

UNIVERSITE MOHAMMED V - RABAT
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE - RABAT-

ANNEE: 2017

THESE N°: 36

BIOMARQUEURS DU STRESS OXYDATIF

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le :

PAR

Mlle. Zineb BOUBALI

Née le 29 Août 1991 à Laayoune

Pour l'Obtention du Doctorat en Pharmacie

MOTS CLES : Stress oxydant – Biomarqueur – Défense antioxydante –
Espèce oxydant réactive – Exploration clinique.

JURY

Mr. A. IBRAHIMI Professeur de Biotechnologie Médicale	PRESIDENTE
Mr. R. EL JAUDI Professeur de Toxicologie	RAPPORTEUR
Mr. Y. RAHALI Professeur de Pharmacie Galénique	} JUGES
Mr. M. BOUCHRIK Professeur de Parasitologie Médicale	
Mr. Y. BOUSLIMANE Professeur de Toxicologie	



UNIVERSITE MOHAMMED V DE RABAT

FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE - RABAT

DOYENS HONORAIRES :

1962 – 1969 : Professeur Abdelmalek FARAJ
1969 – 1974 : Professeur Abdellatif BERBICH
1974 – 1981 : Professeur Bachir LAZRAK
1981 – 1989 : Professeur Taieb CHKILI
1989 – 1997 : Professeur Mohamed Tahar ALAOUI
1997 – 2003 : Professeur Abdelmajid BELMAHI
2003 – 2013 : Professeur Najia HAJJAJ - HASSOUNI



ADMINISTRATION :

Doyen : Professeur Mohamed ADNAOUI
Vice Doyen chargé des Affaires Académiques et étudiantes
Professeur Mohammed AHALLAT
Vice Doyen chargé de la Recherche et de la Coopération
Professeur Taoufiq DAKKA
Vice Doyen chargé des Affaires Spécifiques à la Pharmacie
Professeur Jamal TAOUFIK
Secrétaire Général : Mr. Mohamed KARRA

1- ENSEIGNANTS-CHERCHEURS MEDECINS ET PHARMACIENS

PROFESSEURS :

Décembre 1984

Pr. MAAOUNI Abdelaziz	Médecine Interne – <i><u>Clinique Royale</u></i>
Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajdi	Anesthésie -Réanimation
Pr. SETTAF Abdellatif	pathologie Chirurgicale

Novembre et Décembre 1985

Pr. BENSAID Younes	Pathologie Chirurgicale
--------------------	-------------------------

Janvier, Février et Décembre 1987

Pr. CHAHED OUZZANI Houria	Gastro-Entérologie
Pr. LACHKAR Hassan	Médecine Interne
Pr. YAHYAOUY Mohamed	Neurologie

Décembre 1988

Pr. BENHAMAMOUCH Mohamed Najib	Chirurgie Pédiatrique
Pr. DAFIRI Rachida	Radiologie

Décembre 1989

Pr. ADNAOUI Mohamed
Pr. CHAD Bouziane
Pr. OUAZZANI Taïbi Mohamed Réda

Janvier et Novembre 1990

Pr. CHKOFF Rachid
Pr. HACHIM Mohammed*
Pr. KHARBACH Aïcha
Pr. MANSOURI Fatima
Pr. TAZI Saoud Anas

Février Avril Juillet et Décembre 1991

Pr. AL HAMANY Zaïtounia
Pr. AZZOUZI Abderrahim
Pr. BAYAHIA Rabéa
Pr. BELKOUCHI Abdelkader
Pr. BENCHEKROUN Belabbes Abdellatif
Pr. BENSOUDA Yahia
Pr. BERRAHO Amina
Pr. BEZZAD Rachid
Pr. CHABRAOUI Layachi
Pr. CHERRAH Yahia
Pr. CHOKAIRI Omar
Pr. KHATTAB Mohamed
Pr. SOULAYMANI Rachida
Pr. TAOUFIK Jamal

Décembre 1992

Pr. AHALLAT Mohamed
Pr. BENSOUDA Adil
Pr. BOUJIDA Mohamed Najib
Pr. CHAHED OUAZZANI Laaziza
Pr. CHRAIBI Chafiq
Pr. DEHAYNI Mohamed*
Pr. EL OUAHABI Abdessamad
Pr. FELLAT Rokaya
Pr. GHAFIR Driss*
Pr. JIDDANE Mohamed
Pr. TAGHY Ahmed
Pr. ZOUHDI Mimoun

Mars 1994

Pr. BENJAAFAR Noureddine
Pr. BEN RAIS Nozha
Pr. CAOUI Malika
Pr. CHRAIBI Abdelmjid

Pr. EL AMRANI Sabah
Pr. EL BARDOUNI Ahmed

Médecine Interne – *Doyen de la FMPR*
Pathologie Chirurgicale
Neurologie

Pathologie Chirurgicale
Médecine-Interne
Gynécologie -Obstétrique
Anatomie-Pathologique
Anesthésie Réanimation

Anatomie-Pathologique
Anesthésie Réanimation – *Doyen de la FMPO*
Néphrologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Pharmacie galénique
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique
Biochimie et Chimie
Pharmacologie
Histologie Embryologie
Pédiatrie
Pharmacologie – *Dir. du Centre National PV*
Chimie thérapeutique *V.D à la pharmacie+Dir du CEDOC*

Chirurgie Générale V.D Aff. Acad. et Estud
Anesthésie Réanimation

Radiologie
Gastro-Entérologie
Gynécologie Obstétrique
Gynécologie Obstétrique
Neurochirurgie
Cardiologie
Médecine Interne
Anatomie
Chirurgie Générale
Microbiologie



Radiothérapie
Biophysique
Biophysique
Endocrinologie et Maladies Métaboliques *Doyen de la FMPA*
Gynécologie Obstétrique
Traumato-Orthopédie

Pr. EL HASSANI My Rachid
Pr. ERROUGANI Abdelkader
Pr. ESSAKALI Malika
Pr. ETTAYEBI Fouad
Pr. HADRI Larbi*
Pr. HASSAM Badreddine
Pr. IFRINE Lahssan
Pr. JELTHI Ahmed
Pr. MAHFOUD Mustapha
Pr. RHRAB Brahim
Pr. SENOUCI Karima

Mars 1994

Pr. ABBAR Mohamed*
Pr. ABDELHAK M'barek
Pr. BELAIDI Halima
Pr. BENTAHILA Abdelali
Pr. BENYAHIA Mohammed Ali
Pr. BERRADA Mohamed Saleh
Pr. CHAMI Ilham
Pr. CHERKAOUI Lalla Ouafae
Pr. JALIL Abdelouahed
Pr. LAKHDAR Amina
Pr. MOUANE Nezha

Mars 1995

Pr. ABOUQUAL Redouane
Pr. AMRAOUI Mohamed
Pr. BAIDADA Abdelaziz
Pr. BARGACH Samir
Pr. CHAARI Jilali*
Pr. DIMOU M'barek*
Pr. DRISSI KAMILI Med Nordine*
Pr. EL MESNAOUI Abbas
Pr. ESSAKALI HOUSSYNI Leila
Pr. HDA Abdelhamid*
Pr. IBEN ATTYA ANDALOUSSI Ahmed
Pr. OUAZZANI CHAHDI Bahia
Pr. SEFIANI Abdelaziz
Pr. ZEGGWAGH Amine Ali

Décembre 1996

Pr. AMIL Touriya*
Pr. BELKACEM Rachid
Pr. BOULANOUAR Abdelkrim
Pr. EL ALAMI EL FARICHA EL Hassan
Pr. GAOUZI Ahmed
Pr. MAHFOUDI M'barek*
Pr. OUADGHIRI Mohamed
Pr. OUZEDDOUN Naima
Pr. ZBIR EL Mehdi*

Novembre 1997

Pr. ALAMI Mohamed Hassan

Radiologie
Chirurgie Générale- **Directeur CHIS**
Immunologie
Chirurgie Pédiatrique
Médecine Interne
Dermatologie
Chirurgie Générale
Anatomie Pathologique
Traumatologie – Orthopédie
Gynécologie –Obstétrique
Dermatologie

Urologie
Chirurgie – Pédiatrique
Neurologie
Pédiatrie
Gynécologie – Obstétrique
Traumatologie – Orthopédie
Radiologie
Ophtalmologie
Chirurgie Générale
Gynécologie Obstétrique
Pédiatrie

Réanimation Médicale
Chirurgie Générale
Gynécologie Obstétrique
Gynécologie Obstétrique
Médecine Interne
Anesthésie Réanimation
Anesthésie Réanimation
Chirurgie Générale
Oto-Rhino-Laryngologie
Cardiologie - **Directeur HMI Med V**
Urologie
Ophtalmologie
Génétique
Réanimation Médicale

Radiologie
Chirurgie Pédiatrie
Ophtalmologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Radiologie
Traumatologie-Orthopédie
Néphrologie
Cardiologie

Gynécologie-Obstétrique



Pr. BEN SLIMANE Lounis
Pr. BIROUK Nazha
Pr. ERREIMI Naima
Pr. FELLAT Nadia
Pr. HAIMEUR Charki*
Pr. KADDOURI Nouredine
Pr. KOUTANI Abdellatif
Pr. LAHLOU Mohamed Khalid
Pr. MAHRAOUI CHAFIQ
Pr. TAOUFIQ Jallal
Pr. YOUSFI MALKI Mounia

Novembre 1998

Pr. AFIFI RAJAA
Pr. BENOMAR ALI
Pr. BOUGTAB Abdesslam
Pr. ER RIHANI Hassan
Pr. BENKIRANE Majid*
Pr. KHATOUI ALI*

Janvier 2000

Pr. ABID Ahmed*
Pr. AIT OUMAR Hassan
Pr. BENJELLOUN Dakhama Badr.Sououd
Pr. BOURKADI Jamal-Eddine
Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Al Montacer
Pr. ECHARRAB El Mahjoub
Pr. EL FTOUH Mustapha
Pr. EL MOSTARCHID Brahim*
Pr. ISMAILI Hassane*
Pr. MAHMOUDI Abdelkrim*
Pr. TACHINANTE Rajae
Pr. TAZI MEZALEK Zoubida

Novembre 2000

Pr. AIDI Saadia
Pr. AJANA Fatima Zohra
Pr. BENAMR Said
Pr. CHERTI Mohammed
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Selma
Pr. EL HASSANI Amine
Pr. EL KHADER Khalid
Pr. EL MAGHRAOUI Abdellah*
Pr. GHARBI Mohamed El Hassan
Pr. MAHASSINI Najat
Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae
Pr. ROUIMI Abdelhadi*

Décembre 2000

Pr. ZOHAIR ABDELAH*

Urologie
Neurologie
Pédiatrie
Cardiologie
Anesthésie Réanimation
Chirurgie Pédiatrique
Urologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Psychiatrie
Gynécologie Obstétrique

Gastro-Entérologie
Neurologie – *Doyen de la FMP Abulcassis*
Chirurgie Générale
Oncologie Médicale
Hématologie
Cardiologie

Pneumophtisiologie
Pédiatrie
Pédiatrie
Pneumo-phtisiologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Pneumo-phtisiologie
Neurochirurgie
Traumatologie Orthopédie- *Dir. Hop. Av. Marr.*
Anesthésie-Réanimation *Inspecteur du SSM*
Anesthésie-Réanimation
Médecine Interne



Neurologie
Gastro-Entérologie
Chirurgie Générale
Cardiologie
Anesthésie-Réanimation
Pédiatrie *Directeur Hop. Chekikh Zaied*
Urologie
Rhumatologie
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Anatomie Pathologique
Pédiatrie
Neurologie

ORL

Décembre 2001

Pr. BALKHI Hicham*
Pr. BENABDELJILIL Maria
Pr. BENAMAR Loubna
Pr. BENAMOR Jouada
Pr. BENELBARHDADI Imane
Pr. BENNANI Rajae
Pr. BENOUACHANE Thami
Pr. BEZZA Ahmed*
Pr. BOUCHIKHI IDRISSE Med Larbi
Pr. BOUMDIN El Hassane*
Pr. CHAT Latifa
Pr. DAALI Mustapha*
Pr. DRISSE Sidi Mourad*
Pr. EL HIJRI Ahmed
Pr. EL MAAQILI Moulay Rachid
Pr. EL MADHI Tarik
Pr. EL OUNANI Mohamed
Pr. ETTAIR Said
Pr. GAZZAZ Miloudi*
Pr. HRORA Abdelmalek
Pr. KABBAJ Saad
Pr. KABIRI EL Hassane*
Pr. LAMRANI Moulay Omar
Pr. LEKEHAL Brahim
Pr. MAHASSIN Fattouma*
Pr. MEDARHRI Jalil
Pr. MIKDAME Mohammed*
Pr. MOHSINE Raouf
Pr. NOUINI Yassine
Pr. SABBAB Farid
Pr. SEFIANI Yasser
Pr. TAOUFIQ BENCHEKROUN Soumia

Décembre 2002

Pr. AL BOUZIDI Abderrahmane*
Pr. AMEUR Ahmed *
Pr. AMRI Rachida
Pr. AOURARH Aziz*
Pr. BAMOU Youssef *
Pr. BELMEJDOUB Ghizlene*
Pr. BENZEKRI Laila
Pr. BENZZOUBEIR Nadia
Pr. BERNOUSSI Zakiya
Pr. BICHRA Mohamed Zakariya*
Pr. CHOHO Abdelkrim *
Pr. CHKIRATE Bouchra
Pr. EL ALAMI EL FELLOUS Sidi Zouhair
Pr. EL HAOURI Mohamed *
Pr. FILALI ADIB Abdelhai

Anesthésie-Réanimation
Neurologie
Néphrologie
Pneumo-phtisiologie
Gastro-Entérologie
Cardiologie
Pédiatrie
Rhumatologie
Anatomie
Radiologie
Radiologie
Chirurgie Générale
Radiologie
Anesthésie-Réanimation
Neuro-Chirurgie
Chirurgie-Pédiatrique
Chirurgie Générale
Pédiatrie **Directeur. Hop.d'Enfants**
Neuro-Chirurgie
Chirurgie Générale
Anesthésie-Réanimation
Chirurgie Thoracique
Traumatologie Orthopédie
Chirurgie Vasculaire Périphérique
Médecine Interne
Chirurgie Générale
Hématologie Clinique
Chirurgie Générale
Urologie **Directeur Hôpital Ibn Sina**
Chirurgie Générale
Chirurgie Vasculaire Périphérique
Pédiatrie



Anatomie Pathologique
Urologie
Cardiologie
Gastro-Entérologie
Biochimie-Chimie
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Dermatologie
Gastro-Entérologie
Anatomie Pathologique
Psychiatrie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Chirurgie Pédiatrique
Dermatologie
Gynécologie Obstétrique

Pr. HAJJI Zakia
 Pr. IKEN Ali
 Pr. JAAFAR Abdeloihab*
 Pr. KRIOUILE Yamina
 Pr. LAGHMARI Mina
 Pr. MABROUK Hfid*
 Pr. MOUSSAOUI RAHALI Driss*
 Pr. OUJILAL Abdelilah
 Pr. RACHID Khalid *
 Pr. RAISS Mohamed
 Pr. RGUIBI IDRISSE Sidi Mustapha*
 Pr. RHOU Hakima
 Pr. SIAH Samir *
 Pr. THIMOU Amal
 Pr. ZENTAR Aziz*

