1. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif se défini comme un déséquilibre de la balance entre le niveau de la production d'ERO et les capacités antioxydantes de la cellule. **(Sajous et *al*, 2008).**

Le stress oxydant représente l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression des espèces oxygénées réactives, en raison de l'existence d'un déséquilibre entre la production de ces substances et la capacité de défense des antioxydants. **(Cristelle, 2006)**.

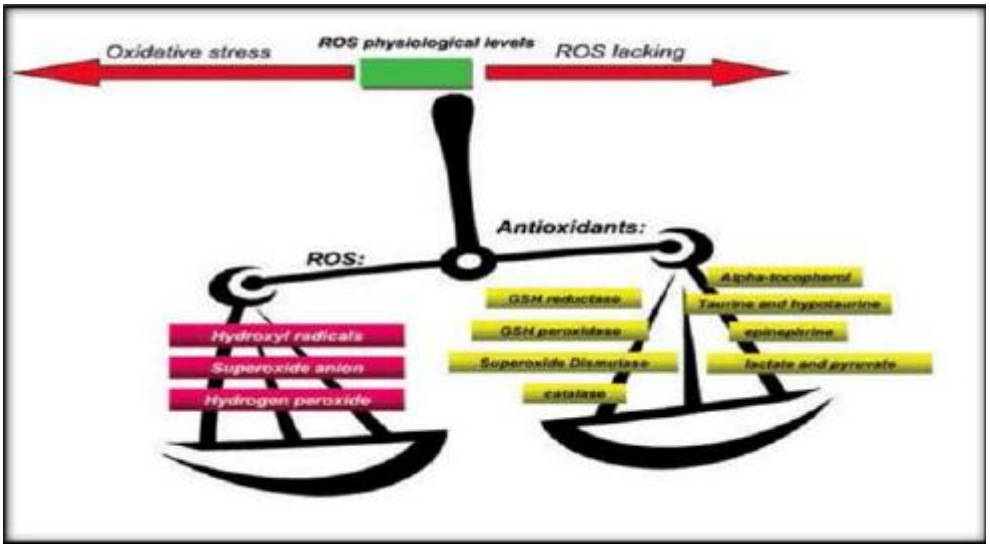


Figure 06 : Balance entre les pro-oxydants et les antioxydants **(Fontaine, 2007).**

2. Les radicaux libres

Molécules instables, chimiquement caractérisées par la présence d'un électron libre (célibataire), qui leur confère une très grande réactivité vis-à-vis de nombreux substrats biologiques. **(Jacques, 2009).**

3. Origine des ERO

3.1. Endogène

L'anion superoxyde ($O_2°$-) et le radical hydroxyle (°OH) sont des radicaux libres puisqu'ils contiennent chacun un électron célibataire ; à l'inverse le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) n'est pas radicalaire, mais tous trois sont des « espèces réactives de l'oxygène » (ERO), dans le sens où elles peuvent interagir avec des molécules biologiques en les oxydant.

Le radical superoxyde est peu réactif par lui-même mais il peut donner naissance à des composés plus réactifs, notamment le radical hydroxyle sous l'action des superoxyde-dismutases (SOD) **(Bruno, 2006).**

Les sources de l'anion superoxyde sont multiples : de nombreuses enzymes catalysent la réduction du dioxygène en $O_2°^-$ comme :

- La NADPH-oxydase, enzyme jouant un rôle clef dans la phagocytose par la production de H_2O_2 et HOCl.
- La xanthine-oxydase qui est activée au cours de la réperfusion après ischémie.
- L'activité mono-oxygénase du cytochrome P450 dans la membrane du réticulum endoplasmique. Aussi la NADH-déshydrogénase du transport électronique dans la membrane interne mitochondriale, et l'hème de l'hémoglobine et de la myoglobine oxydant le Fe_2^+ en Fe_3^+ pour donner les formes oxydées méthémoglobine **(Bruno, 2006).**

L'inflammation est par ailleurs une source importante de radicaux oxygénés produits directement par les cellules phagocytaires activées qui sont le siège d'un phénomène appelé explosion oxydative consistant en l'activation du complexe de la NADPH oxydase **(Favier, 2003).**

3.2. Exogène

Les métaux toxiques (chrome, cuivre, vanadium), génèrent des radicaux hydroxyles, très réactifs. Les particules inhalées (amiante, silice) sont aussi des sources de radicaux libres, d'une part parce qu'elles exacerbent la phagocytose, d'autre part parce que leur surface est tapissée de sels de fer. Les rayonnements sont capables de générer des radicaux libres, soit en scindant la molécule d'eau lorsqu'il s'agit des rayons ionisants X ou γ, soit en activant des molécules photo-sensibilisantes lorsqu'il s'agit des rayons ultra-violets qui vont par ce mécanisme produire des anions superoxydes et de l'oxygène singulet. **(Favier, 2003).**

