

STRESS OXYDANT

INTRODUCTION : le stress oxydant est le résultat d'un déséquilibre entre la balance des oxydants (radicaux libres ou espèces réactives d'oxygène (ERO ou ROS) ou d'azote (ERN ou RNS) et les systèmes de défense (antioxydants), conduisant à des dégâts structuraux et fonctionnels souvent irréversibles pour la cellule. Il est impliqué dans la plupart des pathologies.

I/ Radical libre (RL): c'est une espèce chimique déséquilibrée par la présence d'un électron libre (non apparié) sur la couche externe. Cette propriété rend les radicaux libres aptes à réagir avec différentes molécules (ils sont oxydants, agressifs, réactifs). L'oxygène (O₂) et le monoxyde d'azote (NO) sont des molécules très disponibles au niveau cellulaire, ils subissent des réactions d'oxydation, une certaine concentration est transformée en radicaux libres (par réduction partielle ou oxydation brutale). Les radicaux libres sont produits en permanence en faible quantité par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable mais la production peut devenir excessive et l'organisme doit se protéger par différents systèmes antioxydants.

I/1. Nature des radicaux libres: on distingue 2 types :

A/Espèces Réactives d'Oxygène = dérivés radicalaires de l'oxygène (OH[°], O₂^{°-},,...) + composés non radicalaires fortement oxydant (O₃) et/ou facilement transformés en radicaux (H₂O₂) ainsi que les **radicaux libres issus de l'oxydation des macromolécules** : (RO[°], ROO[°]).

B/Espèces Réactives de l'azote : dérivés radicalaires (NO[°]) ou non radicalaires (NOO⁻).

I/2. Formation des radicaux libres:

A/ Espèces Réactives d'Oxygène (ERO ou ROS) :

→**Dérivés oxygénés radicalaires:**

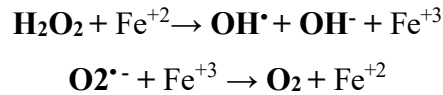
1-Anion super oxyde (O₂⁻): formé essentiellement lors de la respiration mitochondriale et du métabolisme oxydatif (P450) et ce par réduction partielle de l'oxygène (qui reçoit 2 e⁻ au lieu de 4 e⁻).



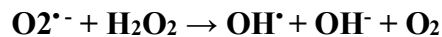
Les anions superoxydes sont réactifs et peuvent diffuser de leur site de production subcellulaire pour arriver à d'autres espaces cellulaires (voire toute la cellule). Ils peuvent réagir avec diverses enzymes, les acides gras (AG) insaturés et les acides nucléiques.

2-Radical hydroxyle (OH[•]): c'est le **plus réactif** des radicaux libres de l'oxygène ce qui explique sa grande toxicité. Il a une diffusion et une demi-vie très faibles mais il interagit instantanément avec les sucres, les acides aminés, les lipides, les phospholipides et les acides nucléiques. Il peut être généré de plusieurs manières par :

a) Réaction de Fenton : décomposition de H₂O₂ en présence de Métaux (M^{+x}) comme Fe⁺²



b) Réaction d'Haber-Weiss : par interaction de H₂O₂ avec l'anion superoxyde O₂^{•-}



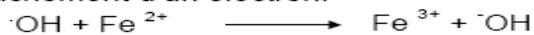
c) Coupure homolytique de H₂O₂ sous l'influence de rayonnements UV

d) Réaction de l'acide hypochloreux avec l'anion superoxyde O₂^{•-}

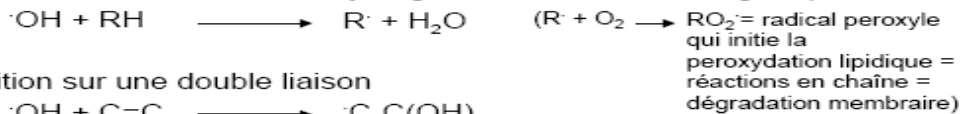
e) Décomposition des ions peroxytrinites (ONOO⁻).