Janvier 2004

Pr. ABDELLAH El Hassan
 Pr. AMRANI Mariam
 Pr. BENBOUZID Mohammed Anas
 Pr. BENKIRANE Ahmed*
 Pr. BOUGHALEM Mohamed*
 Pr. BOULAADAS Malik
 Pr. BOURAZZA Ahmed*
 Pr. CHAGAR Belkacem*
 Pr. CHERRADI Nadia
 Pr. EL FENNI Jamal*
 Pr. EL HANCHI ZAKI
 Pr. EL KHORASSANI Mohamed
 Pr. EL YOUNASSI Badreddine*
 Pr. HACHI Hafid
 Pr. JABOUIRIK Fatima
 Pr. KHARMAZ Mohamed
 Pr. MOUGHIL Said
 Pr. OUBAAZ Abdelbarre*
 Pr. TARIB Abdelilah*
 Pr. TIJAMI Fouad
 Pr. ZARZUR Jamila

Janvier 2005

Pr. ABBASSI Abdellah
 Pr. AL KANDRY Sif Eddine*
 Pr. ALLALI Fadoua
 Pr. AMAZOUZI Abdellah
 Pr. AZIZ Nouredine*
 Pr. BAHIRI Rachid
 Pr. BARKAT Amina
 Pr. BENYASS Aatif
 Pr. BERNOUSSI Abdelghani
 Pr. DOUDOUH Abderrahim*
 Pr. EL HAMZAOUI Sakina*
 Pr. HAJJI Leila

Ophtalmologie
 Urologie
 Traumatologie Orthopédie
 Pédiatrie
 Ophtalmologie
 Traumatologie Orthopédie
 Gynécologie Obstétrique
 Oto-Rhino-Laryngologie
 Traumatologie Orthopédie
 Chirurgie Générale
 Pneumophtisiologie
 Néphrologie
 Anesthésie Réanimation
 Pédiatrie
 Chirurgie Générale

Ophtalmologie
 Anatomie Pathologique
 Oto-Rhino-Laryngologie
 Gastro-Entérologie
 Anesthésie Réanimation
 Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
 Neurologie
 Traumatologie Orthopédie
 Anatomie Pathologique
 Radiologie
 Gynécologie Obstétrique
 Pédiatrie
 Cardiologie
 Chirurgie Générale
 Pédiatrie
 Traumatologie Orthopédie
 Chirurgie Cardio-Vasculaire
 Ophtalmologie
 Pharmacie Clinique
 Chirurgie Générale
 Cardiologie

Chirurgie Réparatrice et Plastique
 Chirurgie Générale
 Rhumatologie
 Ophtalmologie
 Radiologie
 Rhumatologie
 Pédiatrie
 Cardiologie
 Ophtalmologie
 Biophysique
 Microbiologie
 Cardiologie



(mise en disponibilité)

Pr. HESSISSEN Leila
Pr. JIDAL Mohamed*
Pr. LAAROUSSI Mohamed
Pr. LYAGOUBI Mohammed
Pr. NIAMANE Radouane*
Pr. RAGALA Abdelhak
Pr. SBIHI Souad
Pr. ZERAIDI Najja

Pédiatrie
Radiologie
Chirurgie Cardio-vasculaire
Parasitologie
Rhumatologie
Gynécologie Obstétrique
Histo-Embryologie Cytogénétique
Gynécologie Obstétrique

Décembre 2005

Pr. CHANI Mohamed

Anesthésie Réanimation

Avril 2006

Pr. ACHEMLAL Lahsen*
Pr. AKJOUJ Said*
Pr. BELMEKKI Abdelkader*
Pr. BENCHEIKH Razika
Pr. BIYI Abdelhamid*
Pr. BOUHAFS Mohamed El Amine
Pr. BOULAHYA Abdellatif*
Pr. CHENGUETI ANSARI Anas
Pr. DOGHMI Nawal
Pr. FELLAT Ibtissam
Pr. FAROUDY Mamoun
Pr. HARMOUCHE Hicham
Pr. HANAFI Sidi Mohamed*
Pr. IDRIS LAHLOU Amine*
Pr. JROUNDI Laila
Pr. KARMOUNI Tariq
Pr. KILI Amina
Pr. KISRA Hassan
Pr. KISRA Mounir
Pr. LAATIRIS Abdelkader*
Pr. LMIMOUNI Badreddine*
Pr. MANSOURI Hamid*
Pr. OUANASS Abderrazzak
Pr. SAFI Soumaya*
Pr. SEKKAT Fatima Zahra
Pr. SOUALHI Mouna
Pr. TELLAL Saida*
Pr. ZAHRAOUI Rachida

Rhumatologie
Radiologie
Hématologie
O.R.L
Biophysique
Chirurgie - Pédiatrique
Chirurgie Cardio – Vasculaire
Gynécologie Obstétrique
Cardiologie
Cardiologie
Anesthésie Réanimation
Médecine Interne
Anesthésie Réanimation
Microbiologie
Radiologie
Urologie
Pédiatrie
Psychiatrie
Chirurgie – Pédiatrique
Pharmacie Galénique
Parasitologie
Radiothérapie
Psychiatrie
Endocrinologie
Psychiatrie
Pneumo – Phtisiologie
Biochimie
Pneumo – Phtisiologie

Octobre 2007

Pr. ABIDI Khalid
Pr. ACHACHI Leila
Pr. ACHOUR Abdessamad*
Pr. AIT HOUSSA Mahdi*
Pr. AMHAJJI Larbi*
Pr. AOUI Sarra
Pr. BAITE Abdelouahed*
Pr. BALOUCH Lhousaine*

Réanimation médicale
Pneumo phtisiologie
Chirurgie générale
Chirurgie cardio vasculaire
Traumatologie orthopédie
Parasitologie
Anesthésie réanimation **Directeur ERSM**
Biochimie-chimie



Pr. BENZIANE Hamid*
 Pr. BOUTIMZINE Nourdine
 Pr. CHARKAOUI Naoual*
 Pr. EHIRCHIOU Abdelkader*
 Pr. ELABSI Mohamed
 Pr. EL MOUSSAOUI Rachid
 Pr. EL OMARI Fatima
 Pr. GHARIB Nouredine
 Pr. HADADI Khalid*
 Pr. ICHOU Mohamed*
 Pr. ISMAILI Nadia
 Pr. KEBDANI Tayeb
 Pr. LALAOUI SALIM Jaafar*
 Pr. LOUZI Lhoussain*
 Pr. MADANI Naoufel
 Pr. MAHI Mohamed*
 Pr. MARC Karima
 Pr. MASRAR Azlarab
 Pr. MRABET Mustapha*
 Pr. MRANI Saad*
 Pr. OUZZIF Ez zohra*
 Pr. RABHI Monsef*
 Pr. RADOUANE Bouchaib*
 Pr. SEFFAR Myriame
 Pr. SEKHSOKH Yessine*
 Pr. SIFAT Hassan*
 Pr. TABERKANET Mustafa*
 Pr. TACHFOUTI Samira
 Pr. TAJDINE Mohammed Tariq*
 Pr. TANANE Mansour*
 Pr. TLIQUI Houssain
 Pr. TOUATI Zakia

Décembre 2007

Pr. DOUHAL ABDERRAHMAN

Décembre 2008

Pr ZOUBIR Mohamed*
 Pr TAHIRI My El Hassan*

Mars 2009

Pr. ABOUZAHIR Ali*
 Pr. AGDR Aomar*
 Pr. AIT ALI Abdelmounaim*
 Pr. AIT BENHADDOU El hachmia
 Pr. AKHADDAR Ali*
 Pr. ALLALI Nazik

Pharmacie clinique
 Ophtalmologie
 Pharmacie galénique
 Chirurgie générale
 Chirurgie générale
 Anesthésie réanimation
 Psychiatrie
 Chirurgie plastique et réparatrice
 Radiothérapie
 Oncologie médicale
 Dermatologie
 Radiothérapie
 Anesthésie réanimation
 Microbiologie
 Réanimation médicale
 Radiologie
 Pneumo phtisiologie
 Hématologique
 Médecine préventive santé publique et hygiène
 Virologie
 Biochimie-chimie
 Médecine interne
 Radiologie
 Microbiologie
 Microbiologie
 Radiothérapie
 Chirurgie vasculaire périphérique
 Ophtalmologie
 Chirurgie générale
 Traumatologie orthopédie
 Parasitologie
 Cardiologie

Ophtalmologie

Anesthésie Réanimation
 Chirurgie Générale

Médecine interne
 Pédiatre
 Chirurgie Générale
 Neurologie
 Neuro-chirurgie
 Radiologie



Pr. AMINE Bouchra
 Pr. ARKHA Yassir
 Pr. BELYAMANI Lahcen*
 Pr. BJIJOU Younes
 Pr. BOUHSAIN Sanae*
 Pr. BOUI Mohammed*
 Pr. BOUNAIM Ahmed*
 Pr. BOUSSOUGA Mostapha*
 Pr. CHAKOUR Mohammed *
 Pr. CHTATA Hassan Toufik*
 Pr. DOGHMI Kamal*
 Pr. EL MALKI Hadj Omar
 Pr. EL OUENNASS Mostapha*
 Pr. ENNIBI Khalid*
 Pr. FATHI Khalid
 Pr. HASSIKOU Hasna *
 Pr. KABBAJ Nawal
 Pr. KABIRI Meryem
 Pr. KARBOUBI Lamya
 Pr. L'KASSIMI Hachemi*
 Pr. LAMSAOURI Jamal*
 Pr. MARMADE Lahcen
 Pr. MESKINI Toufik
 Pr. MESSAOUDI Nezha *
 Pr. MSSROURI Rahal
 Pr. NASSAR Ittimade
 Pr. OUKERRAJ Latifa
 Pr. RHORFI Ismail Abderrahmani *

PROFESSEURS AGREGES :
Octobre 2010

Pr. ALILOU Mustapha
 Pr. AMEZIANE Taoufiq*
 Pr. BELAGUID Abdelaziz
 Pr. BOUAITY Brahim*
 Pr. CHADLI Mariama*
 Pr. CHEMSI Mohamed*
 Pr. DAMI Abdellah*
 Pr. DARBI Abdellatif*
 Pr. DENDANE Mohammed Anouar
 Pr. EL HAFIDI Naima
 Pr. EL KHARRAS Abdennasser*
 Pr. EL MAZOUZ Samir
 Pr. EL SAYEGH Hachem
 Pr. ERRABIH Ikram
 Pr. LAMALMI Najat
 Pr. MOSADIK Ahlam
 Pr. MOUJAHID Mountassir*
 Pr. NAZIH Mouna*
 Pr. ZOUAIDIA Fouad

Rhumatologie
 Neuro-chirurgie
 Anesthésie Réanimation
 Anatomie
 Biochimie-chimie
 Dermatologie
 Chirurgie Générale
 Traumatologie orthopédique
 Hématologie biologique
 Chirurgie vasculaire périphérique
 Hématologie clinique
 Chirurgie Générale
 Microbiologie
 Médecine interne
 Gynécologie obstétrique
 Rhumatologie
 Gastro-entérologie
 Pédiatrie
 Pédiatrie
 Microbiologie **Directeur Hôpital My Ismail**
 Chimie Thérapeutique
 Chirurgie Cardio-vasculaire
 Pédiatrie
 Hématologie biologique
 Chirurgie Générale
 Radiologie
 Cardiologie
 Pneumo-phtisiologie



Anesthésie réanimation
 Médecine interne
 Physiologie
 ORL
 Microbiologie
 Médecine aéronautique
 Biochimie chimie
 Radiologie
 Chirurgie pédiatrique
 Pédiatrie
 Radiologie
 Chirurgie plastique et réparatrice
 Urologie
 Gastro entérologie
 Anatomie pathologique
 Anesthésie Réanimation
 Chirurgie générale
 Hématologie
 Anatomie pathologique

Mai 2012

Pr. AMRANI Abdelouahed
Pr. ABOUELALAA Khalil*
Pr. BELAIZI Mohamed*
Pr. BENCHEBBA Driss*
Pr. DRISSI Mohamed*
Pr. EL ALAOUI MHAMDI Mouna
Pr. EL KHATTABI Abdessadek*
Pr. EL OUAZZANI Hanane*
Pr. ER-RAJI Mounir
Pr. JAHID Ahmed
Pr. MEHSSANI Jamal*
Pr. RAISSOUNI Maha*

Chirurgie Pédiatrique
Anesthésie Réanimation
Psychiatrie
Traumatologie Orthopédique
Anesthésie Réanimation
Chirurgie Générale
Médecine Interne
Pneumophtisiologie
Chirurgie Pédiatrique
Anatomie pathologique
Psychiatrie
Cardiologie

Février 2013

Pr. AHID Samir
Pr. AIT EL CADI Mina
Pr. AMRANI HANCHI Laila
Pr. AMOUR Mourad
Pr. AWAB Almahdi
Pr. BELAYACHI Jihane
Pr. BELKHADIR Zakaria Houssain
Pr. BENCHEKROUN Laila
Pr. BENKIRANE Souad
Pr. BENNANA Ahmed*
0.
Pr. BENSGHIR Mustapha*
Pr. BENYAHIA Mohammed*
Pr. BOUATIA Mustapha
Pr. BOUABID Ahmed Salim*
Pr. BOUTARBOUCH Mahjouba
Pr. CHAIB Ali*
Pr. DENDANE Tarek
Pr. DINI Nouzha*
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Mohamed Ali
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Najwa
Pr. ELFATEMI Nizare
Pr. EL GUERROUJ Hasnae
Pr. EL HARTI Jaouad
Pr. EL JOUDI Rachid*
Pr. EL KABABRI Maria
Pr. EL KHANNOUSSI Basma
Pr. EL KHLOUFI Samir
Pr. EL KORAICHI Alae
Pr. EN-NOUALI Hassane*
Pr. ERRGUIG Laila
Pr. FIKRI Meryim
Pr. GHFIR Imade

Pharmacologie – Chimie
Toxicologie
Gastro-Entérologie
Anesthésie Réanimation
Anesthésie Réanimation
Réanimation Médicale
Anesthésie Réanimation
Biochimie-Chimie
Hématologie
Informatique Pharmaceutique

Anesthésie Réanimation
Néphrologie
Chimie Analytique
Traumatologie Orthopédie
Anatomie
Cardiologie
Réanimation Médicale
Pédiatrie
Anesthésie Réanimation
Radiologie
Neuro-Chirurgie
Médecine Nucléaire
Chimie Thérapeutique
Toxicologie
Pédiatrie
Anatomie Pathologie
Anatomie
Anesthésie Réanimation
Radiologie
Physiologie
Radiologie
Médecine Nucléaire



Pr. IMANE Zineb
Pr. IRAQI Hind
Pr. KABBAJ Hakima
Pr. KADIRI Mohamed*
Pr. LATIB Rachida
Pr. MAAMAR Mouna Fatima Zahra
Pr. MEDDAH Bouchra
Pr. MELHAOUI Adyl
Pr. MRABTI Hind
Pr. NEJJARI Rachid
Pr. OUBEJJA Houda
Pr. OUKABLI Mohamed*
Pr. RAHALI Younes
Pr. RATBI Ilham
Pr. RAHMANI Mounia
Pr. REDA Karim*
Pr. REGRAGUI Wafa
Pr. RKAIN Hanan
Pr. ROSTOM Samira
Pr. ROUAS Lamiaa
Pr. ROUIBAA Fedoua*
Pr. SALIHOUN Mouna
Pr. SAYAH Rochde
Pr. SEDDIK Hassan*
Pr. ZERHOUNI Hicham
Pr. ZINE Ali*

Pédiatrie
Endocrinologie et maladies métaboliques
Microbiologie
Psychiatrie
Radiologie
Médecine Interne
Pharmacologie
Neuro-chirurgie
Oncologie Médicale
Pharmacognosie
Chirurgie Pédiatrique
Anatomie Pathologique
Pharmacie Galénique
Génétique
Neurologie
Ophtalmologie
Neurologie
Physiologie
Rhumatologie
Anatomie Pathologique
Gastro-Entérologie
Gastro-Entérologie
Chirurgie Cardio-Vasculaire
Gastro-Entérologie
Chirurgie Pédiatrique
Traumatologie Orthopédie

Avril 2013

Pr. EL KHATIB Mohamed Karim*
Pr. GHOUNDALE Omar*
Pr. ZYANI Mohammad*

Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
Urologie
Médecine Interne

**Enseignants Militaires*



MARS 2014

ACHIR ABDELLAH
BENCHAKROUN MOHAMMED
BOUCHIKH MOHAMMED
EL KABBAJ DRISS
EL MACHTANI IDRISSE SAMIRA
HARDIZI HOUYAM
HASSANI AMALE
HERRAK LAILA
JANANE ABDELLA TIF
JEAIDI ANASS
KOUACH JAOUAD
LEMNOUER ABDELHAY
MAKRAM SANAA
OULAHYANE RACHID
RHISSASSI MOHAMED JMFAR
SABRY MOHAMED
SEKKACH YOUSSEF
TAZL MOUKBA. :LA.KLA.