Tableau 02 : Sources des ROS. **(Durachova et *al*, 2008).**

Source endogens	Source exogène
NADPH Oxydases	Tabagisme
Chaine respiratoire mitochondrial	Cytokine pro- inflammatoire
Xanthine Oxydase	Chimiothérapie
Atherogénèse	Radiation ionisantes
Lipo-Oxygénase	Radiation UV
Phagocytes	Toxique enviromementaux
Inflammation	Champs électriques
Etat d'ishémie –reperfusion	Xénobiotique pro –oxydant

4. Les types des radicaux libres

4.1. Les espèces réactives de l'oxygène ERO

La molécule de dioxygène est en réalité biradicalaire. Elle possède deux électrons célibataires sur des orbitales différentes. Le dioxygène est susceptible de récupérer quatre électrons, mais ses capacités oxydantes sont limitées par une barrière cinétique importante. En présence de rayonnements, de métaux ou d'enzyme, il est capable de capter un électron pour donner le radical superoxyde $O_2^{\circ -}$, qui un radical modérément réactif. **(Barouki, 2006).** Le radical hydroxyle est principalement produit par la réaction de Fenton ou celle de Haber-Weiss. Une autre espèce activée de l'oxygène est l'oxygène singulet. L'oxygène singulet ($^1O_2$) correspond à un état excité de l'oxygène moléculaire. **(Vamecq et *al*, 2004).** Aussi il y a le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle.

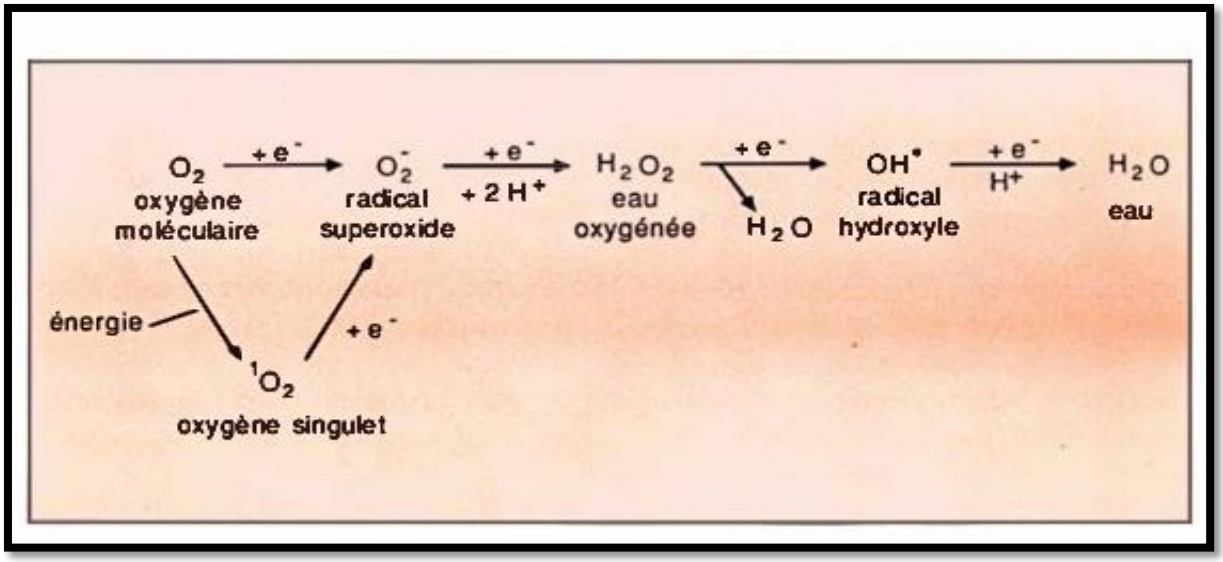


Figure 07 : les divers radicaux libres dérivés de l'oxygène. **(Borel et *al*, 1988).**