Le radical hydroxyle (OH[•]) peut oxyder un substrat selon 3 modes d'action différents:

1. Arrachement d'un électron:



2. Arrachement d'un atome d'hydrogène sur un substrat organique RH:



3. Addition sur une double liaison



3- Radical alkoxy (RO[•]), Radical peroxyde (ROO[•]) : très réactifs, ils se forment au cours de l'attaque des macromolécules par les RL et du métabolisme des xénobiotiques (CCl₄, paracétamol).

→ **Dérivés oxygénés non radicalaires:**

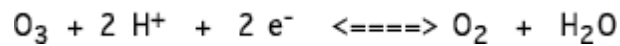
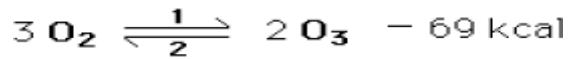
1-Oxygène singulet (¹O₂) : se forme principalement lors des processus physico-chimiques (UVA). Il représente l'état excité de l'oxygène moléculaire (O₂) par l'inversion des spins des e- périphériques (ce qui donne des spins antiparallèles). Il est très instable et extrêmement réactif. Il donne le superoxyde O₂^{•-}

2-Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) : espèce moléculaire (non radicalaire) possédant des propriétés oxydo-réductrices. La principale production de H₂O₂ résulte de la **dismutation de l'O₂^{•-}** par la superoxyde dismutase (SOD) selon la réaction suivante $2 \text{O}_2^{\bullet-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$

Il interagit directement sur les macromolécules ou indirectement (c'est un précurseur des RL, il donne le OH[•] par la réaction de Fenton). Il est peu réactif en l'absence de métaux de transition (Fe⁺² Cu⁺).

Il diffuse rapidement à travers les membranes cellulaires. Il peut être éliminé en O₂ et H₂O par l'action de la catalase.

3-Ozone : sa formation exige un apport important d'énergie à la molécule d'oxygène (O₂), cette énergie est fournie par les **ultra-violet**s ou les **étincelles électriques** (réaction endothermique).

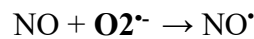


C'est un puissant agent oxydant des chaînes lipidiques, un générateur de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et un précurseur d'aldéhydes.

B/ Espèces réactives d'azote:

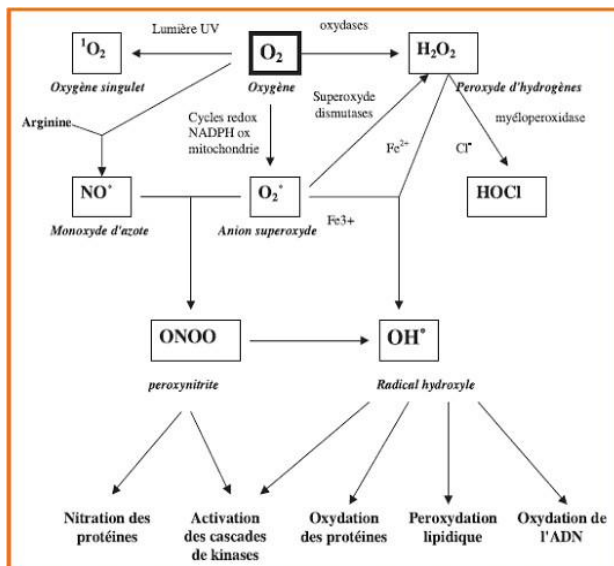
Le monoxyde d'azote est retrouvé à des concentrations élevées surtout dans le cerveau où il est synthétisé par la NO synthase mitochondriale à des fins de médiation. Il joue un rôle dans la coagulation sanguine, la vasodilatation, la neurotransmission, la plasticité neuronale, la signalisation intra et intercellulaire, les mécanismes de défense, l'apoptose et la relaxation des cellules musculaires lisses.

