Les pathologies inflammatoires comportent généralement une activation leucocytaire, secondaire à une production accrue de cytokines. Celle-ci peut être à l'origine d'une surproduction de FRO, dépassant les mécanismes de défense et entraînant une extension des lésions tissulaires. Nous ne ferons que rappeler brièvement trois pathologies associées à l'inflammation.

Stress oxydant et Systemic Inflammatory Response Syndrom (SIRS)

Le SIRS est un syndrome regroupant un ensemble de pathologies diverses (infections, pancréatites aiguës, brûlures, etc.) infectieuses ou non infectieuses, qui ont en commun une inflammation systémique.

Le stress oxydant est fortement impliqué dans la physiopathologie du SIRS [44], comme en témoignent des travaux sur les modèles animaux et, plus récemment, des études cliniques [45]. En effet, il a été mis en évidence une augmentation de la production de FRO leucocytaire chez des patients en SIRS. Cette surproduction de FRO serait liée essentiellement à l'hyperleucocytose avec prédominance de polynucléaires. D'autres études ont montré une augmentation des taux plasmatiques de MDA dans les diverses variétés de SIRS, comme le choc septique [46], le syndrome de Détresse Respiratoire Aigu (SDRA) [47] ou le sepsis [48].

NADPH oxydase et asthme

La principale composante du stress oxydant associée à l'hyperréactivité bronchique semble être une surproduction de formes réactives de l'oxygène. En effet, une surproduction de FRO par les cellules inflammatoires recueillies par LBA (lavage broncho alvéolaire) a été constamment observée [49-53]. Cette production de FRO est sous la dépendance de l'activation de la NADPH oxydase phagocytaire par des agents pro inflammatoires, particulaires (IgG, LPS) ou solubles (anaphylatoxines, médiateurs lipidiques de l'inflammation, cytokines, etc.). Parmi les cellules infiltrantes, les éosinophiles constitueraient la principale source de FRO au niveau pulmonaire [52].

Très récemment, il a pu être montré que la production de FRO par la NADPH oxydase, n'était pas limitée aux phagocytes, mais que de nombreuses cellules épithéliales, dont les cellules trachéales, possédaient une NADPH oxydase activable [54], cette production pouvant être impliquée dans le maintien du tonus trachéal.

L'activation de la NADPH oxydase n'est pas limitée au niveau des voies respiratoires, mais est auusi observée dans les phagocytes [55]. Cette activation liée à la sévérité de l'asthme [56] pourrait être partiellement corrigée par des agents pharmacologiques classiquement utilisés dans l'asthme (corticoïdes, théophilline) [57]

Stress oxydant et hémodialyse

L'existence d'un stress oxydant, plus particulièrement une production accrue de FRO, a été mise en évidence chez les patients hémodialysés. Cette surproduction peut provenir d'une part des troubles métaboliques liés à l'urémie et, d'autre part, du traitement par dialyse lui-même, à savoir l'interaction périodique du sang avec le circuit extra-corporel et la présence d'agents pathogènes dans le dialysat. Ces différents troubles vont induire l'activation phagocytaire et provoquer l'activation de la NADPH oxydase.

Le stress oxydant a récemment été reconnu comme un des acteurs de la malnutrition du sujet dialysé, comme l'ont rapporté Stenvinkel *et al.* dans le MIA syndrome (Malnutrition, Inflammation and Atherosclerosis syndrome) [58]. Les auteurs démontrent une étroite relation existant entre des marqueurs nutritionnels, inflammatoires et cardio-vasculaires chez les patients IRC avec, comme intermédiaires principaux, les cytokines pro-inflammatoires sécrétées lors des séances de dialyse [58, 59]

NADPH oxydase et pathologies associées au vieillissement

Le stress oxydant a pu être impliqué dans de nombreuses maladies associées au vieillissement, en particulier dans l'athérogenèse, les démences neurodégénératives, les pathologies oculaires [60] et les cancers [61, 62].

Implication du stress oxydant dans l'athérogenese

L'athérosclérose, anatomiquement définie comme un épaississement de l'intima avec dépôt lipidique, est une maladie poly-factorielle dont les mécanismes demeurent encore incomplètement élucidés. Parmi les hypothèses avancées, les hypothèses oxydative [63] et inflammatoire [64] suggèrent que l'infiltrat monocytaire, le dépôt lipidique et la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) puissent être initiés et/ou amplifiés par les modifications oxydatives des lipoprotéines. Dès le stade de l'oxydation minimale, les LDL séquestrées

dans l'espace extracellulaire sous-endothélial [65] induisent la production locale d'agents chimiotactiques et de facteurs de croissance, à l'origine du recrutement des monocytes et de leur différenciation en macrophages dans la paroi artérielle [66].

Cette vision de l'athérosclérose implique d'une part des modifications des éléments circulants (activation cellulaire, modifications qualitatives et quantitatives des LDL) et d'autre part, des modifications de la paroi artérielle, parmi celles-ci, le dysfonctionnement endothélial avec des modifications de la sécrétion des facteurs vasoactifs endothéliaux (NO ; prostacyclines ; endothéline), une dédifférenciation et une prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires ainsi que l'activation des macrophages résidents avec une surproduction de formes réactives de l'oxygène et de cytokines [67-69].