4.1.1. Le radical superoxyde ($O_2°^-$)

Dans l'organisme une partie de l'oxygène moléculaire, peut capter de manière univalente et séquentielle un électron conduisant alors la formation du chef de file des espèces oxygénées réactives : l'anion superoxyde. **(Cristelle, 2006).**

$$(O_2 + 1e^- \longrightarrow O_2°–)$$

Ce sont donc des espèces dont la durée de vie est relativement longue (jusqu'à quelques dizaines de secondes) et qui peuvent diffuser bien au-delà de leur lieu de production pour atteindre leur cible. **(Gardés-Albert et *al*, 2003).** Il existe une production faible mais régulière d'$O_2°^-$ dans la mitochondrie. Il est formé par « fuite » d'électrons à partir de la chaîne des transporteurs d'électrons, au niveau de la NADH déshydrogénase, de l'intersection ubiquinone cytochrome b, du cytochrome oxydase. **(Depy-Dupont et *al*, 2001).**

L'activation de la NADPH oxydase est responsable de la production d'une grande quantité d'anion superoxyde ($O_2°^-$). **(Bargnoux et *al*, 2009).**

Sa dismutation activée par les enzymes superoxyde dismutases, forme de l'eau oxygénée. **(Borel et *al*, 1998).**

$$2O_2°^- + 2H^+ \longrightarrow O_2 + H_2O_2$$

4.1.2. Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

Il peut diffuser et réagir avec des molécules à distance ou être utilisé par d'autres enzymes, notamment la myéloperoxydase des neutrophiles qui le transforme en composé oxydant, l'acide hypochloreux (HOCl, non radicalaire). **(Depy-Dupont et *al,* 2001).**

H_2O_2 est aussi à l'origine du radical hydroxyle (°OH) s'il y a dans le milieu, des ions métalliques (comme le fer Fe2+ complexé par un ligand activateur) : cette réaction est connue sous le nom de « réaction de Fenton ». **(Depy-Dupont et *al,* 2001).**

Les catalases transforment H_2O_2 en eau et en oxygène, alors que les GPxs couplent la réduction du peroxyde d'hydrogène à l'oxydation du glutathion réduit (GSH). **(Sajous et *al,* 2008).**

$$\mathbf{2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2}$$

4.1.3. Le radical hydroxyle (OH°)

OH° est un agent d'oxydation (hydroxylation des cycles aromatiques notamment), mais son action est limitée par sa très courte durée de vie. **(Depy-Dupont et *al,* 2001).**

Les radicaux hydroxyles sont connus pour modifier les bases puriques ou pyrimidiques, oxyder les acides gras contenant plusieurs doubles liaisons, comme l'acide arachidonique. **(Borel et *al,* 1998).** Le radical hydroxyle est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons des acides gras poly -insaturés. **(Haleng et *al,* 2007).**

Les radicaux hydroxyles attaquent tous les matériaux biologiques (ADN, protéines, lipides…). Ce sont des oxydants puissants qui réagissent selon trois modes d'action : soit en arrachant un électron, soit en arrachant un atome d'hydrogène (d'un substrat organique RH), soit encore en s'additionnant sur les doubles liaisons. **(Gardés-Albert et *al,* 2003).**

$$\mathbf{{}^{\circ}OH + Fe2+ \longrightarrow Fe3+ + {}^{\circ}OH}$$
$$\mathbf{{}^{\circ}OH + RH \longrightarrow R^{\circ} + H2O}$$
$$\mathbf{{}^{\circ}OH + >C=C< \longrightarrow >\cdot C\text{-}C(OH)^{-}}$$

4.2. Les espèces réactives nitrogènes ERN

4.2.1. Le monoxyde d'azote (NO°)

Le monoxyde d'azote radicalaire ou NO° est un composé important; il est notamment synthétisé par les cellules endothéliales via l'action de NO synthétases sur la L-arginine.

Le NO° peut former avec l'anion superoxyde le peroxynitrite (OONO), un oxydant puissant et diffusible, capable d'endommager de nombreuses molécules organiques. **(Haleng et *al*, 2007)**.

4.2.2. Peroxinitrite ($ONOO^-$)

Le peroxynitrite, est un oxydant biologique puissant formé par la réaction de deux radicaux libres, le superoxyde et le monoxyde d'azote. **(Liaudet, 2007).** Instable, est très oxydant et forme de nouvelles espèces actives, dont certaines sont radicalaires (°OH et $NO°_2$), à la base de nitrations et d'hydroxylations. **(Depy-Dupont et *al*, 2001).**

$$NO° + O_2^{\circ -} \longrightarrow ONOO^-$$

5. Les cibles biologiques des ERO

5.1. L'acide désoxyribonucléique

L'ADN, qu'il soit nucléaire ou mitochondrial, est également une cible majeure des ERO. **(Cristelle, 2006).** Les lésions de l'ADN peuvent survenir de manière indirecte, par l'intermédiaire de la peroxydation lipidique générant des aldéhydes α-insaturées, ou encore par l'attaque radicalaire des protéines entraînant des pontages ADN. Protéines ou des adduits sur des bases de type lysinguanine. **(Sajous et *al*, 2008).**