Chirurgie Thoracique
Traumatologie- Orthopédie
Chirurgie Thoracique
Néphrologie
Biochimie-Chimie
Histologie- Embryologie-Cytogénétique
Pédiatrie
Pneumologie
Urologie
Hématologie Biologique
Génécologie-Obstétrique
Microbiologie
Pharmacologie
Chirurgie Pédiatrique
CCV
Cardiologie
Médecine Interne
Génécologie-Obstétrique

***Enseignants Militaires**

DECEMBRE 2014

ABILKACEM RACHID'
AIT BOUGHIMA FADILA
BEKKALI HICHAM
BENAZZOU SALMA
BOUABDELLAH MOUNYA
BOUCHRIK MOURAD
DERRAJI SOUFIANE
DOBLALI TAOUFIK
EL AYOUBI EL IDRISSE ALI
EL GHADBANE ABDEDAIM HATIM
EL MARJANY MOHAMMED
FEJJAL NAWFAL
JAHIDI MOHAMED
LAKHAL ZOUHAIR
OUDGHIRI NEZHA
Rami Mohamed
SABIR MARIA
SBAI IDRISSE KARIM

Pédiatrie
Médecine Légale
Anesthésie-Réanimation
Chirurgie Maxillo-Faciale
Biochimie-Chimie
Parasitologie
Pharmacie Clinique
Microbiologie
Anatomie
Anesthésie-Réanimation
Radiothérapie
Chirurgie Réparatrice et Plastique
O.R.L
Cardiologie
Anesthésie-Réanimation
Chirurgie Pédiatrique
Psychiatrie
Médecine préventive, santé publique et Hyg.

***Enseignants Militaires**



AOÛT 2015

Meziane meryem
Tahri latifa

Dermatologie
Rhumatologie

JANVIER 2016

BENKABBOU AMINE
EL ASRI FOUAD
ERRAMI NOUREDDINE
NITASSI SOPHIA

Chirurgie Générale
Ophtalmologie
O.R.L
O.R.L

2- ENSEIGNANTS – CHERCHEURS SCIENTIFIQUES

PROFESSEURS / PRs. HABILITES

Pr. ABOUDRAR Saadia	Physiologie
Pr. ALAMI OUHABI Naima	Biochimie – chimie
Pr. ALAOUI KATIM	Pharmacologie
Pr. ALAOUI SLIMANI Lalla Naïma	Histologie-Embryologie
Pr. ANSAR M'hammed	Chimie Organique et Pharmacie Chimique
Pr. BOUHOUCHE Ahmed	Génétique Humaine
Pr. BOUKLOUZE Abdelaziz	Applications Pharmaceutiques
Pr. BOURJOUANE Mohamed	Microbiologie
Pr. CHAHED OUZZANI Lalla Chadia	Biochimie – chimie
Pr. DAKKA Taoufiq	Physiologie
Pr. DRAOUI Mustapha	Chimie Analytique
Pr. EL GUESSABI Lahcen	Pharmacognosie
Pr. ETTAIB Abdelkader	Zootéchnie
Pr. FAOUZI Moulay El Abbès	Pharmacologie
Pr. HAMZA OUI Laila	Biophysique
Pr. HMAMOUCHE Mohamed	Chimie Organique
Pr. IBRAHIMI Azeddine	Biologie moléculaire
Pr. KHANFRI Jamal Eddine	Biologie
Pr. OULAD BOUYAHYA IDRISSE Med	Chimie Organique
Pr. REDHA Ahlam	Chimie
Pr. TOUATI Driss	Pharmacognosie
Pr. ZAHIDI Ahmed	Pharmacologie
Pr. ZELLOU Amina	Chimie Organique

*Mise à jour le 14/12/2016 par le
Service des Ressources Humaines*





Dédicaces



A ALLAH

Tout puissant

Qui m'a inspiré

Qui m'a guidé dans le bon chemin

Qui m'a toujours accordé sa grâce

Je vous dois ce je suis devenue

Louanges et remerciements

Pour votre clémence et miséricorde



A ceux qui ont toujours cru en moi

A ceux qui m'ont toujours encouragé

Je dédie cette thèse à



Au bon Dieu

Tout puissant

Qui m'a inspiré, qui m'a guidé dans de bon chemin

Je vous dois ce que je suis devenue

Louanges et remerciements

Pour votre clémence et miséricorde



*A mes très chers parents, MAMOUNIM
FOUZIA, BOUBALI RAHAL,*

En hommage à tous les sacrifices que vous avez consenti

Pour moi durant mes longues années d'études.

Je n'aurais jamais espéré avoir de meilleurs parents.

Je vous remercie d'avoir fait de moi ce que je suis maintenant

Et de m'avoir appris de vivre dans l'honneur et dans la dignité.

Aucune dédicace, aucun mot, ne saurait exprimer réellement mon

Profond amour, mon respect et ma vive gratitude.

Veillez trouver dans ce travail le fruit de toutes

Vos peines et vos sacrifices.



Ma sœur Mariem et mes frères Zakaria et Youssef

*Je ne pourrais jamais exprimer le respect que j'ai pour vous,
Ni la gratitude et ma reconnaissance envers les inoubliables et
Immenses sacrifices que vous avez déployés pour mes études.*

*Vous n'avez pas cessé de me soutenir et m'encourager
Durant toutes les années de mes études, vous avez toujours
Été présents à mes côtés pour me consoler quand il fallait,
Jamais je ne l'oublierais.*





*A mes chères amies :
Soukaina, Ifarah, Hasna,
Hanane, Amina*

Je vous dédie ce travail en témoignage

De ma grande affection

Et amour et pour tous les moments qu'on a partagé.

Je vous souhaite une florissante santé, un prospère avenir

Et une vie couronnée de succès.





Remerciements





*A notre président(e) de thèse,
Monsieur IBRAHIMI AZEDDINE
Professeur de Biotechnologie médicale
A la faculté de Médecine et pharmacie à rabat*

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter de présider

Ce jury de thèse et de juger ce travail.

Je tiens à vous remercier pour l'enseignement dispensé au cours de

Ces années et pour vos conseils avisés.

Nous avons profité de votre enseignement de qualité

et de votre sagesse. Que ce travail soit pour vous un témoignage

de notre profonde gratitude.





*A notre Maitre et rapporteur de thèse,
Monsieur EL JAOUDI RACHID,
Professeur de toxicologie à la faculté
de Médecine et de Pharmacie de Rabat.*

*Merci de m'avoir fait l'honneur de diriger ce travail
et d'apporter votre contribution à ce jury.*

Je tiens à vous remercier pour l'enseignement dispensé

Au cours de ces années et pour vos conseils avisés.

Vous m'avez guidé en me conseillant et en consacrant

Une partie de votre temps précieux, malgré les responsabilités

Et les charges de vos fonctions.

Votre sourire, votre sympathie, votre modestie et vos qualités

Professionnelles ne peuvent que susciter l'estime et le respect

De tous. Veuillez trouver ici, Monsieur

le professeur, l'assurance

de mon admiration et de mon profond respect.





*A notre Maître et Membres du jury,
Monsieur BOUSLIMANE YASSIR
Professeur de Toxicologie
A la Faculté de Médecine et Pharmacie*

*Rien ne pourra vous exprimer notre gratitude pour l'enseignement
Que vous nous prodiguez et aussi parce que
Vous avez accepté de diriger ce travail.
Veuillez trouver dans ce travail l'expression
De mon profond respect.*





*A notre Maître et Membres du jury,
Monsieur BOUCHRIK MOURAD
Professeur de Parasitologie médicale
A la Faculté de Médecine et Pharmacie*

*C'est pour moi un immense plaisir et une grande fierté de vous
Compter parmi les membres de jury. Votre dynamique et votre grande
Compétence ont toujours forcé mon admiration.
Je vous remercie de la spontanéité et la gentillesse
Avec lesquelles vous avez bien voulu accepter
De juger ce travail. Je vous en serais toujours reconnaissant.
Veuillez trouver ici, le témoignage de ma profonde
Reconnaissance et de mon grand respect.*



LISTE D'ABREVIATION

μMol	: Micromole
α-Toc	: Radical alpha-tocophéryl
α-TocH	: Alpha-tocophérol
μg	: Microgramme
¹O₂	: Dioxygène singulet
4-HNE	: 4-hydroxynonéal
8-iso-PGF_{2α}	: 8-iso-prostaglandines F _{2α}
8-OHdG	: 8hydroxydéoxyguanosine
ADN	: Acide déoxyribo-nucléique
AGE	: Advanced glycation end products/ Produits finaux de la glucoxydation
ARNm	: Acide ribonucléique messenger
ATP	: Adénosine triphosphate
BHA	: Butylhydroxyanisole
BHT	: Butylhydroxytoluène
CAT	: Catalase
Cl	: Chlore
Cl⁻	: Ion chlorure
ClO⁻	: Ion hypochlorite
CML	: Carboxyl-méthyl-lysine
CPG	: Chromatographique sur gaz
Cu	: Cuivre
DMPO	: Dimethyl-pyrroline-1-oxide
DNTB	: Acide 5,5-dithio-bis-2-nitrobenzoïque
DTT	: Dithiotréitol
EGFR	: Epithelial Growth Factor Receptor
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
ERN	: Espèces réactives de l'azote
ERO	: Espèces réactives oxygénées
FADH₂	: Flavin adénine dinucléotide, forme réduite
Fe²⁺	: Ion ferreux

Fe³⁺	: Ion ferrique
FPIA	: Dosage immunoenzymatique par polarisation de fluorescence
FRAP Assay	: ferric reducing antioxidant power assay
GPx	: Glutathion peroxydase
GSH	: Glutathion réduit
GSSG	: Glutathion disulfide ou glutathion oxydé
H⁺	: Proton hydrogène
H₂O	: Eau
H₂O₂	: Peroxyde d'hydrogène
HbA1 c	: Hémoglobine glyquée
HCl	: Acide chlorhydrique
HClO	: Acide hypochloreux
HDL	: High Density Lipoprotein
HO-1	: Hème oxydase-1
HPLC	: Chromatographie liquide haute performance
HPO₃	: Acide métaphosphorique
L°	: Radical lipidique
LDL	: Light Density Lipoprotein
LH	: Lipide insaturé
LOOH ou ROOH	: Hydroperoxyde lipidique
MDA	: Malondialdéhyde
Mn	: Manganèse
MPO	: Myéloperoxydase
NADH₂	: Nicotinamide adénine dinucléotide, forme réduit
NADPH	: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme réduite
NMDA	: N-méthyl-D-aspartate
NO	: Monoxyde d'azote ou oxyde nitrique
NO₂	: Dioxyde d'azote
NO₃⁻	: Peroxynitrite
NOS	: Oxyde nitrique synthase
NOX	: NADPH oxydase
O₂	: Oxygène

O₂	: Ion superoxyde
OH	: Radical hydroxyle
OSP	: Oxidative Stress Profiling
PFG	: Produits finaux de glycosylation
PGE2	: Prostaglandine E2
PGF2α	: Prostaglandines F2 α
PI3K	: Phosphatidylinositol 3-kinase
POBN	: Alpha-(4-Pyridyl-1-oxide)-N-tert-butylnitron
PON	: Paraoxonase
Q ou QH	: Coenzyme Q/ubiquinone
RAGE	: Récepteurs AGE.
RMN	: Résonance magnétique nucléaire
RO	: Radical alkoxyde
ROMS	: Reactive oxygen metabolites
ROO	: Radical peroxyde
RPE	: Résonance Paramagnétique Électronique
SAH	: S-adénosylhomocystéine
Se	: Selenium
SH	: Groupement thiol
SHp Test	: Barrière antioxydante thiols
SOD	: Superoxyde Dismutase
TBARS	: Thiobarbituric Acid Reactivity Reactive Substances
TRAP	: Total radical trapping antioxidant potential
UCP	: Protéine découplante/ uncoupling protéine-1
VDAC	: Voltagedependent anion channel
VLDL	: Lipoprotéines de faible densité
WST-1	: Sel de tétrazolium
XDH	: Xanthine déshydrogénase
XO	: Xanthine oxydase
Zn	: Zinc



Liste des illustrations



LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Principales espèces des réactives oxygènes et leurs propriétés	11
Tableau II : Principales circonstances d'apparition du stress oxydant	20
Tableau III : Caractéristique des isoformes du superoxyde Dimutase	24
Tableau IV : Principaux antioxydants de leurs modes d'action	37
Tableau V : les différentes phases de la peroxydation lipidique en présence d'EROs et leurs réactions chimiques	43
Tableau VI : Biomarqueurs du stress oxydant ; les dérivés oxydés des macromolécules	89
Tableau VII : Biomarqueurs du stress oxydant ; les systèmes antioxydants.....	95
Tableau VIII : Biomarqueurs du stress oxydant ; les systèmes prooxydants.....	102
Tableau IX : Condition propices à la surproduction d'espèces réactives d'azote	106
Tableau X : Valeurs de référence des marqueurs sanguins du stress oxydant	110

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : La balance entre les systèmes de défenses antioxydants et la production d'ERO. ...4	4
Figure 2 : Différents espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERN) et leurs mécanismes de productions10	10
Figure 3 : Formation des ERO dans la chaîne respiratoire.13	13
Figure 4 : Réaction de catalyse de l'hypoxanthine14	14
Figure 5 : Production du NO° et ses rôles.....16	16
Figure 6 : Principales sources cellulaires de radicaux libres.17	17
Figure 7 : Insertion de la vitamine E au sein de la membrane lipidique confirme son rôle protecteur en empêchant la propagation de la peroxydation lipidique.....27	27
Figure 8 : Structure de la vitamine E ou RRR-- α -tocophérol28	28
Figure 9 : Structure de la vitamine C.....29	29
Figure 10 : Exemple classique de propagation d'une chaîne de peroxydation lipidique.40	40
Figure 11 : Complexité réactionnelle de la peroxydation lipidique: peroxydation de l'acide linoléique(LH)41	41
Figure 12 : Vulnérabilité des atomes d'hydrogène dans la chaîne polyinsaturée de l'acide gra.....42	42
Figure 13 : Produits d'oxydation du cholestérol44	44
Figure 14 : les acides aminés soufrés45	45
Figure 15 : les acides aminés basiques46	46
Figure 16 : les acides aminés aromatiques.....46	46
Figure 17 : Nature de quelques modifications des chaînes latérales, d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire.....47	47