Cette surproduction de FRO observée au cours du processus athérogène est particulièrement la conséquence de l'activation de la NADPH oxydase par de nombreux stimuli des cellules de la paroi vasculaire, à savoir les macrophages résidents, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires. La plupart des effets des FRO peuvent être médiés par des facteurs de transcription activés par les FRO à savoir le NFkB et le système AP-1 [70]

Implication de la NADPH oxydase dans l'hypertension

Récemment, il a été démontré que l'hypertension induisait une augmentation de la production d'anion superoxyde. Le mécanisme impliqué serait une activation de la NADPH oxydase vasculaire, notamment par l'angiotensine II [71-73]. Cette activation ne serait pas due à un effet presseur de l'angiotensine II, mais à un effet propre car une hypertension induite par la norépinéphrine ne stimule pas l'activation de la NADPH oxydase ni la production d'anion superoxyde. Cet effet de l'angiotensine II est confirmé par des travaux réalisés sur des rats Sprague-Dawley, où l'injection d'une faible quantité d'angiotensine II (0,6 mg/kg/j) n'induisait pas de modifications de la pression mais pouvait induire une augmentation de la production d'anion superoxyde par les cellules vasculaires. Cette surproduction de FRO est également observée dans un modèle de rats génétiquement hypertendus, les rats SHR (Spontaneously Hypertensive rats) [74].

NADPH oxydase, FRO et maladies neurodégénératives

Parmi les maladies associées au vieillissement, le stress oxydant et plus particulièrement une production accrue de radicaux libres, sont fréquemment caractérisés dans les désordres neuro-dégénératifs, à savoir la maladie de Parkinson [75, 76], la sclérose latérale amyotrophique [77, 78] et la maladie d'Alzheimer [79-82]. Cette dernière est caractérisée par la présence de plaques d'amyloïdes au niveau du système nerveux central. La présence et la toxicité de la protéine β amyloïde dans le cerveau des patients est largement associée à la production de radicaux libres. En effet, il est bien connu que cette protéine est à l'origine de la formation d'anion superoxyde par la NADPH oxydase des cellules de la microglie [83]. La protéine β amyloïde favoriserait la translocation des sous-unités p47 et $p67^{phox}$ au niveau du complexe membranaire [84].

MODULATION DE LA NADPH OXYDASE

La régulation transcriptionelle

La régulation positive

Au cours de la différenciation cellulaire

Au cours de la différenciation cellulaire la $gp91^{phox}$ est exprimée au dernier stade des phagocytes et lymphocytes B différenciés [85]. L'expression de cette sous-unité de la NADPH oxydase est régulée par de nombreux facteurs de transcription ; parmi ceux-ci, le facteur GATA 1 semble être un activateur alors que GATA 2 semble inhiber l'action de GATA 1. De la même façon, PU1 est un activateur essentiel de la $gp91^{phox}$ [86].

Des études *in vitro* sur une lignée cellulaire (HL-60) ont montré que la $p47^{phox}$ apparaissait un jour après le début de la différenciation et la $p67^{phox}$ 3 jours après. De plus, cette étude a montré que l'activité de la NADPH oxydase dans les neutrophiles était dépendante de la présence de la $p67^{phox}$.

Il semblerait que l'expression des autres sous-unités de la NADPH oxydase ($p22^{phox}$, $p40^{phox}$ et Rac) ait lieu à un stade moins différencié : stade promyélocyte [11].

Par les agents « pharmacologiques »

L'angiotensine II

Il est actuellement bien reconnu que l'angiotensine II contribue à une surproduction d'anion superoxyde par la NADPH oxydase des cellules de la paroi vasculaire. La transcription et la traduction de la $p67^{phox}$ semblent être une cible de l'angiotensine car l'actinomycine et la cycloheximide inhibent l'effet observé. À la suite de ces observations, les auteurs ont émis l'hypothèse que l'angiotensine II stimule la NADPH oxydase des fibroblastes aortiques via l'activation transcriptionnelle de la $p67^{phox}$. [87].

L'angiotensine II peut aussi influencer l'expression de la $p22^{phox}$; en effet Fukui *et al.* ont montré que la perfusion d'angiotensine II augmente la quantité d'ARNm $p22^{phox}$ aortique après 3 jours d'implantation, et le maximum est atteint au bout de 5 jours [88]. Cet effet est levé par le losartan (25 mg/kg/jour) et l'hydralazine (15 mg/kg/jour) [89].

L'endothéline I

Duerrschmit a récemment montré que l'endothéline I induisait une augmentation de la production d'anion superoxyde par les cellules endothéliales (cellules HUVEC). Une surexpression de la $gp91^{phox}$ serait à l'origine de cette surproduction. En effet, les auteurs ont

montré que l'incubation de ET-1 augmente de façon dose dépendante la quantité d'ARNm de la gp 91^{phox}. L'augmentation de l'expression de la gp91^{phox} est médiée par le récepteur à l'endothéline de type B [90].

L'adénosine tri-phosphate

Greiber *et al.* ont montré que l'activation de la NADPH oxydase était sous la dépendance d'une stimulation par l'ATP ; en effet, en présence d'ATP (10-4 M pendant 4 heures), les auteurs ont observé une augmentation de la production d'anion superoxyde [91]. Cette activation de la NADPH oxydase par l'ATP est due à une augmentation de l'expression de la p67^{phox} (aucune variation n'est observée pour les autres sous-unités). L'ATP pourra aussi intervenir également au niveau de la traduction du messager car, en présence de cycloheximide, l'activation est levée.