Il existe au moins cinq classes de dommages oxydatifs de l'ADN : les bases oxydées, les sites abasiques (consécutifs à une rupture de la liaison entre le désoxyribose et la base), les pontages intra-brins, les cassures de brins (consécutive à une attaque du désoxyribose) et les pontages ADN-protéines. **(Sajous et *al*, 2008).**

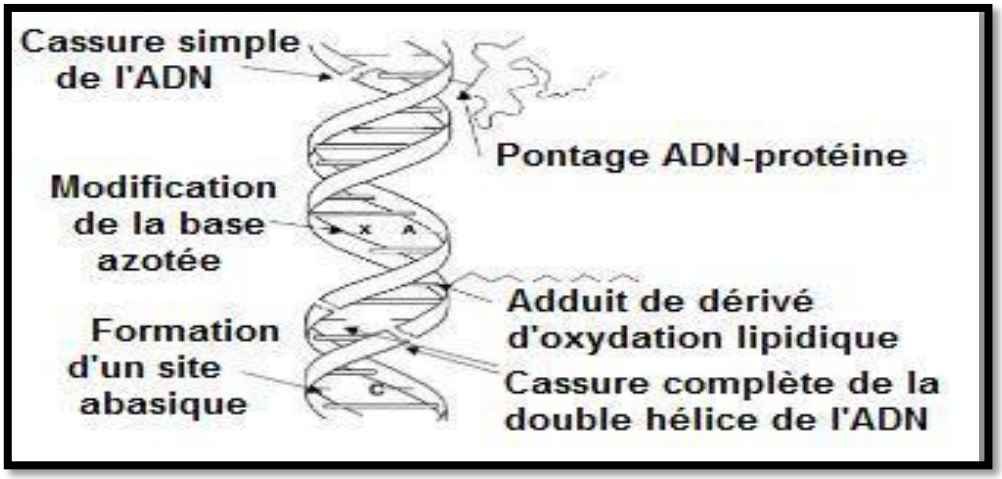


Figure 08: Altérations de l'ADN entraînées par un stress oxydant. **(Favier, 2003).**

5.2. Les protéines

Les protéines peuvent être modifiées directement par ces espèces réactives de l'oxygène conduisant ainsi à l'oxydation des acides aminés. Par exemple, les acides aminés possédant une fonction thiol (cystéine, méthionine) vont donner des sulfoxydes et pouvoir former des ponts disulfures. L'oxydation directe des acides aminés peut également générer des composés carbonylés. **(Bargnoux et *al*, 2009).**

Les ERO sont capables de couper des liaisons peptidiques et de former ainsi des fragments protéiques. Par ailleurs, le radical OH°, mais aussi l'anion superoxyde O2°⁻, s'attaquent également aux protéines des tissus de soutien, comme le collagène du tissu conjonctif. Les protéines oxydées perdent leur capacité à se fixer correctement sur un récepteur ou à fixer spécifiquement un ligand, altérant la signalisation cellulaire. **(Cristelle, 2006).**

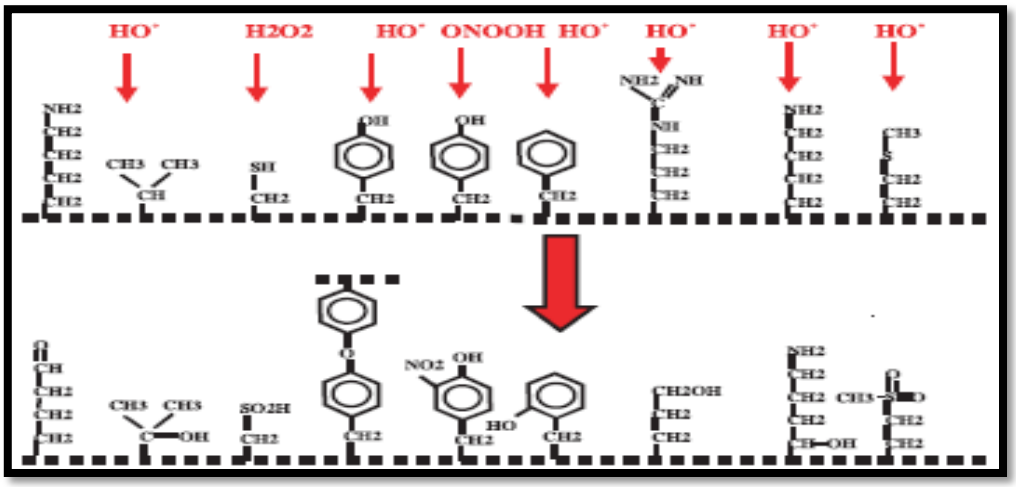


Figure 09 : Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire **(Favier, 2003)**.