Figure 18 : structure des quatre bases et différents constituants de l'ADN.....	50
Figure 19 : Réplication de l'ADN	52
Figure 20 : Principales classes de dommages de l'ADN.....	53
Figure 21 : Mécanisme de formation de deux produits majoritaires et de dégradation de la guanine.....	55
Figure 22 : Oxydation au sens large du glucose ou « Glycosoxydation », selon les 2 voies principales.....	57
Figure 23 : Stabilité de la vitamine C selon les conditions de conservation de l'échantillon plasmatique	69
Figure 24 : Deux« spintraps» DMPO et POBN.....	72
Figure 25 : Spectres de résonance paramagnétique électronique (RPE) de radicaux libres....	74
Figure 26 : 4-hydroxynonenal (4-HNE), acroléine et malondialdéhyde (MDA)	80
Figure 27 : Réaction du dialdéhyde malonique avec l'acide thiobarbiturique.....	82
Figure 28 : Structure de la prostaglandine PGF2 α et de l'isoprostane iso-PGF2 α	84
Figure 29 : Principaux marqueurs de la peroxydation lipidique et leurs dosages.....	85
Figure 30 : Mesure des dommages de l'ADN par la méthode des comètes	87
Figure 31 : principe de dosage de SOD.....	90
Figure 32 : Exemple de bilan oxydatif chez l'homme, présenté sous forme de rosace. La zone orangée désigne l'intervalle des valeurs usuelles	105

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
PARTIE 1 : SYSTEME OXYDANT ET SYSTEME ANTIOXYDANT	3
I. STRESS OXYDANT.....	4
A. Définition	4
B. Les espèces réactives de l’oxygène.....	5
B.1.Définition	5
B.2. Les principales ERO dans la cellule.....	6
B.2.1. ERO radicalaires	6
B.2.2. ERO non radicalaires	8
B.2.3. Les métaux de transition.....	9
B.3. Sites de production des ERO	12
B.4. Circonstance d’apparition des ERO	17
B.5. Rôle physiologique des ERO	20
II. SYSTEME DE DEFENSE ANTIOXYDANT	23
A. Définition	23
B. Systèmes enzymatiques accessoires	25
C. Les systèmes antioxydants non enzymatiques liposolubles.....	27
D. Systèmes antioxydants non enzymatiques hydrosolubles.....	29
E. Métaux de transition.....	32
F. Antioxydants non enzymatiques endogènes.....	32
G. Antioxydant synthétique	36
PARTIE 2 : DOMMAGES DU STRESS OXYDANT	38
I. STRESS OXYDANT ET ALTERATIONS BIOCHIMIQUES A L’ECHELLE MOLECULAIRE.....	39
A. Stress oxydant et altérations des lipides.....	39
B. Stress oxydant et altérations des protéines et des acides aminés.....	45

C. Stress oxydant et altération de l'ADN	50
C.1. Support de l'information génétique.....	50
C.2. Structure de l'ADN.....	50
C.3. Rôle biologique : ADN est « empreinte » de la cellule.....	51
C.4. L'ADN : Molécule cible des ERO.	52
C.4.1 Altération du biopolymère.....	52
C.4.2. Oxydation directe.....	53
C.4.3. Modification de base par fixation de produits secondaires : formation d'adduits de L'ADN.....	56
C.4.4.Modification des sucres de l'ADN.....	56
D. Stress oxydant et altération des glucides	57
II. CONSEQUENCES DIRECTES DES ALTERATIONS BIOCHIMIQUES A L'ECHELLE CELLULAIRE	58
A. Conséquences fonctionnelles des altérations des lipides	58
B. Conséquences fonctionnelles des altérations des protéines	60
B.1. Dysfonctionnements enzymatiques	61
B.2. Dysfonctionnement des anticorps et perte des propriétés antigéniques des protéines.	61
B.3. Dégradation des propriétés physicochimiques et biomécaniques des protéines....	62
B.4. Dysfonctionnement/modulation des récepteurs cellulaires, des signaux de transduction et perturbation des fonctions de régulation	62
B.5. Dysfonctionnement du transport protéique et du métabolisme énergétique.....	63
C. Conséquences fonctionnelles des altérations de l'ADN	64
PARTIE 3 : MESURE DU STRESS OXYDANT.....	66
I. EXPLORATION DU STRESS OXYDANT	67
1. Indication du stress oxydant.....	67
2. Conditionnement et prélèvements	68
3. Traitement pré analytique	70
II. EVALUATION EXPERIMENTALE DU STRESS OXYDANT.....	71
A. Principe de l'exploration du stress oxydant	71

B. Moyens d'exploration.....	71
B.1. Méthodes directes.....	71
B.1.1. Résonance Paramagnétique Électronique.....	71
B.1.2. Chimiluminescence	74
B.2. Méthodes indirectes : témoins de la peroxydation lipidique	75
B.2.1. Mesure de la fluidité membranaire érythrocytaire.....	75
B.2.2. Méthode des TBARS	78
B.2.3. Dosage des peroxydes lipidiques	79
B.2.4. Dosage des aldéhydes produits de la peroxydation lipidique.....	79
B.2.5. Dosage des hydrocarbures volatils expirés.....	82
B.2.6. Dosage des isoprostanes.....	83
B.2.7. Dosage des diènes conjugués.....	84
B.3. Méthodes indirectes : témoins de l'altération des protéines	85
B.4. Méthodes indirectes : témoins de l'altération de l'ADN.....	86
B.5. Méthodes indirectes : Mesure des défenses antioxydantes.....	90
B.6. Mesures des pro-oxydants	99
B.7. Autres moyens de mesure du stress oxydant	103
B.8. l'OSP ou Oxidative Stress Profiling.....	105
III. DEFIS DE L'EXPLORATION DU STRESS OXYDANT	107
IV. ROLE DU PHARMACIEN DANS LE STRESS OXYDANT.....	108
1. Intérêt de la mesure du stress oxydant.....	108
CONCLUSION	112
RESUMES	114
REFERENCES	118



Introduction



INTRODUCTION

L'oxygène est un gaz indispensable à la vie. Il est normalement transformé en molécules d'eau au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette réaction de réduction implique quatre électrons et est rendue possible grâce à un système complexe de protéines et d'enzymes (cytochromes) localisées au niveau de la membrane interne de la mitochondrie. Cette réaction est cruciale, puisqu'elle apporte à la cellule toute l'énergie nécessaire sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) pour assurer ses fonctions vitales. Ce processus mitochondrial n'est toutefois pas parfait, car 2 à 5 % de l'oxygène sont transformés en espèces réactives oxygénées (ERO) [1].

Dans les circonstances quotidiennes normales, ces ERO sont produites en faible quantité comme des médiateurs tissulaires ou des résidus des réactions énergétiques ou de défense, et cela sous le contrôle de systèmes de défense adaptatifs par rapport au niveau de radicaux présents. Dans ces conditions, on dit que la balance pro-oxydants/anti-oxydants est en équilibre. Cette dernière peut être rompue pour diverses raisons en faveur du système pro-oxydant et est alors à l'origine d'un stress oxydant [2].

L'apparition de pathologies liées au stress oxydant implique bien souvent un déséquilibre entre production des espèces oxydantes et systèmes d'élimination de ces dernières. C'est le cas de certains cancers, de maladies cardio-vasculaires et de maladies inflammatoires. C'est pourquoi il paraît judicieux de développer la détection de nombreux biomarqueurs permettant de faire état du « statut oxydatif » de l'organisme et de suivre leur évolution au cours d'un traitement anticancéreux ou anti-inflammatoire par exemple. Un biomarqueur peut être considéré comme toute molécule biologique de l'organisme permettant de suivre un état physiopathologique. Ainsi l'objectif de ce travail de présenter les principaux biomarqueurs du stress oxydant et leurs méthodes d'exploration.

Un bilan de Stress Oxydatif permettra, à la vue des résultats et en fonction des déséquilibres observés, d'instaurer une supplémentation par des compléments alimentaires correctement dosés. L'évaluation du degré de Stress Oxydatif d'un individu passe par la réalisation d'un bilan sanguin avec dosage ciblé de quelques biomarqueurs [1,3]



Partie 1 :
Systeme oxydant et systeme
antioxydant



I. STRESS OXYDANT

A. Définition

Le stress oxydant se définit comme un déséquilibre de la balance entre les systèmes de défenses anti-oxydants et la production d'ERO, en faveur de ces dernières. Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, telles que la surproduction endogène d'agents prooxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (tabac, alcool, médicaments, rayons gamma, rayons ultraviolets, herbicides, ozone, amiante, métaux toxiques) [3].

Ce déséquilibre entre les systèmes de défense et de production des radicaux libres entraîne des lésions biochimiques au niveau des cellules de l'organisme du fait de leurs conséquences sur le plan moléculaire, telles que les altérations au niveau des protéines, l'apparition de cassures au niveau de l'ADN, ou des atteintes de l'intégrité de la membrane cellulaire par l'induction de la peroxydation lipidique [4].

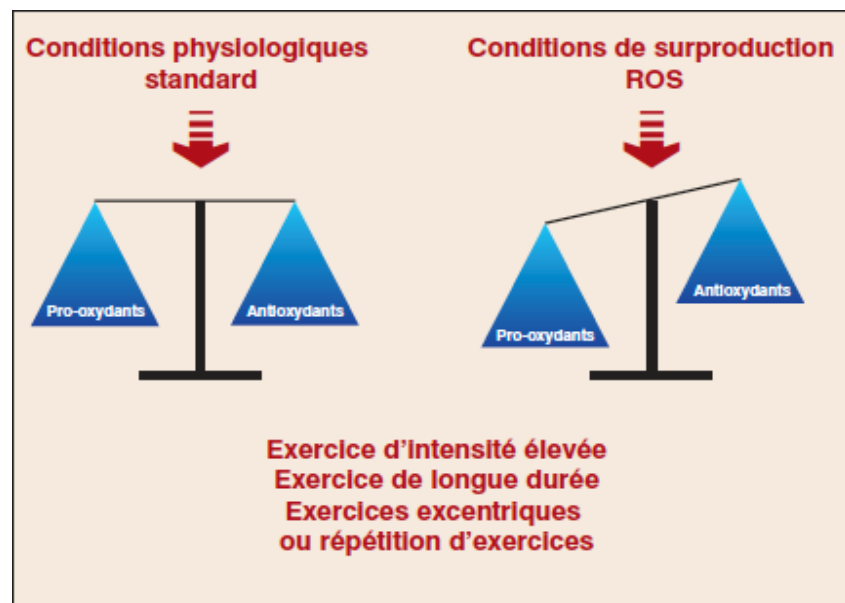


Figure 1 : La balance entre les systèmes de défenses antioxydants et la production d'ERO [4].

B. Les espèces réactives de l'oxygène

Les ERO produites par les cellules ont très longtemps été vues comme des produits toxiques du métabolisme, pouvant dégrader les macromolécules lipidiques, protéiques ou l'acide nucléique désoxiribosique (DNA) de la cellule. Pour se protéger de ces effets délétères, les cellules possèdent d'ailleurs plusieurs enzymes anti-oxydantes telles que la superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase. Le stress oxydant intracellulaire est un déséquilibre de la balance entre la production d'ERO et la capacité anti-oxydante de la cellule à empêcher les lésions oxydatives.

Une surproduction d'ERO et/ou un déficit en systèmes antioxydants sont, à ce titre, impliqués dans les mécanismes physiopathologiques de nombreuses pathologies : athérosclérose, diabète, maladies neurodégénératives. Toutefois, on sait qu'aujourd'hui les ERO et les espèces réactives de l'azote (ERN), tel que le monoxyde d'azote NO° , sont avant tout des acteurs importants de la signalisation cellulaire et de la régulation des métabolismes [5].

B.1. Définition

Les radicaux libres sont des espèces chimiques possédant un électron célibataire (ou non apparié) sur leur couche périphérique. Le champ magnétique créé par la rotation de cet électron, ou spin, n'est pas compensé par la rotation en sens inverse d'un électron apparié. Cette propriété rend les radicaux libres aptes à réagir avec différentes molécules, dont les composés cellulaires : lipides, protéines et acides nucléiques, notamment lors de réaction en chaînes dont l'exemple le plus connu est celui de la peroxydation des lipides. Les radicaux libres issus de la réduction monovalente de l'oxygène constituent les ERO [6].

Les espèces oxydantes sont des dérivés de l'oxygène radicalaire ou non, hautement réactifs et instables, impliqués dans de nombreux processus biologiques [7]. Parmi ces espèces, les moins réactives comme l'ion superoxyde (O_2°) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) sont peu impliqués dans la dégradation protéique, mais ont la capacité de diffuser à travers les membranes et ainsi d'agir à des distances de façon relativement importante. Ils

sont également à l'origine d'espèces plus réactives comme le peroxyde d'azote (NO_2^\bullet) et le radical hydroxyle (OH^\bullet) comparées à l'ion superoxyde et au peroxyde d'hydrogène. Le peroxyde d'azote est obtenu par interaction entre $\text{O}_2^{\bullet-}$ et l'oxyde nitrique (NO), un radical vasodilatateur produit par de nombreuses cellules comme les phagocytes et les cellules vasculaires endothéliales [8].

B.2. Les principales ERO dans la cellule

B.2.1. ERO radicalaires

❖ L'anion superoxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$

C'est l'une des premières ERO à être formées, par réduction d'une molécule d' O_2 . Sa demi-vie longue comparée aux autres ERO est contrebalancée par le fait que les membranes biologiques lui sont relativement imperméables; il reste ainsi moyennement dangereux. Il peut conduire à la formation du peroxyde d'hydrogène par la réaction suivante: $2 \text{O}_2^{\bullet-} + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ [9].

Cette réaction peut être bénéfique comme délétère pour l'organisme :

- Bénéfique car on passe d'une espèce très oxydante -le radical superoxyde- à une espèce moins oxydante -le peroxyde d'hydrogène ; c'est d'ailleurs l'étape catalysée par une enzyme antioxydante la Superoxyde Dismutase (SOD).

- Délétère car le peroxyde d'hydrogène peut être à l'origine d'autres ERO, par la réaction de Fenton.

❖ Le radical hydroxyl HO^\bullet

Il est certainement l'ERO la plus destructrice pour la cellule et ses composants. Malgré une durée de vie très brève et l'impossibilité pour lui de franchir les membranes, il possède une très grande réactivité liée à un potentiel oxydant très élevé [10]. Il est à l'origine de la formation des radicaux peroxy.

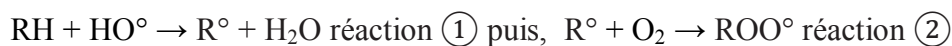
❖ *L'oxyde nitrique NO°*

L'oxyde nitrique est un gaz qui ainsi diffuse bien à travers les membranes. Il est synthétisé par une enzyme, l'oxyde nitrique synthase NOS à partir d'O₂ et d'un acide aminé, la L-arginine. Il n'est vraiment délétère pour la cellule que lorsqu'il est présent en quantité importante et qu'il génère ainsi une autre ERO : le peroxyde nitrite NO₃⁻.

❖ *Les radicaux peroxy ROO°*

Ils font plutôt partie de la « deuxième vague » d'ERO, dans la mesure où leur formation fait suite à une réaction d'oxydation d'acides gras polyinsaturés par d'autres ERO formées préalablement.