LA RÉGULATION NÉGATIVE

Les glucocorticoïdes

Le traitement de cellules musculaires en présence de dexaméthasone pendant 24 heures diminuent la production d'anion superoxyde basale et induite par le (PDGF)-AB- et l'angiotensine II. La production induite par le PDGF est aussi inhibée par la prednisolone et l'hydrocortisone, mais pas par les autres stéroïdes. Cette inhibition de la production d'anion superoxyde par la dexaméthasone est due à une diminution de l'expression de la p22^{phox} [92].

La régulation post traductionnelle

LA RÉGULATION POSITIVE

Le système de la Protéine Kinase C (PKC) est largement impliqué dans l'activation de la NADPH oxydase. En effet, la PKC va phosphoryler les différentes sous-unités, la p47^{phox} et la p67^{phox} ainsi que la p22^{phox} [93]. Toutefois, l'implication des MAP Kinases a été récemment reconnue en particulier pour les éosinophiles [94] ou les cellules musculaires lisses [95]. D'autres voies de transduction pourraient être impliquées de facon plus accessoire comme l'augmentation de Ca^{++} intracellulaire via le système phospholipase C-inositol tri phosphate ou les tyrosines kinases [96].

L'acide arachidonique produit par la phospholipase A2, semble être un puissant activateur de la NADPH oxydase par l'intermédiaire de nombreuses cibles. En effet, celui-ci va initier un changement de conformation de la p47^{phox}, ce qui va favoriser son interaction avec la p22 [97], mais aussi induire la dissociation entre la protéine Rac et sa protéine régulatrice Rho GDI, ou bien encore en agissant en amont sur les protéines kinases.

Le Lipopolysaccharide (LPS)

Le LPS n'active pas directement la NADPH oxydase leucocytaire, mais la rend plus sensible aux autres stimuli : ce phénomène est connu sous le terme de "priming". Ainsi le LPS libéré par les agents infectieux au niveau d'un site infecté, augmente la sensibilité et la réponse des cellules phagocytaires voisines, ce qui amplifie la réponse inflammatoire. Tant que cette hyperinflammation reste localisée, l'effet est bénéfique en permettant une destruction plus rapide des agents pathogènes mais, en cas d'extension systémique de la réponse inflammatoire, on aboutit au SIRS.

L'effet "priming" serait expliqué par une facilitation de l'assemblage des sous-unités de la NADPH oxydase des phagocytes prétraités par du LPS. Plusieurs mécanismes pourraient être impliqués : *i*) le LPS induit, de façon limitée, la translocation de la p47^{phox} à la membrane [98] et augmente l'expression membranaire du flavocytochrome b558 par la voie de la p38 MAPK [99], *ii*) la stimulation des phagocytes par le LPS, serait responsable d'une activation de la p38 alpha MAPK [100].

Ce mécanisme rendrait compte d'une production plus rapide et intense d'anion superoxyde après stimulation des phagocytes pré-activés.

LA RÉGULATION NÉGATIVE

Les anti-oxydants

Il est bien reconnu que la vitamine E est à l'origine d'une diminution de la production de FRO en agissant notamment sur l'activation de la NADPH oxydase. Des travaux précédents réalisés dans le laboratoire ont montré qu'en présence d'α tocophérol, on observe une diminution de la translocation de la p47^{phox} au niveau de la membrane plasmique ainsi qu'une diminution de la phosphorylation [101].

Les inhibiteurs de l'HMG CoA réductase

Les inhibiteurs de l'HMG Co A réductase, également appelés statines, en plus de leur effet hypolipémient possèdent de nombreux effets dits pléiotropes. La plupart de ces effets sont la conséquence d'une modification des petites protéines G. Il a été récemment démontré que les statines avaient des propriétés anti-oxydantes « à médiation cellulaire » notamment par une diminution de la production d'anion superoxyde par la NADPH oxydase des cellules endothéliales. Le mécanisme d'activation envisagé par les auteurs serait une inactivation de la petite protéine G p21 Rac [102]. Au laboratoire, nous avons montré *in vitro* que les statines inhibaient la production d'anion superoxyde de cellules THP-1 (lignée promonocytaire) avec des pourcentages différents selon la statine utilisée. Cette inhibition de la NADPH oxydase par les statines est levée par le mévalonate, le farnésyl pyrophosphate et le géranygéranyl pyrophosphate. Tout récemment, une étude *in vivo*, réalisée sur des rats rendus hypertendus par une perfusion chronique d'angiotensine II (200 ng/kg/min, 10 jours) traités par simvastatine (60 mg/kg/jour, 11 jours)a été réalisée. Nos résultats montrent une inhibition de la production de FRO par les PMN et le tissu aortique, associée à une diminution de la pression artérielle et de l'hypertrophie cardiaque par rapports aux animaux non traités par statine.

CONCLUSION

Le stress oxydant, par l'intermédiaire d'une production accrue de FRO et ou d'une diminution des mécanismes de défense anti-oxydants, est largement impliqué dans le développement de nombreuses pathologies associées à l'inflammation et au vieillissement. Le stress oxydant apparaît donc comme une cible thérapeutique privilégiée pour prévenir ou limiter ces pathologies soit en augmentant les systèmes de défense, soit en diminuant la production des radicaux libres.