5.3. Les lipides (peroxydation lipidique)

La peroxydation lipidique est un phénomène général qui se produit dès la présence de l'oxygène **(Cillard et cillard, 2006)**, il a été définie par l'oxydation des lipides polyinsaturés en présence d'oxygène **(Micheal et *al,* 2008)**. L'oxydation des lipides concerne essentiellement les acides gras polyinsaturés (AGPI), acide linoléique, linolénique et arachidonique **(Bruno, 2006).**

Ce processus se décompose en trois étapes : l'initiation, la propagation et la terminaison.

- **Initiation :**

La phase d'initiation est due à l'attaque d'une espèce radicalaire (radicaux hydroxyles, alcoxyles, peroxyles, l'oxygène singulet ou le peroxynitrite) suffisamment réactive pour arracher un hydrogène du groupement méthylène bis-allylique situé en α d'une double liaison (hydrogène le plus labile) d'un acide gras polyinsaturé pour former un radical pentadiényl (radical centré sur l'atome de carbone ; -$^{\bullet}$CH- ou L$^{\bullet}$). **(Micheal et *al,* 2008).**

L'arrachement du proton est facilité tant par la chaleur (agitation moléculaire) que les rayonnements ou les catalyseurs (métaux tels que Cu, Fe, Co, Mn, Ni…). **(Marc et *al,* 2004).**

- **Propagation :**

Ce radical se stabilise par réarrangement intramoléculaire en formant un diène conjugué capable de réagir facilement avec l'oxygène pour donner un radical peroxyle, Ce dernier peut à son tour arracher un hydrogène d'une autre molécule d'acide gras adjacente, créant ainsi une réaction en chaîne (propagation). La combinaison du radical peroxyle avec l'atome d'hydrogène conduit à la formation d'un hydroperoxyde lipidique qui, sous l'action des métaux (Fe^{2+} ou Cu^{+}), formera des radicaux alkoxyles et hydroxyles. **(Micheal et *al,* 2008).**

- **Terminaison :**

Enfin, des phases terminales de dégradation conduiront à des aldéhydes, parmi lesquels on peut citer le dialdéhyde malonique (ou Malondialdéhyde ou MDA). **(Micheal et *al,* 2008).** Qui est un aldéhyde actif principal de la peroxydation de l'acide gras polyinsaturé. **(Grara et *al,* 2012).**

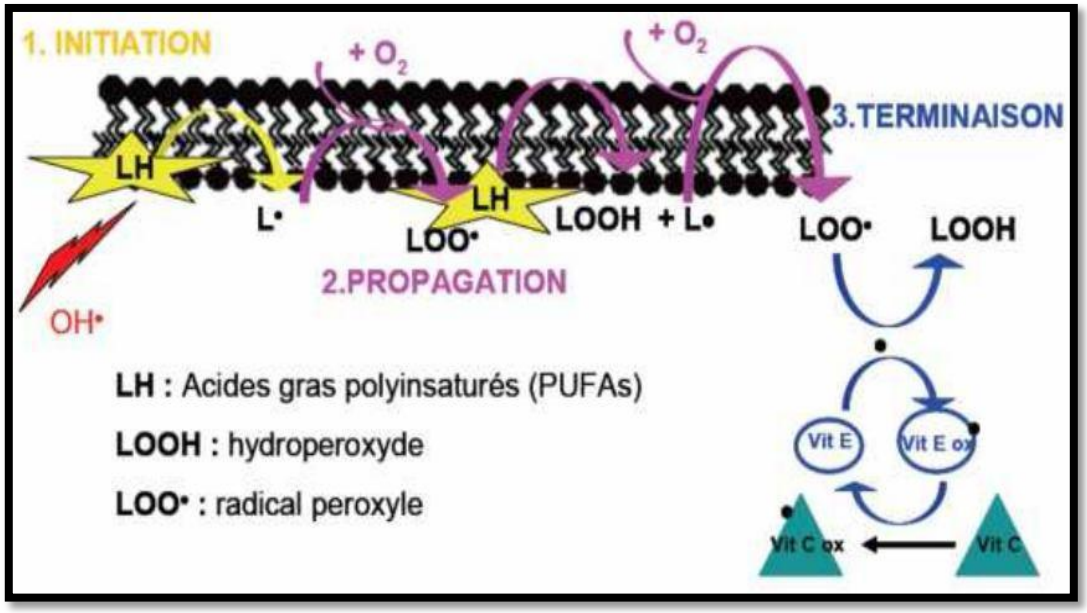


Figure 10 : Réaction de la peroxydation lipidique. **(Niedernhofer et al, 2003)**.