1-radical monoxyde d'azote (NO°) :

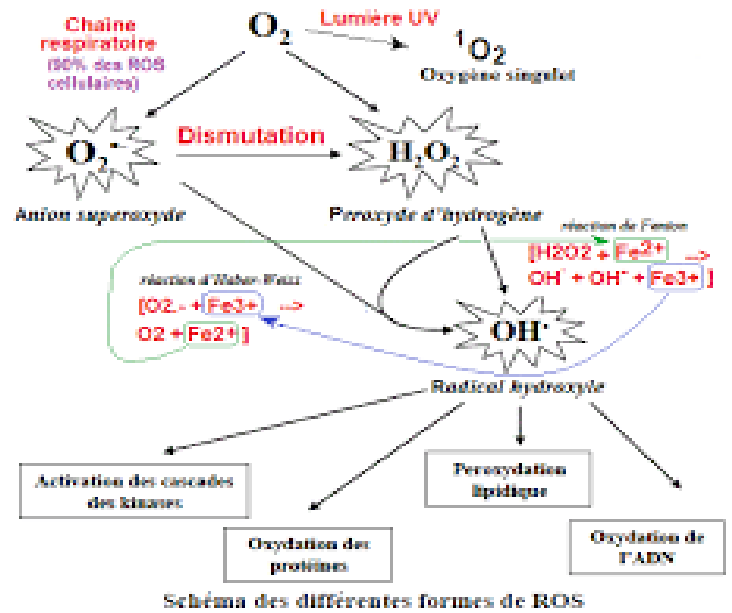


2- Peroxydite (ONOO⁻) : a une action oxydante et donne naissance au OH°

3- Nitroperoxyde (ONOOH)



Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie.



I.3. Sources de production des RL:

a) Sources endogènes:

1-Enzymatiques:

-**Chaîne respiratoire mitochondriale** : la réduction de l'oxygène moléculaire par les cytochromes respiratoires cellulaires s'accompagne d'une production parallèle d'**ion superoxyde $O_2^{\cdot-}$** (environ 2%), d'**eau oxygénée H_2O_2** et de **radicaux hydroxyls OH^{\cdot}** . La production des RL peut s'amplifier lorsque la respiration devient plus intense (effort physique) ou lors d'un désordre mitochondriale d'ordre génétique, inflammatoire ou nutritionnel (carence en ubiquinone).

-**Système microsomal des NADPH cytochrome P450 réductase dans le réticulum endoplasmique:**
+++ **CYP2E1**, l'auto-oxydation du complexe O_2 -cytochrome P450 (Fe^{2+}) libérerait l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$. Certaines substances stimulent la réduction de l'oxygène par les cytochromes P450 (ex. paracétamol qui donne NAPQI).

-Inflammation :

***NAD(P)H oxydase (ubiquitaire)** : au cours de la phagocytose, elle est capable de réduire l' O_2 en $O_2^{\cdot-}$



***NO Synthase (I, II, III, n)** → formation du monoxyde d'azote radicalaire (NO^{\cdot})

***Myeloperoxydase MPO** : à l'intérieur de la vacuole de phagocytose, l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ est dismuté en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 qui à son tour va subir l'action de la **myeloperoxydase** et former de l'acide hypochloreux ($HClO$).

-Autres enzymes:

***Xanthine oxydase**: (catabolisme de l'ATP → formation de $O_2^{\cdot-}$)

***Monoamine oxydase** → formation de H_2O_2

***Enzymes du métabolisme de l'acide arachidonique** : COX

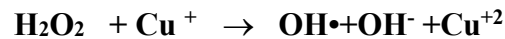
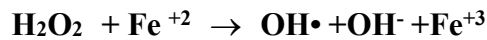
2-Non enzymatiques:

- Métaux de transition : \rightarrow R Fenton, \rightarrow R Haber-Weiss
- Choc ischémique /reperfusion : traitement par l'oxygène dans l'intoxication au monoxyde de carbone.
- Auto-oxydation de l'adrénaline, dopamine, flavines, hydroquinone, hémoglobine $\rightarrow O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , OH^{\cdot} .

b) Sources exogènes :

1- Agents chimiques :

-**Métaux toxiques** : le Cuivre et le Fer **libres** génèrent des radicaux hydroxyles **OH•**, très réactifs, à partir de l' H_2O_2 , par la réaction de Fenton.