La partie « R » correspond à un acide gras polyinsaturé. Leur formation comprend 2 étapes principales : la première (réaction 1) correspond à la perte d'un atome d'hydrogène causée notamment par un radical hydroxyl, et la seconde (réaction 2) à la liaison avec une molécule d'oxygène [10, 11]:



Le radical peroxy est très instable. Pour gagner en stabilité, il peut :

- récupérer un atome d'hydrogène, notamment en « l'arrachant » à un acide gras polyinsaturé voisin. Cela conduira au redémarrage d'une nouvelle réaction similaire jusqu'au dernier acide gras polyinsaturé accessible, autrement dit à une réaction en chaîne:



- subir un réarrangement moléculaire à savoir l'apparition d'un cycle avec les 2 atomes d'oxygène ; le peroxyde cyclique ainsi formé pourra donner naissance, par hydrolyse ou chaleur, au malondialdéhyde (MDA). Il constitue un des nombreux marqueurs du stress oxydant.

RH pourrait aussi bien être un acide gras monoinsaturé, voire même un acide gras saturé. Toutefois la double liaison est plus sensible à une oxydation, ce qui fait que ce sont les acides gras polyinsaturés les cibles majoritaires [10].

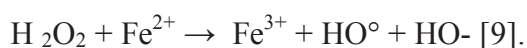
B.2.2. ERO non radicalaires

❖ L'oxygène singulet 1O_2

Il correspond à une forme excitée de l'oxygène O_2 : il possède la même structure électronique que l'oxygène mais 'agencée' différemment, à savoir que les électrons de la couche externe initialement non appariés se sont appariés. Il n'est donc pas radicalaire. Son état 'excité' lui confère un potentiel oxydant supérieur à celui de l'oxygène [12].

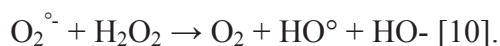
❖ Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2

Il est relativement stable, possède une demi-vie longue, et les membranes biologiques lui sont perméables. Il est peu dangereux en soi pour la cellule, mais il constitue la source du radical hydroxyl HO° par la réaction de Fenton qui est une réaction d'oxydation avancée aboutissant à la formation du radical hydroxyle OH° qui est l'un des oxydants le plus puissant, Au cours de cette réaction, le peroxyde d'hydrogène (ou eau oxygénée) oxyde le fer ferreux (ou ion fer II) selon la réaction d'oxydo-réduction :



Le mélange fer ferreux et peroxyde d'hydrogène est appelé réactif de Fenton.

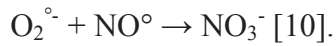
Certains auteurs préfèrent alors considérer la réaction de l'anion superoxyde avec le peroxyde d'hydrogène, catalysée par un ion métallique tel que le fer ; cette réaction est appelée réaction d'Haber-Weiss :



L'importance in vivo de cette réaction est encore largement débattue, dans la mesure où l'ion ferreux Fe^{2+} existe rarement à l'état libre, et souvent maintenu par le potentiel rédox de la cellule en ion ferrique Fe^{3+} [13].

❖ *Le peroxyinitrite NO₃⁻*

Son apparition est extrêmement rapide, et se produit par une réaction entre deux ERO produites très vite au cours du processus de stress oxydant :



A l'instar du radical hydroxyl, NO₃⁻ est une ERO qui cause beaucoup de dommages aux composants cellulaires.

❖ *L'acide hypochloreux HClO*

Il est formé à partir du peroxyde d'hydrogène. Il passe facilement à travers les membranes biologiques, et peut altérer les constituants protéiques de la cellule à cause de son fort pouvoir oxydant.



B.2.3. Les métaux de transition

Les métaux de transition ne sont pas des ERO à proprement parler. Mais ils possèdent de nombreux électrons non appariés qui, après fixation sur divers ligands (formation de complexes métalliques), peuvent être transférés vers l'oxygène ou ses ERO. Ils participent ainsi à la formation de davantage d'ERO [14]. C'est le cas du fer avec la réaction de Fenton.

D'autres métaux de transition comme le cuivre ou le manganèse sont aussi cités [12]. Pour autant il ne s'agit pas de considérer les métaux de transition comme uniquement prooxydant : en effet la plupart d'entre eux sont des cofacteurs enzymatiques importants.

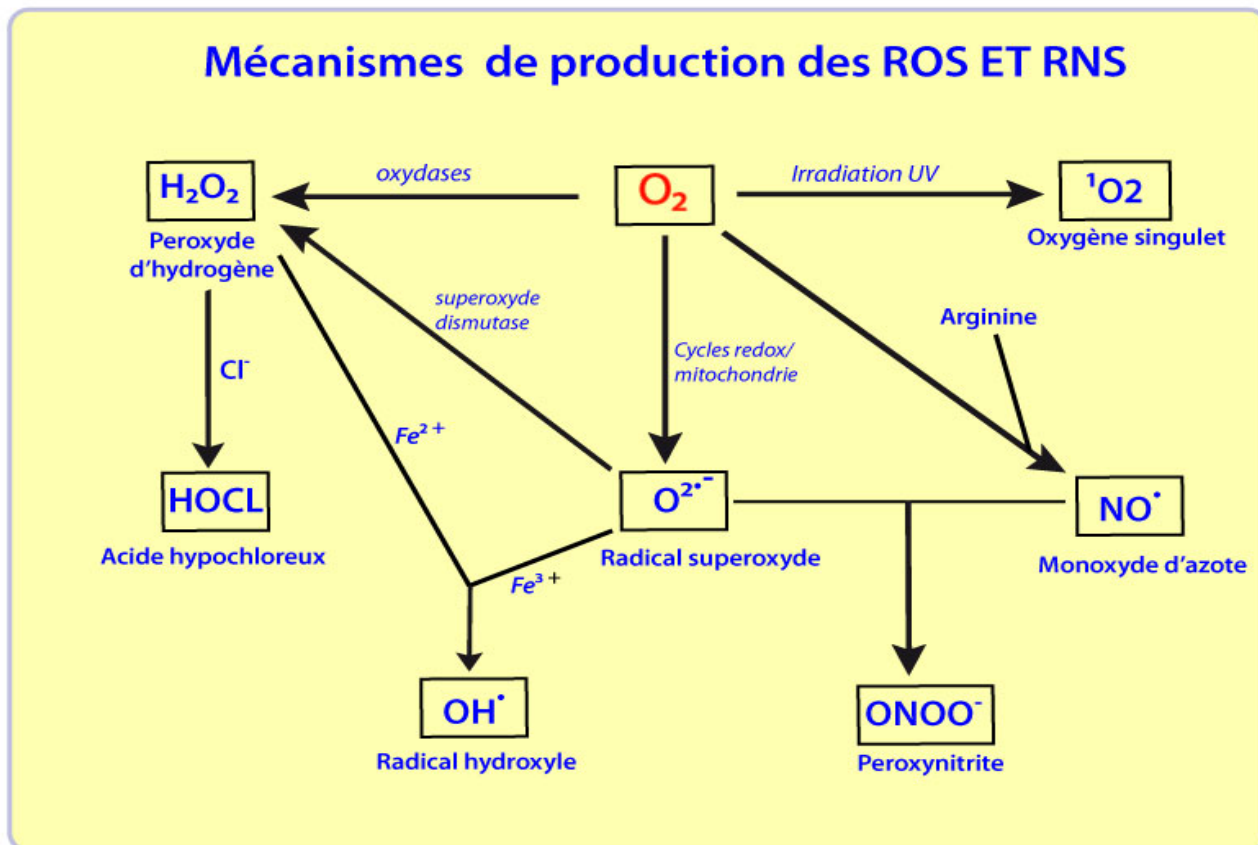


Figure 2 : Différents espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERN) et leurs mécanismes de productions [7]

Un récapitulatif des principales ERO et de leurs propriétés est présenté dans le Tableau 1.

Tableau I : Principales ERO et leurs propriétés

catégorie	Espèce	caractéristiques	ERO Secondaire(s) Produite(s)	Cibles biologiques	Demi-vie
ERO radicalaires	$O_2^{\circ -}$ anion superoxyde	Peu dangereux en soi car peu diffusible	H_2O_2, NO_3^-	Acides gras polyinsaturés	Quelques sec
	HO° radical hydroxyle	ERON la plus dangereuse	ROO°	Acides gras polyinsaturés ADN Protéines	10-9 secs
	NO° oxyde nitrique	Gaz donc diffuse bien Peu dangereux en soi	NO_3^-		Quelques secs
	ROO° radicaux peroxy	ERO de la « 2ème vague ».		Acides gras polyinsaturé voisin	10-1 secs
ERO non radicalaires	1O_2 oxygène singulet	Très réactif	$O_2^{\circ -}$		10-6 secs
	H_2O_2 peroxyde d'hydrogène	Antiseptique	$HO^{\circ}, HClO$		Dizaines de secondes
	NO_3^- peroxynitrite	Très agressif		Protéines	
	$HClO$ acide hypochlorite	Diffuse bien		Protéines	
Métaux de transition	Fe, Cu, Mn fer, cuivre, manganèse	Si forme libre caractère radicalaire Catalysent certaines réactions de formation d'ERO <i>Mais</i> propriétés anti oxydantes importantes si forme liée	HO°		

B.3. Sites de production des ERO

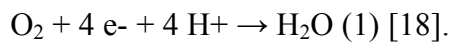
La production des ERO dans les cellules des mammifères est essentiellement d'origine enzymatique et résulte de plusieurs sources: la NAD(P) H oxydase membranaire et le complexe enzymatique mitochondrial de la chaîne respiratoire sont les principales sources. D'autres origines, cytosoliques ou présentes au sein de différents organites cellulaires, peuvent également jouer un rôle dans la modulation de la signalisation intracellulaire : xanthine oxydase, enzymes de la voie de l'acide arachidonique [5].

✓ La membrane mitochondriale

Les EROs sont également générés au niveau de la membrane mitochondriale interne, près de laquelle est localisé l'ADN mitochondrial. La mitochondrie est le siège d'un métabolisme important de l'oxygène. Lorsque ce métabolisme est incomplet, des EROs sont produits et peuvent sortir de la mitochondrie. Les complexes I et III de la chaîne mitochondriale semblent être à l'origine de la fuite des électrons. Ainsi, compte tenu de l'intense activité de la chaîne respiratoire dans les organismes aérobies, la fuite des électrons d'origine mitochondriale semble être la source majoritaire d'EROs dans la cellule, devant les activités de la NADPH oxydase membranaire [15, 16].

La mitochondrie est un organite intracellulaire ubiquitaire hautement spécialisé dans la production d'énergie sous forme d'ATP, indispensable aux fonctions cellulaires. La production d'énergie sous forme d'ATP se fait à partir du catabolisme des nutriments. Ceux-ci sont pris en charge par le cycle de Krebs, voie métabolique particulière qui libère très peu d'énergie sous forme de liaison phosphate mais permet l'oxydation complète de l'acétyl CoA. L'énergie ainsi libérée est transformée sous forme d'équivalents réduits, NADH, H⁺ et FADH₂, substrats donneurs d'électrons à la chaîne respiratoire mitochondriale. Les électrons sont transférés tout le long de la chaîne respiratoire au cours des réactions d'oxydoréduction jusqu'à l'accepteur final, l'oxygène. Les formes réduites, NADH, H⁺ et FADH₂, cèdent respectivement leurs électrons au complexe I et II de la chaîne respiratoire mitochondriale [17].

La majeure partie de l'oxygène que nous respirons subit une réduction tétravalente (addition de 4 électrons, réaction (1)) conduisant à la production d'eau. Cette réaction est catalysée par le cytochrome oxydase, accepteur terminal d'électrons présents dans le complexe IV de la chaîne de transport des électrons située dans la membrane interne mitochondriale (voir figure 3).



Toutefois, cette chaîne de transport peut laisser « fuir » une certaine proportion d'électrons qui vont réduire l'oxygène, mais en partie seulement. C'est ainsi qu'environ 2 % de l'oxygène subit une réduction monoélectronique (addition d'un seul électron, réaction (2)) conduisant à la formation du radical superoxyde $\text{O}_2^{\cdot -}$, au niveau de l'ubiquinone (ou coenzyme Q).

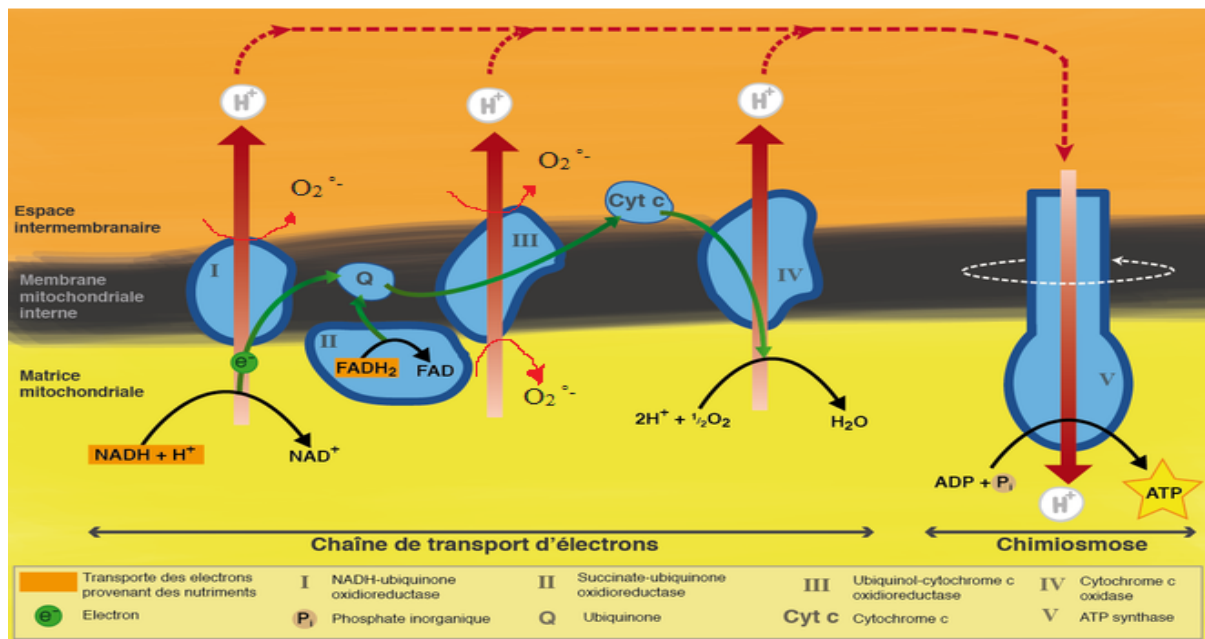
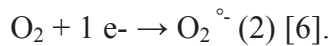
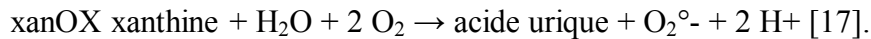


Figure 3 : Formation des ERO dans la chaîne respiratoire [17].

✓ Le complexe xanthine déshydrogénase (XanDh)/ xanthine oxydase (xan OX)

Dans les conditions normales la xanDH transforme la xanthine en acide urique en donnant les électrons au NADP +. En cas d'hypoxie, la xanthine est alors formée par le métabolisme anaérobie et la xanDH est convertie en xanOX. Lors de la reperfusion, il y a afflux massif d'O₂ et ainsi la xanOX transforme la xanthine en donnant des électrons à O₂, ce qui conduit à la formation d'O₂^{°-}.



La xanthine est formée à partir d'hypoxanthine, au cours d'une réaction également catalysée par la xanDH et la xanOX. Ce complexe enzymatique se situe dans les cellules endothéliales [15].