6. Le système de défense antioxydant

6.1. Définition

Le système de défense antioxydant est présent chez toutes les cellules aérobies, et neutralise les réactions chimiques intermédiaires produites par voie endogène et/ou le métabolisme des xénobiotiques **(Grara et *al*, 2012)**.

6.2. Le système de défense antioxydant enzymatique

6.2.1. Les superoxydes dismutase (SOD)

Ces métalloprotéines, qui représentent une des premières lignes de défense contre le stress oxydant, assurent l'élimination de l'anion super-oxyde $O_2^{\circ -}$ par une réaction de dismutation, en le transformant en peroxyde d'hydrogène et en oxygène. **(Haleng et *al*, 2007).** La mitochondrie possède un superoxyde dismutase à manganèse (Mn–SOD), rapidement inductible, capable de neutraliser O2°⁻. **(Depy-Dupont et *al*, 2001).**

Les SOD à cuivre-zinc (Cu, Zn-SOD) ou à manganèse (Mn-SOD) catalysent la disparition du radical superoxyde par dismutation, ce qui aboutit à la formation de peroxyde d'hydrogène. **(Sajous et *al*, 2008).**

$$2O^{\circ -}_2 + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

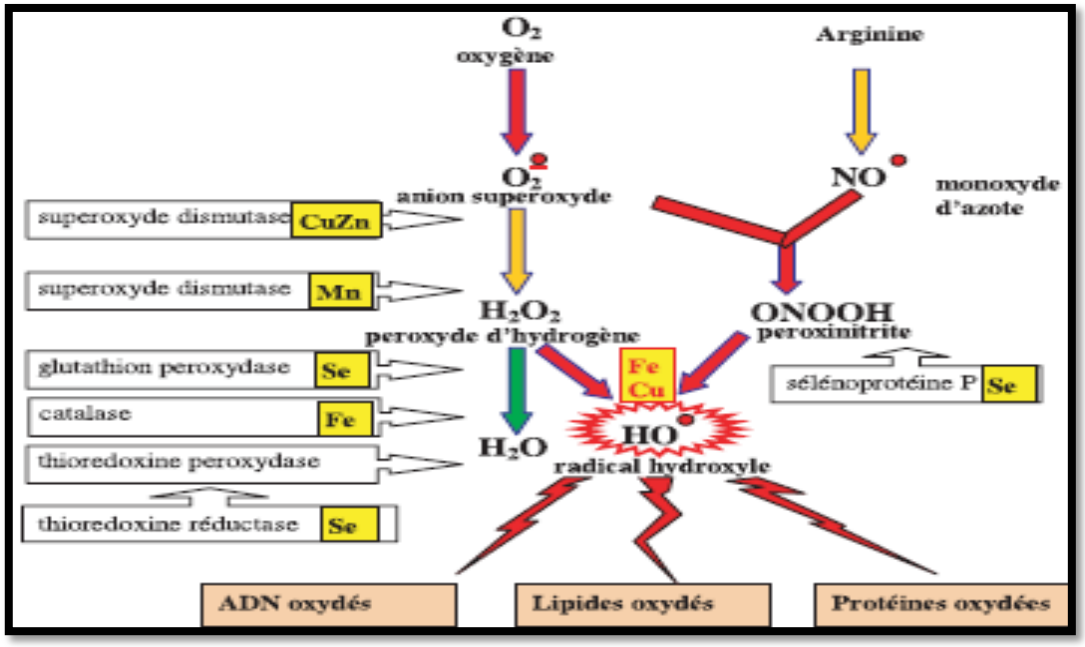


Figure 11 : Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants de leurs cofacteurs métalliques **(Favier, 2003)**.