Ces dernières années, la supplémentation en vitamine E a été largement utilisée. En effet, dans les années 1990, l'étude CHAOS (Cambridge Heart Antioxidant Study), premier essai randomisé, a montré une réduction de risque d'un nouvel infarctus du myocarde en prévention secondaire mais sans effet sur la mortalité cardiovasculaire totale [103]. Cependant, l'étude GISSI-Prevenzione (Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravivenza nell'Infarto Miocardio) (GISSI-Prevenzione Investigators, 1999) [104], n'a pas pu mettre en évidence d'effet bénéfique significatif de la vitamine E. Ce résultat négatif est confirmé par l'étude HOPE (Heart Outcomes Prevention Evaluation) portant sur 8 000 patients à haut risque, coronariens ou diabétiques (Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators, 2000). Ces résultats concernant la prévention secondaire, confirmés par la méta-analyse de Yussuf [105], sont extrêmement décevants et montrent les limites de la théorie oxydative de l'athérogenèse.

Une autre voie prometteuse serait de limiter la production des formes réactives de l'oxygène à la fois au niveau systémique ou tissulaire. Dans ce contexte, la modulation négative de la NADPH oxydase semble être une cible privilégiée. En effet, la plupart des événements secondaires au stress oxydant ont pour origine une production accrue d'anion superoxyde. À ce jour, quelques molécules utilisées en thérapeutique (corticoïdes, antioxydants, inhibiteurs de l'HMG CoA réductase) sont capables d'inhiber la NADPH oxydase et la production de radicaux libres.

Ces observations pourraient constituer une base rationnelle pour envisager leur utilisation dans le contrôle de la production pathologique de FRO et les processus néfastes qui en résultent.

BIBLIOGRAPHIE

1. Sies H., Biochemistry of oxidative stress. *Angew. Chem. Int. Eds. Engl.*, 1996, *25*, 1058-1071.
2. Hillered L., Ernster L. & Afors K., Brain ischemia and oxygen radicals. *In:* Bes A., Braquet P., Paoletti R., Sjesjo B. K. Eds. *Cerebral Ischemia. Excepta Medica.* Amsterdam, 1984 : 1293-1300.
3. Harman D., The biological clock: the mitochondria ? *J. Amer. Geriatrics Soc.*, 1972, *20*, 145-147.
4. Braquet P. & Braquet M., Phagocytose et stimulation des processus d'oxydation cellulaire. *In:* Biochimie de l'inflammation. Blotman F., Crastes de Paulet A., Simon L. Eds. Masson. Paris, 1983 : 1-43.
5. Casimir C., Chetty M., Bohler M. C., Garcia R., Fischer A., Griscelli C., Johnson B. & Segal A. W., Identification of the defective NADPH-oxidase component in chronic granulomatous disease: a study of 57 european families. *Eur. J. Clin. Invest.*, 1992, *22 (6)*, 403-406.
6. Porter C. D., Parkar M. H., Verhoeven A. J., Levinsky R. J., Collins M. K. & Kinnon C., p22^{phox}-deficient chronic granulomatous disease: reconstitution by retrovirus-mediated expression and identification of a biosynthetic intermediate of gp91^{phox}. *Blood*, 1994, *84 (8)*, 2767-2775.
7. Vergnaud S., Paclet M. H., El Benna J., Pocidalo M. A. & Morel F., Complementation of NADPH oxidase in p67^{phox} deficient CGD patients p67^{phox}-p40^{phox} interaction. *Eur. J. Biochem.*, 2000, *267 (4)*, 1059-1067.
8. Porter C. D., Kuribayashi F., Parkar M. H., Roos D. & Kinnon C., Detection of gp91^{phox} precursor protein in B-cell lines from patients with X-linked chronic granulomatous disease as an indicator for mutations impairing cytochrome b558 biosynthesis. *Biochem. J.*, 1996, *315 (Pt 2)*, 571-575.
9. Meischl C. & Roos D., The molecular basis of chronic granulomatous disease. *Springer Semin. Immunopathol.* 1998, *19 (4)*, 417-434.
10. Carr A. & Winterbourn C., Oxidation of neutrophil glutathione and protein thiols by myeloperoxidase-derived hypochlorous acid. *Biochem. J.*, 1997, *327*, 275-281.
11. Carr A., McCall M. & Frei B., Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species – Reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2000, *20*, 1716-1723.
12. Babior B., Phagocytes and Oxidative Stress. *Am. J. Med.*, 2000, *109*, 33-44.
13. Beckman J. & Koppenol W., Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol.*, 1996, *271*, C1424-C1437.
14. Kissner R., Nauser T., Bugnon P., Lye P. G. & Koppenol W. H., Formation and properties of peroxynitrite as studied by laser flash photolysis, high-pressure stopped-flow technique, and pulse radiolysis (published erratum appears in *Chem. Res. Toxicol.*, 1998, *11 (5)*, 557.). *Chem. Res. Toxicol.*, 1997, *10 (11)*, 1285-1292.
15. Stenvinkel P., Holmberg I., Heimburger O. & Diczfalusy U., A study of plasmalogen as an index of oxidative stress in patients with chronic renal failure. Evidence of increased oxidative stress in malnourished patients. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 1998, *13 (10)*, 2594-2600.
16. Uchida K., Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radic. Biol. Med.*, 2000, *28 (12)*, 1685-1696.
17. Cracowski J. L., Stanke-Labesque F., Souvignet C. & Bessard G., Isoprostanes: new markers of oxidative stress in human diseases. *Presse Med.*, 2000, *29 (11)*, 604-610.
18. Amado R., Aeschbach R. & Neukom H., Dityrosine: *in vitro* production and characterization. *Methods in Enzymology*, 1984, *107*, 377-388.
19. Witko-Sarsat V., Friedlander M., Capeillere-Blandin C., Nguyen-Khoa T., Nguyen A. T., Zingraff J., Jungers P. & Descamps-Latscha B., Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.*, 1996, *49 (5)*, 1304-1313.
20. Lo Y. Y. & Cruz T. F., Involvement of reactive oxygen species in cytokine and growth factor induction of c-fos expression in chondrocytes. *J. Biol. Chem.*, 1995, *270 (20)*, 11727-11730.
21. Ha H. & Lee H. B., Reactive oxygen species as glucose signaling molecules in mesangial cells cultured under high glucose. *Kidney Int.*, 2000, *58 (Suppl. 77)*, S19-S25.
22. Schoonbroodt S. & Piette J., Oxidative stress interference with the nuclear factor-kappa B activation pathways. *Biochem. Pharmacol.* 2000, *60 (8)*, 1075-1083.