Arsenic : Production de H_2O_2 lors de l'oxydation de l' As^{3+} en As^{5+}

Plomb, cadmium,.....

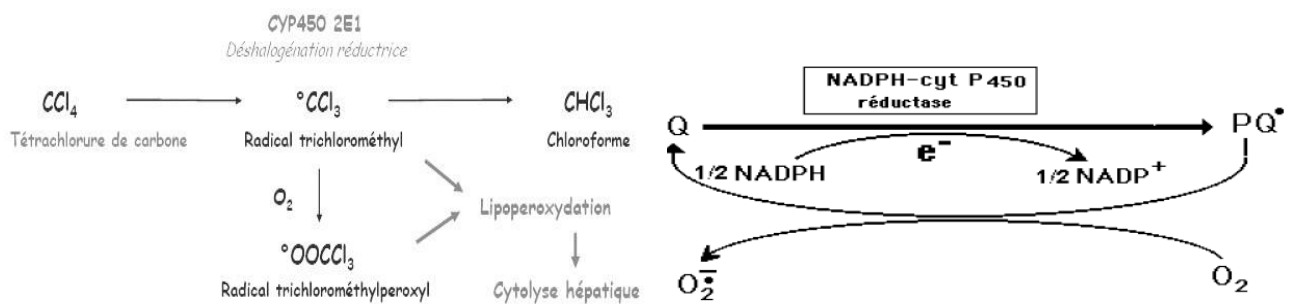
-**Particules inhalées** : Amiante, Silice, sont des sources de RL par la phagocytose exacerbée qu'elles déclenchent et car elles sont recouvertes de sels de Fer en surface.

-**Ethanol, tabac, drogues,...**

-**Médicaments** : paracétamol, barbituriques,...

-**Pesticides** : paraquat

-**Solvants** : tétrachlorure de carbone



2- Agents physiques :

-**Radiations ionisantes (RI)** : la radiolyse de l'eau cellulaire conduit à la génération de **OH•** qui est responsable de 65% des effets des RI.

-**Rayonnements U.V** : Formation de l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) sous l'action d'un rayonnement UVA.

3- Agents microbiologiques.

I.3. Actions des ERO :

a) Rôle physiologique :

- Seconds messagers et régulateurs des processus physiologiques moléculaires, cellulaires et tissulaires
- Transduction de signaux cellulaires, régulation des gènes, modulation du métabolisme cellulaire (interaction [ligand/R],...), développement embryonnaire, croissance, prolifération, différenciation et survie cellulaire, défense antibactérienne par cytotoxicité des agents pathogènes
- Destruction par apoptose des cellules tumorales.

b) **Actions toxiques** : oxydation des macromolécules

1-Dommages oxydatifs protéiques:

***Cibles** : AA soufrés + AA aromatiques, peptides, protéines (les protéines les plus sensibles sont celles qui ont un groupement sulfhydryle (SH)).

***Action** :

- Directe : formation de métabolites primaires : RO[•] et ROO[•] de la chaîne peptidique et latérale.
- Indirecte : formation de métabolites secondaires par glycation (formation de groupements carbonyles)

***Conséquences** :

- Changements structuraux majeurs (réticulation, fragmentation,...)
- Modification des propriétés des protéines (protéines oxydées plus thermolabiles)
- Altération du fonctionnement cellulaire par altération des enzymes (y compris les E anti oxydantes)
- Perte de spécificité [ligand-R]
- Dénaturation des épitopes (Ag)
- Perturbation métabolique.
- Formation de **Produits de Glycation Avancée (PGA** ou Advanced Glycation End-products **AGE)**
- Etat pro-inflammatoire
- Échappement des protéines à la dégradation : accumulation tissulaire (amas).