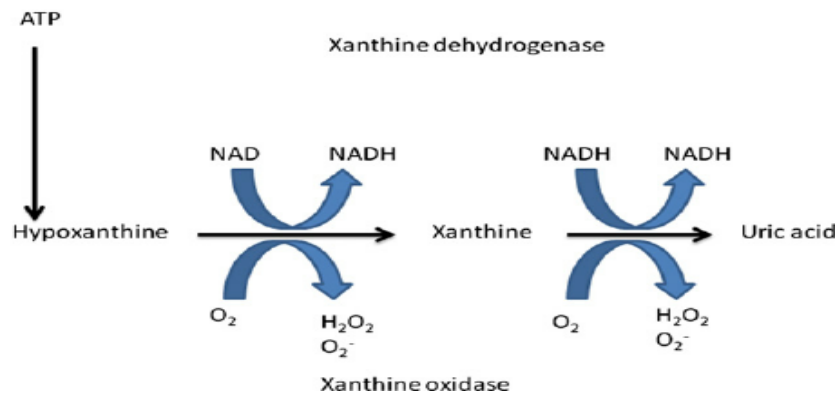


Figure 4 : Réaction de catalyse de l'hypoxanthine [15].

✓ Les enzymes et cellules de l'inflammation

On trouve dans cette rubrique 2 enzymes essentielles:

✚ La NADPH oxydase est un complexe multimérique, présent de manière constitutionnelle dans toutes les cellules au niveau de la membrane cytoplasmique. Elle catalyse la réduction mono-électronique de l'oxygène en utilisant le NADPH comme donneur d'électrons, pour produire 2 molécules d'anions superoxyde O₂^{°-}.

L'enzyme est ancrée dans toute l'épaisseur membranaire, définissant ainsi des domaines intra-, trans- et extra-membranaires.

Cette disposition lui permet donc d'interagir avec le substrat intracellulaire (NADH, H⁺ ou NADPH, H⁺) et de libérer l'anion superoxyde O₂^{•-} de façon préférentielle soit à l'extérieur, soit à l'intérieur des cellules [19].

La NADPH oxydase (NOX) est une enzyme composée de plusieurs sous-unités associées aux membranes cellulaires ou localisées dans le cytosol [20].

Le rôle des NADPH oxydases a été très étudié dans les cellules phagocytaires. Ainsi, l'isoforme phagocytaire de la NOX activée produit de larges quantités d'O₂^{•-} et de ses dérivés. O₂^{•-} est ensuite rapidement dismuté en H₂O₂ qui donnera OH[°]. Lors de l'inflammation, cette production massive d'EROs, est appelée la flambée respiratoire ou «burst oxydatif » et joue un rôle clé dans la première ligne de défense contre les organismes pathogènes.

Plusieurs isoformes de la NOX non phagocytaire sont également présentes dans les cellules nerveuses, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les cardiomyocytes, les adipocytes, et les hépatocytes. Ces NOX sont capables d'utiliser aussi bien le NADPH que le NADH pour produire des EROs [21].

✚ la myéloperoxydase se trouve uniquement dans les polynucléaires neutrophiles. Elle génère quant à elle l'acide hypochloreux HClO, l'oxygène singulet ¹O₂, ou le radical hydroxyl HO[°] [17].

✓ L'oxyde nitrique synthase NOS

La synthèse de NO[•] est catalysée par les NO synthases (NOS). Il en existe 3 isoformes canoniques : Neuronale ou nNOS ; Inductible ou iNOS ; Endothéliale ou eNOS.

Les nNOS et les eNOS, constitutives, se caractérisent par une activation rapide et transitoire permettant de faciliter la transmission synaptique ou d'induire la vasodilatation en réponse à des changements du débit sanguin. L'effet de la iNOS est lié quant à la modulation de son expression, par exemple par des médiateurs inflammatoires [22].

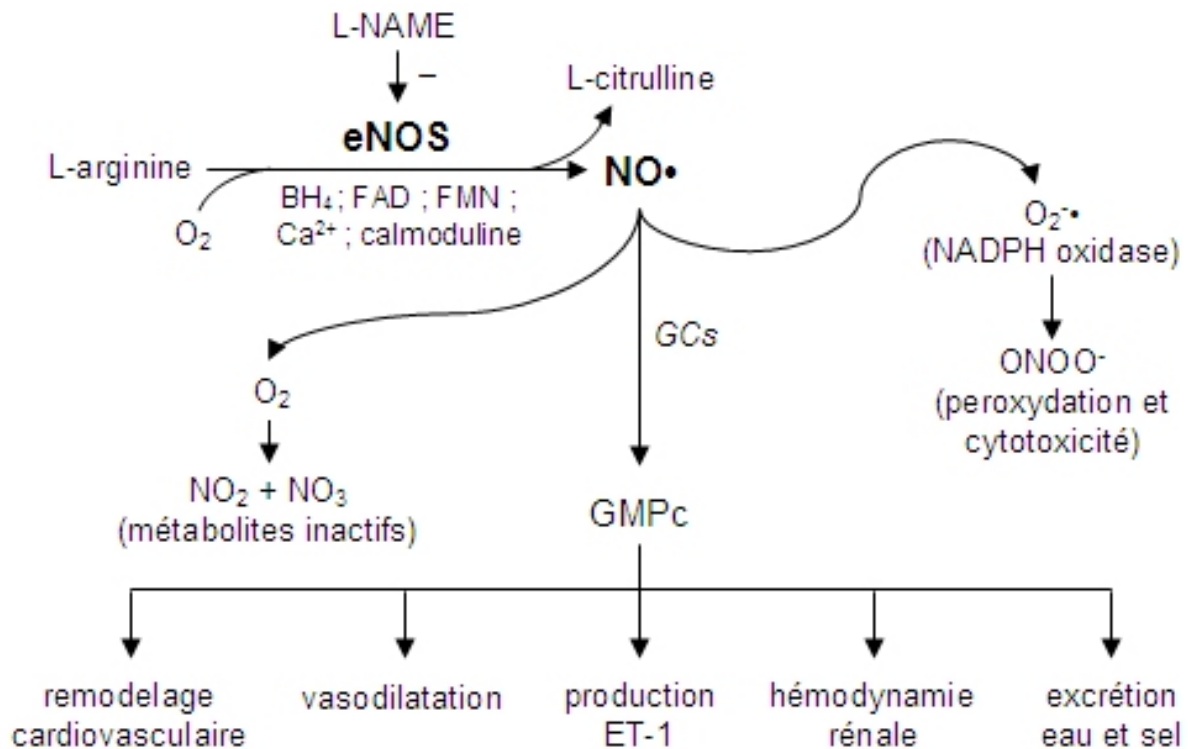
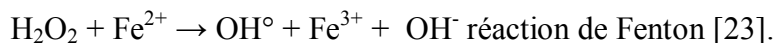


Figure 5 : Production du NO° et ses rôles [22].

✓ Ion métallique

La majeure partie de la toxicité de l'eau oxygénée provient de sa capacité à générer le radical hydroxyle OH° en présence de cations métalliques tels que Fe²⁺ ou Cu⁺. Le radical hydroxyle est particulièrement délétère vis-à-vis des matériaux biologiques comme nous le verrons par la suite.



✓ Autres oxydations

L'apparition de radicaux superoxydes peut résulter de l'auto-oxydation (oxydation par l'oxygène) de composés tels que des neuromédiateurs (adrénaline, noradrénaline, dopamine...), des thiols (cystéine), des coenzymes réduits, mais aussi de la détoxification des xénobiotiques (toxiques, médicaments) par le système des cytochromes P450 présents au niveau du réticulum endoplasmique [15].

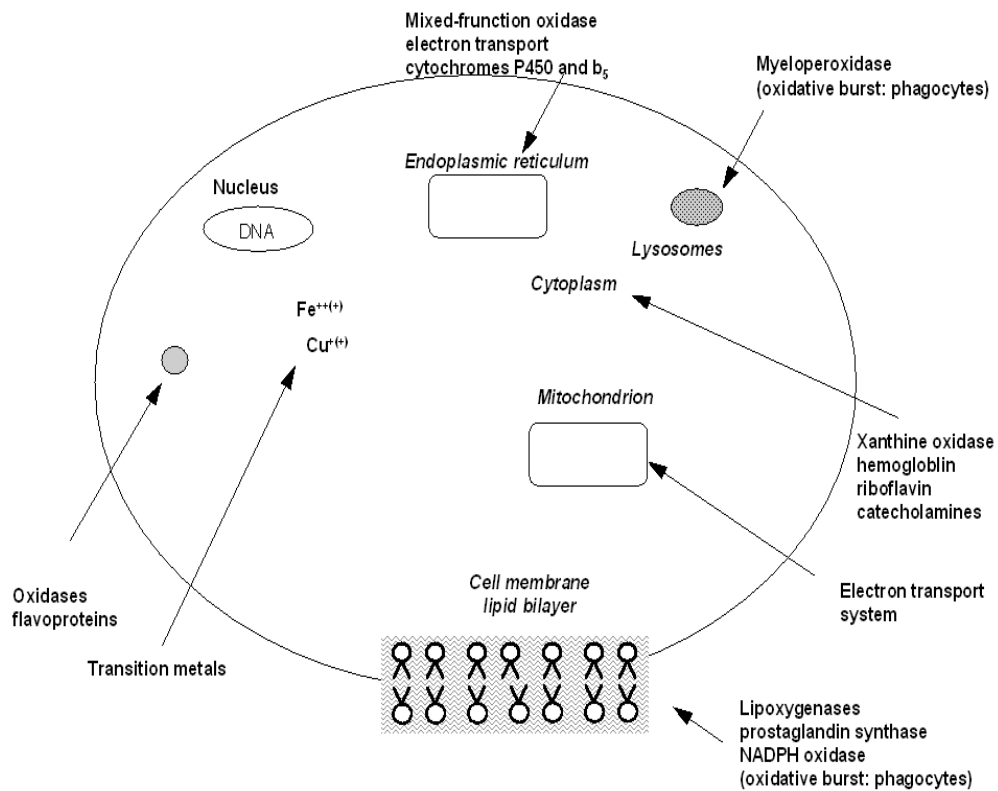


Figure 6 : Principales sources cellulaires de radicaux libres [15].

B.4. Circonstance d'apparition des ERO

✓ A l'état physiologique

Il y a physiologiquement environ 1 à 3% de l'O₂ qui échappe à la chaîne respiratoire et donne des ERO. Donc il faut garder à l'esprit que même à l'état 'normal' un organisme produit des ERO.

Concernant les autres circonstances, on distingue deux : d'un côté celles qui sont dues à l'organisme lui-même ou « endogènes », et de l'autre celles où il y a intervention d'un élément extérieur ou « exogènes » [16].

✓ Circonstances « endogènes » d'apparition d'ERO

Toute forme de stress en particulier psychologique est responsable d'une augmentation du stress oxydant, sans doute par auto-oxydation des catécholamines.

Il est également reconnu que toute inflammation participe à l'apparition d'un stress oxydant, via certaines cellules de l'inflammation [24].

Enfin il est bien prouvé que l'effort physique est générateur d'ERO : cela a été établi aussi bien chez l'homme que chez l'animal [10, 25, 26, 18, 16, 27].

Plusieurs explications ont été avancées : la plus évidente est que l'effort entraîne une consommation accrue en O₂, ce qui sature les systèmes de phosphorylation de la mitochondrie et donc accroît la part d'O₂ qui échappe à cette chaîne [15].

D'autres explications sont également rapportées: l'ischémie-**reperfusion** du muscle via le **complexe xanthine oxydoréductase**, **l'inflammation suite aux dommages tissulaires** dans le muscle à l'effort et même de manière surprenante en condition anaérobie à cause des lactates produits [28, 27, 29, 30].

Il est également reconnu que toute inflammation participe à l'apparition d'un stress oxydant, via certaines cellules de l'inflammation [24].

Il a été montré que l'hyperthermie présente à l'effort est aussi responsable de stress oxydant; le mécanisme sous-jacent n'est pas connu [31].

✓ Circonstances « exogènes » d'apparition d'ERO

On peut citer en premier l'alimentation : en effet il a été démontré chez l'homme qu'une alimentation riche en protéines, ou riche en lipides, ou très hyperglycémiant entraîne plus de dommages radicalaires, alors qu'une restriction protéique ou une restriction lipidique permettent de diminuer le stress oxydant [32, 33].

L'apport de lipides, de protéines ou d'un excès de glucides entraînent une augmentation du métabolisme, obligatoirement aérobie puisque seul le glucose (s'il est en quantité raisonnable) peut être métabolisé par voie anaérobie, et donc une augmentation de la production d'ERO [34].

De même une cuisson trop importante (aliments "brûlés") des viandes ou poissons ou huiles favorisent la formation d'ERO. A l'inverse certains aliments sont riches en antioxydants : les agrumes sont riches en vitamine C, les céréales en vitamine E, les carottes et tomates en β -carotène, les fruits de mer et la viande en oligoéléments (fer, sélénium), ou encore le thé vert, le vin rouge et le cacao en flavonoïdes [34].

Remarque : une étude récente du département américain de l'Agriculture (USDA) a passé en revue la capacité antioxydante globale de 277 fruits, légumes, noix et épices: il en est ressorti que les aliments au pouvoir antioxydant in vitro le plus élevé sont les haricots rouges, suivis par les fruits rouges : myrtilles, mûres, framboises [35].

Les conditions d'hypoxie rencontrées en altitude sont également responsables d'une majoration du stress oxydant. Il semblerait que le mécanisme présente des similitudes avec ce qu'on retrouve pour l'ischémie-reperfusion, et qu'il y ait à la fois augmentation des ERO et baisse des défenses antioxydantes. Le stress oxydant produit est d'autant plus fort que l'altitude est élevée ou que la transition 'basse altitude-haute altitude' est rapide [36].

Il a aussi été montré chez l'homme que l'exposition au froid accroît la production d'ERO et fait chuter les défenses antioxydantes [37]. Enfin on trouve aussi comme facteurs exogènes les polluants atmosphériques, la fumée de cigarette, certains pesticides et les radiations [16].

Les principales circonstances d'apparition du stress oxydant sont résumées dans le Tableau II.

Tableau II : Principales circonstances d'apparition du stress oxydant
Circonstances d'apparition des ERO

Physiologique

Toute forme de stress (psychologique en part.)

Ischémie-reperfusion

Inflammation

Effort physique intense (aérobie et anaérobie)

Alimentation déséquilibrée

Altitude

Environnement froid

Polluants : atmosphériques, cigarettes, alcool, pesticides

Radiations

B.5. Rôle physiologique des ERO

✓ La dualité des ERO

La connaissance des mécanismes moléculaires empruntés par les ERO dans la signalisation cellulaire a subi une expansion considérable au cours de ces dernières années, et a contribué à mieux appréhender leurs multiples fonctions. Il est par exemple certain aujourd'hui que l'expression du programme génétique des cellules peut varier en réponse aux modifications des taux d'ERO intracellulaires [38, 39].

Les fortes concentrations en ERO sont impliquées de façon prépondérante dans les dommages oxydatifs infligés aux biomolécules, pouvant mener la cellule vers l'apoptose ou la nécrose. Toutefois, pour des concentrations faibles ou modérées, les ERO possèdent un rôle important au sein de la signalisation cellulaire [40].

Cette dualité est étroitement liée aux variations de la concentration des ERO au sein de la cellule et à l'état des mécanismes de compensation visant à les éliminer. Ainsi les ERO sont capables d'entraîner soit une réponse cellulaire négative (arrêt de croissance ou mort cellulaire), soit une réponse cellulaire positive (prolifération cellulaire).