23. Shrivastava A. & Aggarwal B. B., Antioxidants differentially regulate activation of nuclear factor-kappa B, activator protein-1, c-jun amino-terminal kinases, and apoptosis induced by tumor necrosis factor: evidence that JNK and NF-kappa B activation are not linked to apoptosis. *Antioxid Redox Signal* 1999, *1 (2)*, 181-191.
24. Lum H. & Roebuck K. A., Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2001, *280 (4)*, C719-C741.
25. Satriano J. A., Banas B., Luckow B., Nelson P. & Schlondorff D. O., Regulation of RANTES and ICAM-1 expression in murine mesangial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 1997, *8 (4)*, 596-603.
26. Roebuck K. A., Oxidant stress regulation of IL-8 and ICAM-1 gene expression: differential activation and binding of the transcription factors AP-1 and NF-kappa B (Review). *Int. J. Mol. Med.*, 1999, *4 (3)*, 223-230.
27. Ahmad M., Theofanidis P. & Medford R., Role of activating protein-1 in the regulation of the vascular cell adhesion molecule 1 gene expresion by Tumor Necrosis Factor alpha. *J. Biol. Chem.*, 1998, *273 (8)*, 4616-4321.
28. Miralles C., Busquets X., Santos C., Togores B., Hussain S., Rahman I., MacNee W. & Agusti A. G., Regulation of iNOS expression and glutathione levels in rat liver by oxygen tension. *FEBS Lett.*, 2000, *476 (3)*, 253-257.
29. Vaziri N. D., Ni Z., Oveisi F. & Trnavsky-Hobbs D. L., Effect of antioxidant therapy on blood pressure and NO synthase expression in hypertensive rats. *Hypertension*, 2000, *36 (6)*, 957-964.
30. Dijkstra G., Moshage H., van Dullemen H. M., de Jager-Krikken A., Tiebosch A. T., Kleibeuker J. H., Jansen P. L. & van Goor H., Expression of nitric oxide synthases and formation of nitrotyrosine and reactive oxygen species in inflammatory bowel disease. *J. Pathol.*, 1998, *186 (4)*, 416-421.
31. Aliev G., Bodin P. & Burnstock G., Free radical generators cause changes in endothelial and inducible nitric oxide synthases and endothelin-1 immunoreactivity in endothelial cells from hyperlipidemic rabbits. *Mol. Genet. Metab.*, 1998, *63 (3)*, 191-197.
32. Patterson C., Ruef J., Madamanchi N. R., Barry-Lane P., Hu Z., Horaist C., Ballinger C. A., Brasier A. R., Bode C. & Runge M. S., Stimulation of a vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase by thrombin. Evidence that $p47^{phox}$ may participate in forming this oxidase *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, 1999, *274 (28)*, 19814-19822.
33. West N., Guzik T., Black E. & Channon K., Enhanced superoxide production in experimental venous bypass graft intimal hyperplasia: role of NAD(P)H oxidase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2001, *21 (2)*, 189-194.
34. Galis Z. S., Asanuma K., Godin D., Meng X., N-acetylcysteine decreases the matrix-degrading capacity of macrophage-derived foam cells: new target for antioxidant therapy? *Circulation*, 1998, *97 (24)*, 2445-2453.
35. Kawaguchi Y., Tanaka H., Okada T., Konishi H., Takahashi M., Ito M. & Asai J., The effects of ultraviolet A and reactive oxygen species on the mRNA expression of 72-kDa type IV collagenase and its tissue inhibitor in cultured human dermal fibroblasts. *Arch. Dermatol. Res.*, 1996, *288 (1)*, 39-44.
36. Babior B. M., NADPH oxidase: an update. *Blood*, 1999, *93 (5)*, 1464-1476.
37. Archer S. L., Reeve H. L., Michelakis E., Puttagunta L., Waite R., Nelson D. P., Dinauer M. C. & Weir E. K. O_2 sensing is preserved in mice lacking the $gp91^{phox}$ subunit of NADPH oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, *96 (14)*, 7944-7949.
38. Dagher M. C., Fuchs A., Bourmeyster N., Jouan A. & Vignais P. V., Small G proteins and the neutrophil NADPH oxidase. *Biochimie*, 1995, *77 (7-8)*, 651-660.