2-Dommages oxydatifs lipidiques : peroxydation en chaîne

***Cibles** : constituants membranaires (Acides gras polyinsaturés AGPI), lipides circulants (lipoprotéines (HDL, LDL,...), cholestérol libre non estérifié, ...).

***Étapes de la peroxydation lipidique** : Initiation, Propagation et Terminaison

***Produits formés** : de nombreux métabolites réactifs sont issus de la peroxydation lipidique : hydroperoxydes (ROOH) instables, diènes conjugués, aldéhydes, alcanes, dont la plupart sont cytotoxique, athérogènes (Dépôts de lipides oxydés dans les vaisseaux ou les tissu âgés) et mutagènes.

Métabolites I: ROO[•], ROOH, RO[•]

Métabolites II: qui sont les aldéhydes. Les principaux aldéhydes formés sont :

- ***4-hydroxynonéнал (4-HNE) : le plus génotoxique***
- ***Malonedialdéhyde(MDA) : mutagène et atherogène***

***Conséquences de la peroxydation lipidique :** Action additionnelle des métabolites I+ II. La formation de dérivés d'oxydation dans les bicouches lipidiques, plus hydrophiles, entraîne :

- Perte d'AG polyinsaturés (de lipoprotéines ou de la membrane cellulaire).
- Diminution de la fluidité membranaire.
- Altération du fonctionnement des membranes (transport ionique, perméabilité).
- Effets sur les enzymes et récepteurs associés aux membranes.
- Libération de matériel à partir de compartiments sub-cellulaires

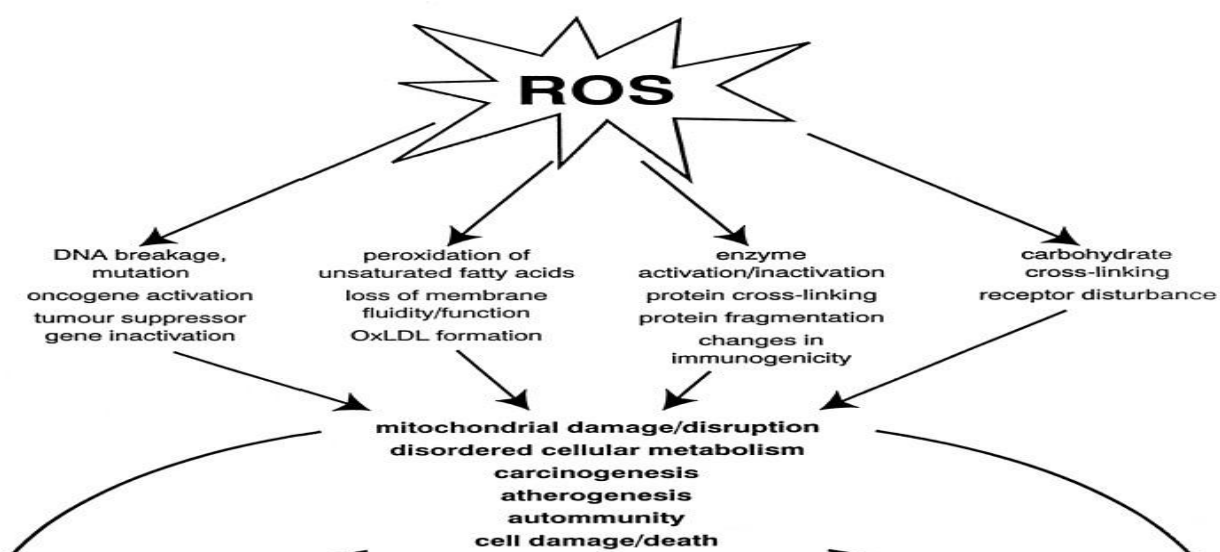
La transmission en chaîne de la réaction de peroxydation lipidique est stoppée par la vitamine E intercalée dans la bicouche lipidique des membranes.