✓ *ERO et mort cellulaire*

Les effets délétères des ERO apparaissent quand leur concentration cellulaire est élevée. Les antioxydants sont alors submergés et ne peuvent pas compenser le stress oxydatif. Les mécanismes radicalaires des ERO sont largement impliqués dans ce processus dégénératif. Dans de telles situations, la protéine p53 sensible aux dommages causés à l'ADN, est capable de déclencher la mort cellulaire programmée pour éviter la transformation oncogénique. Le gène codant pour la protéine p53 est par ailleurs qualifié de gène suppresseur de tumeurs et dénommé « gardien du génome » en raison de sa capacité à déclencher l'apoptose dans les situations critiques [41].

L'induction d'un stress oxydatif est d'ailleurs un mécanisme partagé par les techniques thérapeutiques non chirurgicales du cancer [42].

En effet, la plupart des chimiothérapies et la radiothérapie génèrent des ERO par différents moyens afin d'exercer leur action anticancéreuse. Les ERO jouent alors le rôle déterminant de médiateurs de l'apoptose [43].

✓ *ERO et prolifération cellulaire*

Les recherches concernant l'implication des ERO dans les pathologies humaines ont permis de dégager la perspective majeure suivante : un stress oxydatif modéré, pour lequel les concentrations en ERO augmentent légèrement sans dépasser les limites toxiques, potentialise la prolifération cellulaire et inhibe l'apoptose [42,44].

Ces activités s'exercent entre autre par la régulation de la phosphorylation des protéines et par l'activation de certains facteurs de transcription. Par exemple, en cas de stress oxydant modéré, les phosphatases subissent une oxydation de leurs résidus cystéine conduisant à une inactivation par modification conformationnelle.

Cette restructuration protéique altère la fonction de déphosphorylation des phosphatases et laisse le champ libre aux voies de signalisation cellulaire dépendantes des kinases, à l'exemple de la PI3-kinase (PI3K) impliquée dans la croissance, la prolifération et la différenciation cellulaire. Les différentes voies de signalisation impliquant des kinases participent à l'activation de facteurs de transcriptions permettant de modifier le statut redox. De cette façon, le taux élevé des ERO caractérisant les cellules tumorales, est maintenu en dessous du seuil toxique capable d'engendrer l'apoptose [39].

En raison de cette dualité d'action des ERO, l'approche thérapeutique peut être ambiguë car elle peut être pro-oxydante ou antioxydante. La supplémentation en antioxydants ne doit ni empiéter sur des thérapeutiques pro-oxydantes visant à éliminer les cellules, ni permettre aux cellules tumorales d'échapper à une surproduction des ERO.

II.SYSTEME DE DEFENSE ANTIOXYDANT

A. Définition

L'organisme est doté d'un ensemble de systèmes de défenses très efficaces contre la surproduction d'ERO et d'ERN. Le terme d'antioxydant désigne toute substance qui, présente à faible concentration par rapport à celle du substrat oxygène, retarde ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat [46]. Les cellules utilisent ainsi de nombreuses stratégies anti-oxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leur niveau d'espèces réactives de l'oxygène. La nature des systèmes antioxydants diffère selon les tissus et les types cellulaires et selon qu'on se trouve dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire. Dans le système de défense antioxydant de notre organisme, on distingue des systèmes enzymatiques et des systèmes non enzymatiques [47].

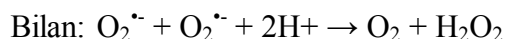
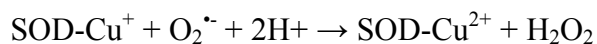
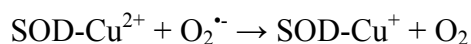
i. Système enzymatique

- superoxydes dismutases

Les superoxyde dismutases sont capables d'éliminer l'anion superoxyde en produisant une molécule d'oxygène et une molécule de peroxyde d'hydrogène. Il existe plusieurs isoenzymes qui diffèrent selon la localisation chromosomique du gène, leur contenu métallique, leur structure quaternaire et leur localisation cellulaire.

La structure des superoxydes dismutases est bien conservée lors de l'évolution et présente un puit hydrophobe au centre de la protéine dans lequel se glisse l'anion superoxyde [48].

Les superoxyde dismutases à cuivre zinc catalysent les réactions suivantes :



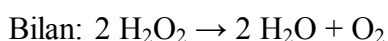
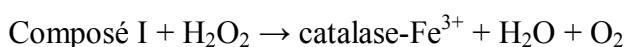
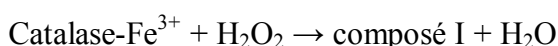
Le peroxyde d'hydrogène formé est pris en charge par les catalases (présentes en particulier dans les hématies et les peroxysomes hépatiques) et les glutathion peroxydases à sélénium [48].

Tableau III : Caractéristique des isoformes du superoxyde Dimutase

Isoforme	Cofacteurs	Localisation
SOD1 ou Cu, Zn-SOD	Cu, Zn	Cytosolique surtout, nucléaire, mitochondriale
SOD2 ou Mn-SOD	Mn	Mitochondriale
SOD3 ou Ec-SOD	Cu, Zn	Extracellulaire

• Catalase

La catalase est une enzyme capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. La réaction catalysée par cette enzyme consiste en une dismutation du peroxyde d'hydrogène :



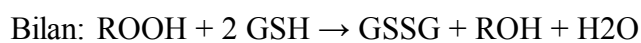
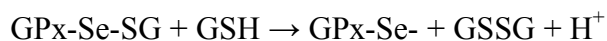
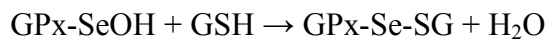
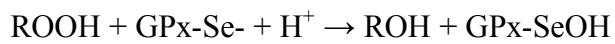
La catalase est composée de 4 sous-unités protéiques, chacune contenant un groupement hémique avec Fe³⁺ lié au site actif. Chaque molécule a habituellement une molécule de NADPH, H⁺ qui lui est liée, la protégeant ainsi d'une éventuelle inactivation par le peroxyde d'hydrogène. La dissociation des sous-unités résulte en une perte de l'activité catalase [49].

• Glutathions peroxydases

Les glutathions peroxydases constituent sans doute l'un des plus importants systèmes enzymatiques de protection car elles sont capables de détoxifier le peroxyde d'hydrogène, mais aussi d'autres hydroperoxydes résultant de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras en couplant la réduction de l'hydroperoxyde avec l'oxydation d'un substrat réducteur comme le glutathion, le cytochrome c, le NADH (NADH peroxydases) [50].

Toutes les glutathion peroxydases contiennent dans leurs sous unités un à quatre atomes de sélénium selon l'isoenzyme. Des glutathion peroxydases à sélénium sont retrouvées dans le plasma (pGPx), dans le cytosol (cGPx), au niveau de la membrane cellulaire (HPGPx), et on retrouve une isoenzyme qui est spécifique aux cellules digestives (GIGPx) [51].

Elles fonctionnent toutes selon le mécanisme catalytique suivant :



La première étape consiste en une oxydation du groupement séléniol de l'enzyme par un hydroperoxyde (ROOH), suivie de la liaison successive de deux molécules de glutathion (GSH) avec régénération de l'enzyme sous sa forme réduite. L'activité anti-oxydante de ces peroxydases est cependant très dépendante de l'apport nutritionnel en sélénium. Le glutathion oxydé (GSSG) sera régénéré grâce à l'intervention de la glutathion réductase qui agit par oxydation du NADPH, H⁺, formé principalement par la voie des pentoses phosphates [52].

D'autres enzymes comme la glutathion transférase, les thiorédoxines réductases ou les thiorédoxines peroxydases et l'hème oxydase présentent également une activité anti-oxydante relativement importante.

B. Systèmes enzymatiques accessoires

A côté des 3 principales enzymes antioxydantes, on trouve d'autres enzymes dont le rôle est moins important [10] :

• Systeme Thioredoxine

Il est constitué d'une protéine possédant un groupement thiol, la thioredoxine, et d'une enzyme, la thioredoxine réductase. La thioredoxine contribue à maintenir les protéines intracellulaires à l'état réduit. La thioredoxine réductase est une enzyme sélénodépendante. Elle catalyse la réduction de la thioredoxine oxydée, autrement dit sa régénération aux dépens d'une molécule de NADPH, et permet également de réduire les peroxydes lipidiques et de régénérer la vitamine C [53].

- Glutaredoxine

Elle assure la protection des groupements thiols, par une réaction redox entre un NADPH et un substrat disulfide [54].

- Peroxiredoxine

Il s'agit d'une peroxydase, c'est-à-dire qu'elle est capable de réduire un peroxyde lipidique ROOH, ou un peroxyde nitrique NO₃⁻, à partir de la thioredoxine [55].

- Paraoxonases

Ce sont des estérases calcium-dépendantes dont le nom vient de leur capacité à détruire un métabolite toxique issu du parathion : le paraoxon. Elles constituent une des principales défenses contre la neurotoxicité des organophosphorés, dont certains sont utilisés comme armes chimiques tel que le gaz sarin [56].

On dénombre 3 isoformes, la principale étant la paraoxonase-1 ou PON1 [12]. La PON1 possède aussi une activité antioxydante: la PON1 est liée aux HDL et protège les LDL et les HDL de la peroxydation lipidique [57].

Des études ont montré que l'activité antioxydante de PON1 et son activité estérasique impliquent des sites différents. Ils ont de plus mis en évidence que l'activité estérasique est inhibée par les lipides oxydés des LDL, et favorisée par la présence d'antioxydants tels que les flavonoïdes [58].

On peut voir dans ces constatations une sorte de « préférence » donnée à l'action antioxydante par rapport à l'action estérasique lorsque PON1 est en présence de LDL oxydés. D'ailleurs cette inhibition du site estérasique en présence d'ERO permet d'utiliser l'activité estérasique de la PON1 comme un marqueur indirect du stress oxydant. Elle est mesurée par spectrophotométrie ultraviolet ou fluorométrie, après réaction avec du paraoxon. Enfin PON1 est protégée par le GSSG : en présence de stress oxydant, ils forment ensemble une liaison, qui est réversible à la disparition du stress oxydant [57].

C. Les systèmes antioxydants non enzymatiques liposolubles

Etant liposolubles ils se répartissent au sein des membranes cellulaires. On trouve dans cette catégorie : la vitamine E, les caroténoïdes, et l'ubiquinol.

• Vitamine E

Le terme « vitamine E » désigne en fait de nombreux isomères de tocophérols et de tocotriénols. Les teneurs plasmatiques importantes en RRR- α -tocophérol par rapport aux autres isomères sont dues à une plus grande affinité d'une protéine hépatique (la protéine de transfert de l' α -tocophérol) pour la forme RRR- α -tocophérol ; cette protéine assure l'incorporation de ce dernier dans les VLDL, alors que les autres formes subissent un turnover rapide [12].

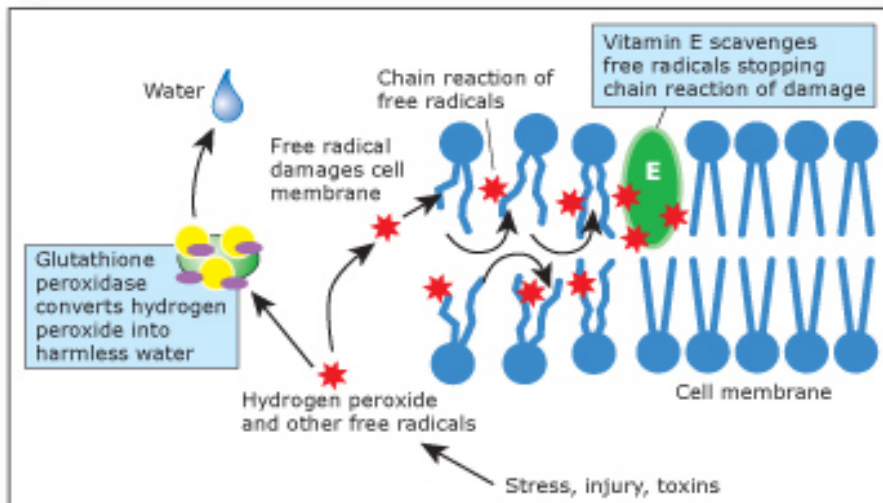
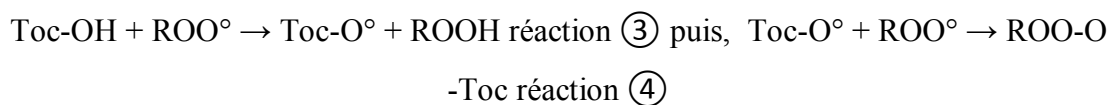


Figure 7 : Insertion de la vitamine E au sein de la membrane lipidique confirme son rôle protecteur en empêchant la propagation de la peroxydation lipidique [12].

L' α -tocophérol (Toc-OH) agit selon différentes modalités :

- Il protège les membranes biologiques de la lipoperoxydation car il interrompt la réaction en chaîne en réagissant avec un radical peroxy ROO° (réaction ③).

Les anglo-saxons le qualifient pour cela de « chain-breaking », littéralement « briseur de chaîne ». La réaction se poursuit ensuite entre le radical d'α-tocophérol et un autre radical peroxy ROO° pour donner un composé non radicalaire plus stable (réaction ④) [12] :



Au final on s'aperçoit qu'une molécule d'α-tocophérol permet de piéger 2 radicaux peroxy ROO° .

▪ Il piège les radicaux superoxydes $\text{O}_2^{\circ-}$ et hydroxyde HO° , et stabilise l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ [9].

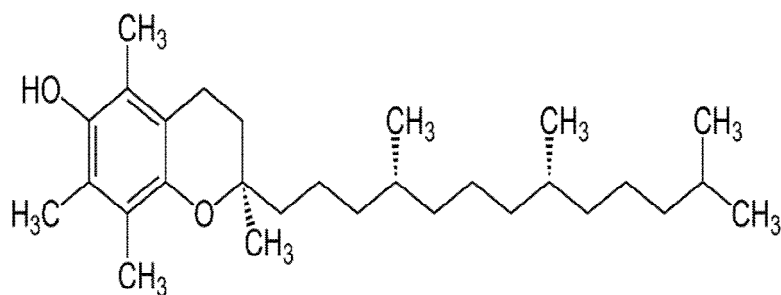


Figure 8 : Structure de la vitamine E ou RRR--α-tocophérol [9].

• Caroténoïdes

Ils sont majoritairement représentés par le **β-carotène**, appelé aussi « **pro-vitamine A** ». Du fait de leur faible concentration dans l'organisme, leurs rôles antioxydants sont considérés comme faibles, mais complémentaires des systèmes principaux évoqués plus haut. Le β-carotène désactive l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$, et piège les radicaux peroxydes ROO° [59].

• Coenzyme Q10 ou ubiquinol

Le coenzyme Q10 est un transporteur d'électrons présent dans la chaîne oxydative mitochondriale, dans les membranes cellulaires, dans le plasma et dans les lipoprotéines. Il est capable de donner des électrons et permet à ce titre une protection des membranes contre la lipoperoxydation [10]. Il assure également un recyclage de la vitamine E, par réduction de la forme oxydée [60].

D. Systèmes antioxydants non enzymatiques hydrosolubles

Ces antioxydants sont répartis dans le cytosol, le plasma et le milieu extracellulaire. On y retrouve : la vitamine C, le glutathion, l'acide urique, la bilirubine, l'acide α -lipoïque et les flavonoïdes [12].