39. Quinn M. T., Low-molecular-weight GTP-binding proteins and leukocyte signal transduction. *J. Leukoc. Biol.*, 1995, *58 (3)*, 263-276.
40. Freeman J., Abo A. & Lambeth J. Rac "insert region" is a novel effector region that is implicated in the NADPH activation of NADPH oxidase, but not PAK 65. *J. Biol. Chem.*, 1996, *271 (33)*, 19794-19801.
41. Han C., Freeman J., Lee T., Motalebi S. & Lambeth J. Regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase. *J. Biol. Chem.*, 1998, *273 (27)*, 16663-16668.
42. Kreck M. L., Freeman J. L., Abo A. & Lambeth J. D., Membrane association of Rac is required for high activity of the respiratory burst oxidase. *Biochemistry*, 1996, *35 (49)*, 15683-15692.
43. Ando S., Baibuchi K., Sasaki T., Hiraoka K., Nishiyama T., Mizuno T., Asada M., Nunoi H., Matsuda I., Matsuura Y., Polakis P., McCormick F. & Takai Y., Post-translational processing of Rac p21s is important for their interaction with the GDP-GTP exchange proteins and for their activation of NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.*, 1992, *267 (36)*, 25709-25713.
44. Novelli G., Role of free radicals in septic shock. *J. Physiol. Pharmacol.*, 1997, *48 (4)*, 517-527.
45. Zimmerman J. J., Defining the role of oxyradicals in the pathogenesis of sepsis. *Crit. Care Med.*, 1995, *23 (4)*, 616-617.
46. Ogilvie A., Groeneveld A., Straub J. & Thijs L., Plasma lipid peroxides and antioxidants in human septic shock. *Intensive Care Med.*, 1991, *17*, 40-44.
47. Metnitz P., Bartens C., Fischer M., Fridich P., Steltzer H. & Druml W., Antioxidant status in patients with acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med.*, 1999, *25 (2)*, 180-185.
48. Machiedo G., Pwell R., Rush B., Swislocki N. & Dikdan G., The incidence of decrease red blood cell deformability in sepsis and the association with oxygen free radical damage and multiple-system organ failure. *Arch. Surg.*, 1989, *124*, 1386-1389.
49. Calhoun W. J. & Bush R. K., Enhanced reactive oxygen species metabolism of airspace cells and airway inflammation follow antigen challenge in human asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1990, *86 (3 Pt 1)*, 306-313.
50. Calhoun W. J., Reed H. E., Moest D. R. & Stevens C. A., Enhanced superoxide production by alveolar macrophages and air-space cells, airway inflammation, and alveolar macrophage density changes after segmental antigen bronchoprovocation in allergic subjects. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1992, *145 (2 Pt 1)*, 317-325.
51. Vachier I., Chanez P., Le Doucen C., Damon M., Descomps B. & Godard P., Enhancement of reactive oxygen species formation in stable and unstable asthmatic patients. *Eur. Respir. J.*, 1994, *7 (9)*, 1585-1592.
52. Sanders S. P., Zweier J. L., Harrison S. J., Trush M. A., Rembish S. J. & Liu M. C., Spontaneous oxygen radical production at sites of antigen challenge in allergic subjects. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1995, *151 (6)*, 1725-1733.
53. Jarjour N. N. & Calhoun W. J. Enhanced production of oxygen radicals in asthma. *J. Lab. Clin. Med.*, 1994, *123 (1)*, 131-136.
54. Fu X. W., Wang D., Nurse C. A., Dinauer M. C. & Cutz E., NADPH oxidase is an O_2 sensor in airway chemoreceptors: evidence from K^+ current modulation in wild-type and oxidase-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, *97 (8)*, 4374-4379.
55. Vachier I., Chanez P., Doucen C. L., Damon M., Descomps B. & Godard P., Enhancement of reactive oxygen species formation in stable and unstable asthmatic patients. *Eur. Respir. J.*, 1994, *7*, 1585-1592.