3-Dommages oxydatifs de l'ADN

***Cibles :** ADN mitochondrial et ADN nucléaire. Le H_2O_2 et $O_2^{\cdot-}$ ne sont pas assez réactifs pour altérer directement l'ADN mais ils peuvent tous les deux générer le radical OH^{\cdot} capable de le faire.

***Conséquences:** La réaction de OH^{\cdot} avec l'ADN est susceptible de conduire à:

- Formation d'adduits à l'AND
- Oxydation des bases et des résidus des sucres
- Cassures de chaîne par arrachement d'un atome d'hydrogène du 2-désoxyribose (simple, double brins).
- Pontages ADN-protéines dans les nucléoprotéines.
- Formation de sites abasiques, oxydation et modification des bases, mutations.
- Altération mitochondriale
- Si les systèmes de réparations sont dépassés → **mutation ponctuelle** ou **apoptose**.



II. Antioxydants :

I.1. Définition : toute substance capable, même à faible concentration, d'inhiber l'oxydation d'un substrat, ces antioxydants assurent la neutralisation d'un oxydant (RL) par effet réducteur (ils donnent leur e-). L'action antioxydante consiste à :

1-Empêcher la formation des RL et ROS.

2-Elimination des RL et les catalyseurs de leur formation

3-Augmentation de l'activité des systèmes de réparations cellulaires et tissulaires et d'élimination des molécules endommagées.

II.2. Organisation du système antioxydant :

Il existe deux systèmes de défense anti oxydante enzymatique et non enzymatique:

a) **Système enzymatique:** 1^{ière} ligne de défense, les principaux représentants : SOD, GPx, GR, Catalase

❖ **Superoxyde Dismutase (SOD) :** Métalloenzyme, ubiquitaire (présente dans toutes les cellules)

03 isoenzymes : CuZn- SOD1(cytosolique), Mn-SOD2(mitochondriale), CuZn-SOD3 (extracellulaire)

Elle est capable d'éliminer l'anion superoxyde $O_2^{\circ-}$ par une réaction de dismutation



Conséquence : ↓ disponibilité $O_2^{\circ-}$ avec limitation de la cascade radicalaire (OH° , $ONOO^\circ$) et le H_2O_2 sera pris en charge par une enzyme de relais (catalase).

❖ **Catalase :** Enzyme héminique, ubiquitaire (foie, GR ++) et localisation subcellulaire (peroxysomes)

Chaque unité porte une molécule d'hème (Fe^{+3}) et une molécule de NADPH. Elle catalyse la réaction de dismutation de H_2O_2 qui se fait en deux étapes

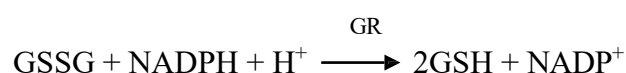
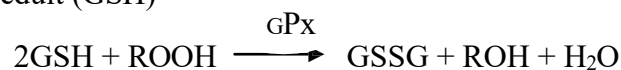


❖ **Système Glutathion peroxydase / glutathion réductase (GPx / GR) :**

- Sont des sélénoprotéines (enzyme à sélénium), il existe 07 isoformes.

- C'est la voie majeure de dégradation des hydroperoxydes ($ROOH$, H_2O_2) : Dans le foie, elle participe pour 70% à la réduction des peroxydes organiques et à plus de 94% de H_2O_2

- Co-facteur = Glutathion réduit (GSH)



❖ Thiorédoxines peroxydases (Trx) (peroxyrédoxines) :

- Sélénoenzymes, NADPH dépendante
- Substrats : H₂O₂, ROOH, ONOO⁻



- L'efficacité catalytique de Trx est inférieure à celle de GPx et de la catalase mais la Trx joue un rôle majeur dans l'élimination des ROOH (car sa quantité est ↑↑ + large distribution cellulaire).