6.2.2. La glutathion peroxydase (GPx)

La GPx est une sélénoprotéine (cinq isoformes) qui réduit les peroxydes aux dépens de son substrat spécifique, le glutathion réduit (GSH). **(Haleng et *al*, 2007).**

Son rôle principal consiste en l'élimination des peroxydes lipidiques résultant de l'action du stress oxydant sur les acides gras polyinsaturés. La GPx est effondrée en cas de déficit majeur en sélénium, elle est donc un bon reflet de cette carence. **(Haleng et *al*, 2007).**

$$2GSH_{(réduit)} + H_2O_2 \longrightarrow GSSG_{(oxydé)} + 2H_2O$$
$$2GSH_{(réduit)} + ROOH \longrightarrow GSSG_{(oxydé)} + ROH + H_2O$$

6.2.3. La catalase (CAT)

La catalase joue un rôle important dans la protection de l'organisme contre les dommages du stress oxydant. **(Grara et *al*, 2012).** La catalase est localisée dans les peroxysomes et les hématies ; c'est une enzyme tétramérique et héminique capable d'éliminer H_2O_2 *in situ.* **(Bruno, 2006).**

Elle consiste en une transformation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et en oxygène moléculaire d'oxygène. **(Grara et *al*, 2012).**

$$2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O+O_2$$

6.3. Le système de défense antioxydant non enzymatique

6.3.1. Glutathion(GSH)

Le glutathion est un tripeptide (acide glutamique-cystéine-glycine) **(Haleng et *al*, 2007).** Le GSH est également le plus important des systèmes non enzymatiques endogène, sa fonction thiol lui confère un rôle de réducteur (donneur d'électron ou d'atome H), vis-à-vis de certain ERO. **(Sajous et *al*, 2008).** C'est un composé réducteur soufré le plus abondant chez le compartiment intracellulaire, impliqué dans le métabolisme, les procédés de transport et dans la protection des cellules contre les effets toxiques des composés endogène et exogène. **(Grara et *al*, 2012).**

Dans des conditions physiologiques, sa forme oxydée (GSSG) est en concentration très faible. Le rapport GSH/GSSG est considéré comme un excellent marqueur de la peroxydation lipidique et permet d'objectiver l'importance du stress. **(Haleng et *al*, 2007).**

Outre son rôle essentiel d'agent réducteur, le glutathion intervient également à un second niveau dans la défense anti-radicalaire par son implication dans les réactions de détoxication catalysées par la glutathion-S-transférase. **(Grara et *al*, 2012).**

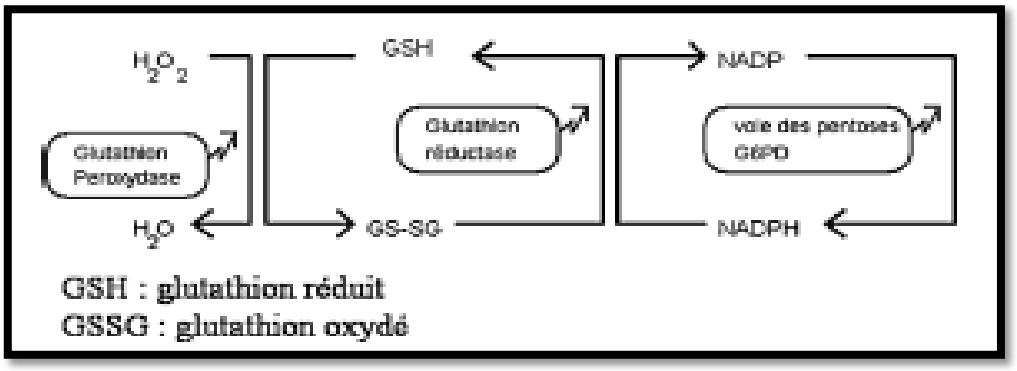


Figure 12: Métabolisme de glutathion **(Mégarbane B, 2008).**

6.3.2. La vitamine C

La vitamine C, ou acide ascorbique, est un composant essentiel de l'alimentation humaine. La vitamine C est une vitamine hydrosoluble que l'on trouve particulièrement dans les fruits et les légumes mais aussi dans les abats. Elle est essentielle dans de nombreuses fonctions du corps. Les effets bénéfiques d'une supplémentation en vitamine C résulteraient de l'élimination des radicaux libres, et diminution de la peroxydation **(Faure et *al*, 2011).**
Elle inhibe également la peroxydation lipidique en régénérant la vitamine E à partir de la forme radicalaire issue de sa réaction avec des radicaux lipidiques **(Haleng et *al*, 2007).**

6.3.3. Le coenzyme Q

Le coenzyme Q, appelé ubiquinone en raison de son ubiquité dans les cellules, est un dérivé benzoquinolique avec une longue chaîne latérale isoprénique. Cette chaîne latérale confère à la molécule un caractère lipophile qui lui permet de s'insérer dans les membranes et les lipoprotéines. Il joue un rôle essentiel dans la chaîne mitochondriale de transport d'électrons et est un puissant inhibiteur de peroxydation lipidique, en synergie avec la vitamine E. **(Haleng et *al*, 2007).**