56. Antczak A., Nowak D., Bialasiewicz P. & Kasielski M., Hydrogen peroxide in expired air condensate correlates positively with early steps of peripheral neutrophil activation in asthmatic patients. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1999, *47 (2)*, 119-126.
57. Majori M., Vachier I., Godard P., Farce M., Bousquet J. & Chanez P., Superoxide anion production by monocytes of corticosteroid-treated asthmatic patients. *Eur. Respir. J.*, 1998, *11 (1)*, 133-138.
58. Stenvinkel P., Heimburger O., Lindholm B., Kaysen G. A. & Bergstrom J., Are there two types of malnutrition in chronic renal failure? Evidence for relationships between malnutrition, inflammation and atherosclerosis (MIA syndrome). *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2000, *15 (7)*, 953-960.
59. Stenvinkel P., Heimburger O., Paultre F., Diczfalusy U., Wang T., Berglund L. & Jogestrand T., Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure. *Kidney Int.*, 1999, *55 (5)*, 1899-1911.
60. Delcourt C., Cristol J. P., Leger C. L., Descomps B. & Papoz L., Associations of antioxidant enzymes with cataract and age-related macular degeneration. The POLA study. Pathologies oculaires liées à l'âge. *Ophthalmology*, 1999, *106 (2)*, 215-222.
61. Mates J. M. & Sanchez-Jimenez F. M., Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2000, *32 (2)*, 157-170.
62. Guyton K. Z. & Kensler T. W., Oxidative mechanisms in carcinogenesis. *Br. Med. Bull.*, 1993, *49 (3)*, 523-544.
63. Steinberg D., Parthasarathy S. & Carew T., Beyond cholesterol: modification of low density lipoproteins that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.*, 1989, *320*, 915-929.
64. Ross R., Atherosclerosis, an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.*, 1999, *340 (2)*, 115-126.
65. Navab M., Berlinar J., Watson A., Hama S., Territo M., Lusis A., Shih D., Lentem B. V., Frank J. & Fogelman A., Th yin and yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff memorial lecture. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1996, *16 (7)*, 831-842.
66. Parhami F., Fang Z., Folgeman A., Andabibi A., Territo M. & Berliner J., Minimally modiefed low density lipoprotein-induced inflammatory responses in endothelial cells are mediated by cicyc adenosine monophosphate. *J. Clin. Invest.*, 1993, *92 (1)*, 471-478.
67. Griendling K. K., Sorescu D. & Ushio-Fukai M., NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ. Res.*, 2000, *86 (5)*, 494-501.
68. Lee T. S., Yen H. C., Pan C. C. & Chau L. Y., The role of interleukin 12 in the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1999, *19 (3)*, 734-742.
69. Farber H. W., Antonov A. S., Romanov Y. A., Smirnov V. N., Scarfo L. M. & Beer D. J., Cytokine secretion by human aortic endothelial cells is related to degree of atherosclerosis. *Am. J. Physiol.*, 1992, *262 (4 Pt 2)*, H1088-H1095.
70. Sen C. K. & Packer L., Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *Faseb. J.* 1996, *10 (7)*, 709-720.
71. Rajagopalan S., Kurz S., Munzel T., Tarpey M., Freeman B. A., Griendling K. K. & Harrison D. G., Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH-NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J. Clin. Invest.*, 1996, *97 (8)*, 1916-1923.
72. Pagano P. J., Clark J. K., Cifuentes-Pagano M. E., Clark S. M., Callis G. M. & Quinn M. T., Localization of a constitutively active, phagocyte-like NADPH oxidase in rabbit aortic adventitia: enhancement by angiotensin II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, *94 (26)*, 14483-14488.
73. Griendling K. K., Minieri C. A., Ollernshaw J. D. & Alexander R. W., Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.*, 1994, *74*, 1141-1148.
74. Zalba G., Beaumont F. J., San Jose G., Fortuno A., Fortuno M. A., Etayo J. C. & Diez J., Vascular NADH-NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 2000, *35 (5)*, 1055-1061.
75. Jenner P., Oxidative stress in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders. *Pathol. Biol. (Paris)*, 1996, *44 (1)*, 57-64.
76. Zhang Y., Dawson V. L. & Dawson T. M., Oxidative stress and genetics in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.*, 2000, *7 (4)*, 240-250.
77. Bergeron C., Oxidative stress: its role in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.*, 1995, *129 (Suppl.)*, 81-84.
78. Bonnefont-Rousselot D., Lacomblez L., Jaudon M., Lepage S., Salachas F., Bensimon G., Bizard C., Doppler V., Delattre J. & Meininger V., Blood oxidative stress in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.*, 2000, *178 (1)*, 57-62.
79. Multhaup G., Ruppert T., Schlicksupp A., Hesse L., Beher D., Masters C. L. & Beyreuther K., Reactive oxygen species and Alzheimer's disease. *Biochem. Pharmacol.*, 1997, *54 (5)*, 533-539.
80. Velez-Pardo C., Jimenez Del Rio M. & Lopera F. Familial Alzheimer's disease: oxidative stress, beta-amyloid, presenilins, and cell death. *Gen. Pharmacol.*, 1998, *31 (5)*, 675-681.
81. Retz W., Gsell W., Munch G., Rosler M. & Riederer P., Free radicals in Alzheimer's disease. *J. Neural Transm. Suppl.*, 1998, *54*, 221-236.
82. Behl C., Alzheimer's disease and oxidative stress: implications for novel therapeutic approaches. *Prog. Neurobiol.*, 1999, *57 (3)*, 301-323.
83. Bianca V. D., Dusi S., Bianchini E., Dal Pra I. & Rossi F. β-amyloid activates the O_2 forming NADPH oxidase in microglia, monocytes, and neutrophils. A possible inflammatory mechanism of neuronal damage in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.*, 1999, *274 (22)*, 15493-15499.
84. Shimohama S., Tanino H., Kawakami N., Okamura N., Kodama H., Yamaguchi T., Hayakawa T., Nunomura A., Chiba S., Perry G., Smith M. A. & Fujimoto S., Activation of NADPH oxidase in Alzheimer's disease brains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000, *273 (1)*, 5-9.
85. Miyamoto D., Someya A., Nunoi H., Nagaoka I. & Yamashita T., Analysis of the NADPH oxidase components during differentiation of HL-60 cells to eosinophilic lineage. *Biochim. Biophys. Acta*, 1994, *1224 (1)*, 11-16.
86. Yang D., Suzuki S., Hao L. J., Fujii Y., Yamauchi A., Yamamoto M., Nakamura M. & Kumatori A., Eosinophil-specific regulation of $gp91^{phox}$ gene expression by transcription factors GATA-1 and GATA-2. *J. Biol. Chem.*, 2000, *275 (13)*, 9425-9432.
87. Pagano P. J., Chanock S. J., Siwik D. A., Colucci W. S. & Clark J. K., Angiotensin II induces $p67^{phox}$ mRNA expression and NADPH oxidase superoxide generation in rabbit aortic adventitial fibroblasts. *Hypertension*, 1998, *32 (2)*, 331-337.
88. Fukui T., Ishizaka N., Rajagopalan S., Laursen J. B., Capers Q. T., Taylor W. R., Harrison D. G., de Leon H., Wilcox J. N. & Griendling K. K., $p22^{phox}$ mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. *Circ. Res.*, 1997, *80 (1)*, 45-51.
89. Ushio-Fukai M., Zafari A. M., Fukui T., Ishizaka N. & Griendling K. K., $p22^{phox}$ is a critical component of the superoxide-generating NADH-NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, 1996, *271 (38)*, 23317-23321.