❖ Diaphorase, glutathione S-transferase,....

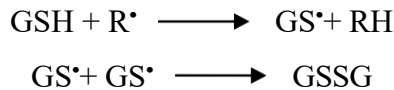
b) **Système non enzymatique :**

Glutathion : tripeptide naturel riche en groupements thiol (-SH): L-γ-glutamyl + L-cystéinyl+ glycine. La forme réduite (GSH) constitue 90% du glutathion total. C'est une molécule hydrosoluble (cytoplasme, noyau, mitochondries) possédant des propriétés réductrices (anti oxydant).

-Co-facteur de nombreuses enzymes anti oxydantes comme la (GPx)

-Réduction des protéines oxydées, élimination des ROS (OH[•], ¹O₂, ...) par interaction directe -
L'interaction GSH —4-HNE : formation d'adduits non toxiques.

-Conjugaison aux espèces électrophiles (NAPQI)



Vitamines :

Vitamine E : (Tocophérols + Tocotriénols). L'α-tocophérol est la forme la + active et la mieux absorbée. Elle a une capacité d'insertion dans les membranes donc *Antioxydant majeur des structures lipidiques*. Elle capte les ERO dans les membranes par déplacement (mouvement de navette). Autres actions : neutralisation de ¹O₂.

Vitamine C : Acide ascorbique (AscH₂). C'est un agent réducteur et chélateur, elle s'oxyde en acide déhydro-L ascorbique (DHA). Ses actions sont :

-Interaction directe avec les radicaux O₂^{•-}, OH[•] et ¹O₂

-Élimination du H₂O₂

-Régénère la vitamine E active, avec formation concomitante d'un radical ascorbyl peu réactif

L'AscH₂ est maintenu sous forme réduite par la déshydroascorbate réductase dont le cofacteur = glutathion

Vitamines E + C = piègeurs stœchiométriques (neutralisent un seul radical par molécule).

Provitamine A (caroténoïdes) : Chef de fil : β -carotène = précurseur de la vitamine A et réagit avec les ERO : ROO° , OH° et $\text{O}_2^{\circ-}$ (réactions d'addition ou arrachement d'H) et $^1\text{O}_2$
Interruption du processus de la peroxydation lipidique

Autres vitamines:

-**Flavonoïdes (vitamine P)** : Interaction avec ROO° et chélateurs des métaux de transition

-**Coenzyme Q₁₀** : c'est une vitamine-like liposoluble. Neutralisation $\text{O}_2^{\circ-}$, OH° , ROO° , RO° et régénération de la vitamine E.

Oligo-éléments :

-Cofacteurs de systèmes enzymatiques. L'activité des enzymes anti oxydantes dépend de l'apport en oligo-éléments par l'alimentation.

Sélénium : Co-facteur GPx, Trx ($\downarrow [\text{Se}] \longrightarrow$ facteur limitant synthèse sélénoenzymes). C'est un médiateur de la voie de signalisation cellulaire (stimulation de P53)

Zinc : Co-facteur SOD1, SOD3. Induction synthèse des metalthioneines (MT), inhibe partiellement les réactions de formation d'ERO induites par le cuivre (Fenton).

Protéines transporteuses (-SH):

-Séquestration de métaux susceptibles de produire des ERO

-Protéines fixatrices de métaux : MT, transferrine, lactoferrine, ferritine, céruloplasmine, albumine

-Protéines liant l'hème libre + protéines héminiques: haptoglobine + hémopexine

III. Evaluation du stress oxydant :

Analyse : sang, urines.

Dosage :

Bilan prooxydant : MDA, 4-HNE, 8OHG, protéines carbonylées,.....

Bilan antioxydant : vitamine C, vitamine E, GSH, SOD, catalase, zinc, sélénium,

Activité anti oxydante totale : ORAC

Bilan martial : fer sérique, ferritine, transferrine

Autres : cuivre, électron spin pair (par résonance magnétique),.....

,