6.3.4. La vitamine E (α- tocophérol)

Ce terme désigne un ensemble d'isomères, les tocophérols (constitués d'un noyau chromanol et d'une chaîne latérale saturée à 16 atomes de carbone) et les tocotriénols (qui diffèrent des tocols par la présence de 3 doubles liaisons sur cette chaîne latérale) **(Haleng et *al*, 2007).**

Contenue surtout dans les huiles végétales, se combines avec certains radicaux libres pour former des radicaux tocophéryls stables **(Céline, 2011)**. Liposoluble, elle s'insère au sein des membranes cellulaires ou elle empêche la propagation des phénomènes de lipoperoxidation **(Jacques, 2009).**

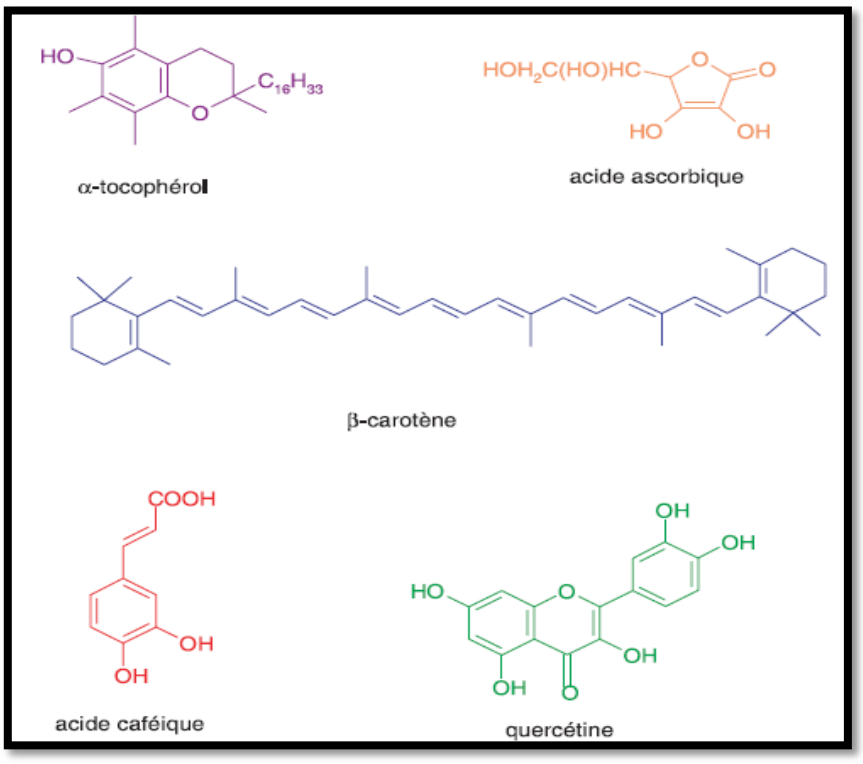


Figure 13: Antioxydants d'origine non enzymatique **(Gardès-Albert et *al*, 2003).**

6.3.5. Les caroténoïdes

Plus de 600 caroténoïdes différents ont été isolés à partir de sources naturelles, mais seul un petit nombre d'entre eux se retrouvent dans le sang et les tissus animaux. Les fruits et les légumes en sont les principales sources alimentaires. **(Haleng et *al,* 2007).** Les caroténoïdes jouent un rôle antioxydant, particulièrement vis-à-vis de lipoperoxydation des phospholipides membranaires. **(Jacques, 2009).**

Le chef de file des caroténoïdes est cependant le β-carotène, également appelé provitamine A. **(Haleng et *al*, 2007).**

6.3.6. L'acide urique

Produit terminal majeur du métabolisme des purines chez l'homme, il est à pH physiologique majoritairement ionisé sous forme d'urate, un piégeur puissant de radicaux (OH°, ROO°, NOO°…). Ces réactions conduisent à des espèces radicalaires qui seront à leur tour réduites (notamment par la vitamine C). **(Haleng et *al,* 2007).**

6.3.7. Les oligoéléments

Les oligo-éléments indispensables pour l'activité des enzymes antioxydants. Ainsi, le cuivre et le zinc sont les cofacteurs pour la bonne activité du superoxyde dismutase (SOD) tandis que c'est le sélénium qui l'est pour le glutathion peroxydases (GPx). **(Pincemail et *al*, 2014)**.