90. Duerrschmidt N., Wippich N., Goettsch W., Broemme H. J. & Morawietz H., Endothelin-1 induces NAD(P)H oxidase in human endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000, *269 (3)*, 713-717.
91. Greiber S., Munzel T., Kastner S., Muller B., Schollmeyer P. & Pavenstadt H., NAD(P)H oxidase activity in cultured human podocytes: effects of adenosine triphosphate. *Kidney Int.*, 1998, *53 (3)*, 654-663.
92. Marumo T., Schini-Kerth V. B., Brandes R. P. & Busse R., Glucocorticoids inhibit superoxide anion production and p22^{phox} mRNA expression in human aortic smooth muscle cells. *Hypertension*, 1998, *32 (6)*, 1083-1088.
93. Regier D. S., Waite K. A., Wallin R. & McPhail L. C., A phosphatidic acid-activated protein kinase and conventional protein kinase C isoforms phosphorylate p22^{phox}, an NADPH oxidase component. *J. Biol. Chem.*, 1999, *274 (51)*, 36601-36608.
94. Lynch O. T., Giembycz M. A., Barnes P. J., Hellewell P. G. & Lindsay M. A., "Outside-in" signalling mechanisms underlying CD11b-CD18 mediated NADPH oxidase activation in human adherent blood eosinophils. *Br. J. Pharmacol.*, 1999, *128 (6)*, 1149-1158.
95. Yamamori T., Inanami O., Nagahata H., Cui Y. & Kuwabara M., Roles of p38 MAPK, PKC and PI3-K in the signaling pathways of NADPH oxidase activation and phagocytosis in bovine polymorphonuclear leukocytes. *FEBS Lett.*, 2000, *467 (2-3)*, 253-258
96. Lindsay M. A., Daniels I. & Fletcher J., Phospholipases and the activation and priming of neutrophils by peritoneal dialysis effluent. *Perit. Dial. Int.*, 1997, *17 (5)*, 471-479.
97. Shiose A. & Sumimoto H., Arachidonic acid and phosphorylation synergistically induce a conformational change of p47^{phox} to activate the phagocyte NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.*, 2000, *275 (18)*, 13793-13801.
98. De Leo F. R., Ulman K. V., Davis A. R., Jutila K. L. & Quinn M. T., Assembly of the human neutrophil NADPH oxidase involves binding of p67^{phox} and flavocytochrome β to a common functional domain in p47^{phox}. *J. Biol. Chem.*, 1996, *271 (29)*, 17013-17020.
99. Ward R. A., Nakamura M. & McLeish K. R., Priming of the neutrophil respiratory burst involves p38 mitogen-activated protein kinase-dependent exocytosis of flavocytochrome β(sub558)-containing granules. *J. Biol. Chem.*, 2000, *275 (47)*, 3613-3619.
100. Nick J. A., Avdi N. J., Young S. K., Lehman L. A., McDonald P. P., Frasch S. C., Billstrom M. A., Henson P. M., Johnson G. L. & Worthen G. S., Selective activation and functional significance of p38alpha mitogen- activated protein kinase in lipopolysaccharide-stimulated neutrophils. *J. Clin. Invest.*, 1999, *103 (6)*, 851-858.
101. Cachia O., Benna J. E., Pedruzzi E., Descomps B., Gougerot-Pocidalo M. A. & Leger C. L., Alpha-tocopherol inhibits the respiratory burst in human monocytes. Attenuation of p47^{phox} membrane translocation and phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 1998, *273 (49)*, 32801-32805.
102. Wagner A. H., Kohler T., Ruckschloss U., Just I. & Hecker M., Improvement of nitric oxide-dependent vasodilatation by HMG-CoA reductase inhibitors through attenuation of endothelial superoxide anion formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2000, *20 (1)*, 61-69.
103. Stephens N., Parsons A., Schofield P., Kelly F., Cheeseman K., Mitchinson M. & Brown M., Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet*, 1996, *347*, 781-786.
104. GISSI-Prevenzione Investigators, Dietary supplementation with n-3 polyunsatured fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione Trial. *Lancet*, 1999, *354*, 447-455.
105. Yussuf S., Dagenais G., Pogue J., Bosch J. & Sleight P., Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The heart outcomes prevention evaluation study investigators. *N. Engl. J. Med.*, 2000, *342 (3)*, 154-160.