- Vitamine C ou ascorbate

Elle est cofacteur de nombreuses enzymes. Elle permet de piéger différentes ERO, et aussi de régénérer la vitamine E [10]. La plupart des mammifères sont capables de synthétiser eux-mêmes l'ascorbate, sauf les primates et le cobaye chez qui elle constitue une 'vraie vitamine' [24]. En présence de métaux libres (fer, cuivre), situations rares biologiquement, elle peut par contre jouer le rôle de pro-oxydant [11].

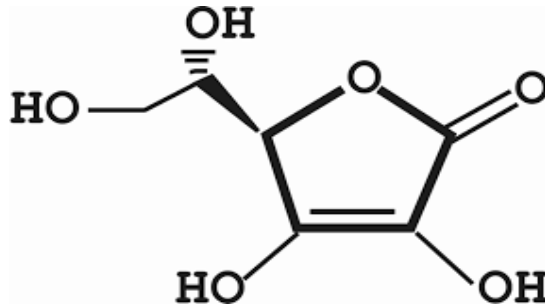
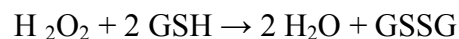


Figure 9 : Structure de la vitamine C [24].

- Glutathion GSH

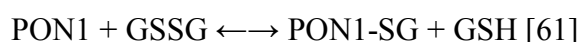
Comme nous l'avons abordé lors du paragraphe sur la Glutathion peroxydase, le glutathion est un tripeptide permettant la réduction des peroxydes cellulaires. Deux molécules réduites de glutathion GSH sont réunies au cours de cette réaction pour donner une molécule oxydée, le glutathion disulfide GSSG :



Le GSH intervient également dans le cycle de régénération de 2 vitamines antioxydantes : la vitamine E et la vitamine C [10].

Par ailleurs le GSSG permet une protection des groupements thiols des protéines : il y a formation d'une liaison réversible entre le GSSG et un groupement thiol ; on parle de « Sglutathionylation ».

La PON1 peut elle-aussi être protégée par ce mécanisme. En présence d'un réducteur (le DL-dithiothreitol), la liaison est rompue et la PON1 retrouve son activité. Autrement dit en présence de stress oxydant, la PON1 est protégée des dommages oxydatifs par S-glutathionylation, et lors de la disparition des ERO, la PON1 est restaurée :



La régénération du GSH à partir du GSSG se fait principalement grâce à l'intervention de la glutathion réductase, et elle consomme une molécule de NADPH. Le NADPH provient de la voie des pentoses phosphates pour la majorité des tissus, mais de l'isocitrate déshydrogénase dans le cas du muscle squelettique [62].

Le rapport GSH/GSSG est un marqueur indirect très utilisé pour caractériser le statut redox de la cellule et l'importance du stress oxydant.

- Acide urique/urate

Il s'agit d'un produit issu du catabolisme des bases puriques. Comme pour tout couple acidobasique l'une ou l'autre des formes est prépondérante selon le pH du milieu : au pH physiologique la forme ionisée, l'urate, est prépondérante. Il agit comme un donneur d'électrons capable ainsi de stabiliser les radicaux hydroxyl HO°, peroxy ROO°, et l'oxygène singulet [10].

- Bilirubine

La bilirubine est le produit de dégradation des hèmes. Ses propriétés antioxydantes sont liées à sa capacité à lutter contre les radicaux peroxy ROO° et contre le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ [10]. Elle est alors transformée en biliverdine, oxydée, qui sera recyclée grâce à la biliverdine reductase aux dépens d'une molécule de NADPH [63].

Toutefois, il est important de noter la toxicité de la bilirubine par une augmentation de la formation d'oxygène singulet en présence de lumière [12].

- Acide α -lipoïque

L'acide α -lipoïque est un cofacteur d'un complexe enzymatique qui participe au cycle de Krebs : le complexe α -cétoglutarate déshydrogénase. Il agit de différentes manières comme antioxydant : il piège certaines ERO telles que l'oxygène singulet, le radical hydroxyl, et l'acide hypochlorite; il chélate certains métaux de transition; et il participe au recyclage d'autres antioxydants- la vitamine C et/ou la vitamine E. Il pourrait également augmenter la concentration en glutathion en favorisant la régénération du GSSG [64].

- Flavonoïdes : antioxydants ou non antioxydants?

Ils font partie de la famille des polyphénols. Les flavonoïdes possèdent 2 cycles reliés par 3 atomes de carbone. On en trouve dans de nombreuses plantes, épices et boissons, telles que le thym, le cacao, le thé, le vin ou la bière.

In vitro les flavonoïdes possèdent une activité antioxydante certaine : ils peuvent inhiber la lipoperoxydation et piéger des ERO telles que HO° , NO_3^- , et HClO [12].

In vivo leur action antioxydante n'est pas encore bien établie à cause de leur faible absorption digestive ; mais elle est fortement suspectée et a été avancée comme l'explication du fameux « paradoxe français » : cette expression vient d'une constatation faite dans la région du Sud ouest de la France où l'on retrouve une alimentation riche en graisses et pourtant un faible taux de maladies cardiovasculaires. Cela serait dû à la consommation de vin rouge riche en flavonoïdes [65, 66].

E. Métaux de transition

Certains métaux de transition servent de cofacteurs d'enzymes antioxydantes, et sont à ce titre regroupés au sein des antioxydants : le zinc (dans la SOD1), le manganèse (dans la SOD2), le fer (dans la catalase), le cuivre (dans la SOD1) ou encore le sélénium (dans la glutathion peroxydase). On reviendra sur deux d'entre eux dans les lignes qui suivent, le zinc et le sélénium.

- Zinc

En plus de son rôle de cofacteur dans la SOD1, on suggère souvent que le zinc pourrait agir comme antioxydant en déplaçant le fer des sites de fixation, inhibant alors la synthèse d'espèces réactives rendue possible ou facilitée par sa présence [67].

- Sélénium

Le sélénium est un important composant de la glutathion peroxydase (GPx) et des peroxyrédoxines. En effet, ces deux enzymes possèdent dans leur chaîne primaire un acide aminé particulier : la L-sélénocystéine qui en font des sélénoprotéines. Toutes les sélénoprotéines caractérisées par les scientifiques qui fonctionnent comme des enzymes sont des oxydoréductases qui catalysent les réactions d'oxydoréduction impliquant des groupements thiols et qui contiennent du sélénium dans leur site actif [12,14].

F. Antioxydants non enzymatiques endogènes

- Protéines régulatrices, de transport et de séquestration des métaux de transition

- Le cas du fer

La transferrine est une glycoprotéine synthétisée par le foie pouvant fixer deux Fe^{3+} . Chez les mammifères en bonne santé, on considère que 20 à 30% de la transferrine circulant est complexée avec des ions fer. De plus, son turnover est très important, assurant le transport du fer efficacement aux cellules cibles. Le plasma des mammifères a donc une forte capacité de fixation du fer libre, dont la concentration est proche de zéro dans les conditions physiologiques [67].

En effet, il est aussi important de maintenir l'homéostasie du fer dans ces organites que dans le cytosol car toute perturbation et libération de métaux de transition libres pourrait entraîner une surproduction d'espèces radicalaires et alors provoquer un dysfonctionnement mitochondrial [112].

Le fer est fixé dans la ferritine sous la forme Fe^{2+} puis est oxydé en Fe^{3+} ; le Fe^{3+} est ensuite transformé en oxydes de fer, insolubles. La conformation de la cellule en coquille autour du fer et l'insolubilité de cette forme de stockage empêche la réaction du fer avec les ERO [67, 124].

Il a également été démontré que, dans le cas de la dégradation de l'hémoglobine, la libération de l'ion fer par l'hème oxydase-1 (HO-1) pourrait induire la synthèse de ferritine, et que les facteurs d'activation de HO-1 pouvaient également activer la synthèse de l'ARNm de la ferritine [124]. Au sein de la cellule, la ferritine est clivée dans les lysosomes sous une autre forme insoluble, l'hémosidérine. Ce pigment insoluble contient 25-30% du fer contenu dans l'organisme. Il est localisé essentiellement dans les macrophages et trouve également sa capacité antioxydante dans son insolubilité. L'hémosidérine est une forme de stockage au même titre que la transferrine [67].

- Le cas de cuivre

Une fois capté par les intestins, le cuivre voyage des intestins vers les cellules cibles principalement lié à albumine et à une protéine de transport plus spécifique, la transcuprine. Le foie intègre ensuite ce métal en le fixant à la céruloplasmine, protéine capable de fixer six à sept ions Cu^{2+} , la céruloplasmine a un rôle analogue à la transferrine dans le transport du cuivre, insoluble sous cette forme. Dans les cellules, les enzymes utilisant le cuivre comme cofacteur de catalyse et les métallothionéines assurent la majeure partie de la séquestration du cuivre intracellulaire [67].

- Les protéines découplantes

Les protéines découplantes ont été d'abord découvertes dans le tissu adipeux brun avec la mise en évidence des protéines UCP-1 (pour « uncoupling protéine-1 »). Dans ce tissu, leur présence dans la membrane mitochondriale interne permet le passage des protons vers l'espace intermembranaire et ainsi annule le gradient protonique nécessaire au fonctionnement des ATP-synthase ; toute l'énergie du transfert des électrons sur la chaîne mitochondriale ne pouvant plus servir à la formation d'ATP, celle-ci est alors libérée sous forme de chaleur.

Depuis, des protéines homologues à UCP1 ont été mises en évidence dans d'autres tissus, comme UCP3 dans les muscles striés, en concentration moins importantes cependant. Il a alors été proposé que ces dernières puissent agir comme des antioxydants [67, 140]. En effet, en permettant la fuite de protons hors de la matrice mitochondriale, elles ralentiraient le transfert électronique et limiteraient en conséquence leur fuite et la formation du radical superoxyde depuis la chaîne de phosphorylation oxydative.

De plus, il semblerait que certains produits de la peroxydation lipidique puissent activer les protéines découplantes UCP [140].

- Autres antioxydants non enzymatiques endogènes

Il existe de nombreuses autres molécules endogènes aux propriétés antioxydantes dans le sens qu'elles réagissent avec les ERO en produisant des composés moins toxiques. On recense notamment in vivo l'albumine, le glucose, le mannitol, α -kétos-acides, l'acide hyaluronique, la glucosamine [67,125].

Ainsi, **le glucose et le mannitol** inactivent le radical hydroxyle HO° et pourraient ainsi jouer un rôle protecteur de la glycation des protéines. Cette réactivité mérite d'être soulignée dans le cadre de l'exercice physique et de l'évolution des potentialités antioxydantes du sang [67].

L'albumine est une protéine plasmatique chargée négativement pouvant fixer les ions cuivre et fer présents dans le sang. Son importance est également liée à sa forte concentration dans le sang. C'est aussi une « protéine sacrificielle » qui est rapidement dégradée par des ERO comme l'ion hypochlorite ou l'ion peroxy-nitrite. Elle constitue une grosse partie du pool thiols du sang et est également très liée à la bilirubine, potentialisant ses effets antioxydants dans le sang [125].

Les α -kétacides comme le pyruvate ou le α -kétoglutarate (intermédiaire du cycle de Krebs), ont une bonne réactivité avec H_2O_2 , ONOO⁻ et HOCl, confirmant ainsi leur rôle antioxydant dans le milieu intracellulaire et notamment comme deuxième barrière à la toxicité des peroxyosomes [67].

La glucosamine, et particulièrement ses composés sulfatés possèdent des propriétés antioxydantes en réagissant avec des ERO. Ils assurent notamment la protection des protéoglycanes et des chondrocytes de l'articulation. Il semblerait également que la glucosamine maintiendrait les niveaux de glutathion à l'état réduit (GSH) au sein de l'articulation [141].

L'acide hyaluronique assure un pouvoir antioxydant dans de nombreux systèmes, en particulier au sein de l'articulation contre HO[°] [67,125, 142].

L'acide hyaluronique et un de ses composants, l'acide D-glucuronique, ont le pouvoir de réduire la concentration en ERO d'un milieu dans un modèle in vitro. Enfin, l'acide hyaluronique a le pouvoir de réduire les taux en NO[°] dans une articulation atteinte d'ostéoarthrose [142].

Enfin **l'haptoglobine** est une protéine de la phase aiguë de l'inflammation. Elle a la capacité de fixer l'hémoglobine et l'hème libre, diminuant considérablement les activités prooxydantes liées au fer contenu dans l'hème. On suggère actuellement que l'haptoglobine possède une activité chaperonne en protégeant également d'autres protéines extracellulaires contre les dégâts du stress oxydant [67].

G. Antioxydant synthétique

Le butylhydroxyanisole (BHA), le butylhydroxytoluène (BHT), les esters de l'acide gallique sont des antioxydants synthétiques lipophiles. Le BHA et le BHT sont les plus fréquemment utilisés. Ceux-ci sont principalement employés comme conservateurs, à faible concentration, dans les produits cosmétiques et alimentaires afin de protéger les lipides du rancissement. Néanmoins, leur utilisation reste controversée, les produits de dégradation du BHA et du BHT étant suspectés d'être cancérogènes [45, 86].

De plus, dans le domaine alimentaire, des réactions d'hypersensibilité ont été recensées pour les gallates, le BHA et le BHT. Enfin, des réactions allergiques (de type urticaire) ont été observées chez certains sujets sensibles au BHA et BHT [86]. A ce jour, aucun texte ne mentionne ni ne règlemente l'utilisation de tels antioxydants.

Tableau IV : Principaux antioxydants de leurs modes d'action

Catégorie d'antioxydants	Nom	Modes d'action principaux
Enzymatiques	SOD	Piège O ₂ ^{°-}
	GPX	Inactive H 2O ₂ et ROOH
	CAT	Inactive H 2O ₂
	PON1	Répare lipides oxydés des LDL
Non enzymatiques liposolubles	Vit E	Piège O ₂ ^{°-} et HO [°] , lutte contre lipoperoxydation (piège ROO [°])
	Caroténoïdes	Inactivent 1O ₂ , piègent ROO [°]
	CoQ10	Lutte contre lipoperoxydation, recycle vit E
Non enzymatique hydrosolubles	Vit C	Piège certaines ERON, recycle vit E
	GSH	Cofacteur de GPX, Protection des protéines thiols par S-glutathionylation
	Acide urique	Piège certaines ERON (donne e-)
	Bilirubine	Inactive H 2O ₂ , lutte contre lipoperoxydation (piège ROO [°])
	Acide α-lipoïque	Piège certaines ERON, chélate métaux libres, recycle vit E et vit C
	Métaux de transition	Cofacteurs de SOD (→Cu, ZN, Mn), GPX (→Se), et CAT (→Fe)
	Protéines de Transport	Chélatent les métaux de transition libres
	Flavonoïdes (?)	Luttent contre lipoperoxydation, piègent HO [°] , NO ₃ ⁻ , et HClO



Partie 2 :
Dommmages du stress
oxydant



I. STRESS OXYDANT ET ALTERATIONS BIOCHIMIQUES A L'ECHELLE MOLECULAIRE

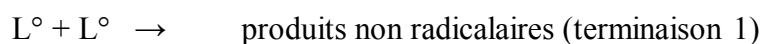
A. Stress oxydant et altérations des lipides

• Peroxydation des acides gras polyinsaturés membranaires

Les phospholipides des membranes cellulaires sont particulièrement sensibles au stress oxydant étant donné leur forte teneur en acides gras polyinsaturés (riches en double liaison $>C=C<$) et la fréquence du motif $-CH=CH-CH_2-CH=CH-$ qui les rendent particulièrement sensibles à l'attaque des ERO [67].

Les acides gras monoinsaturés sont également présents dans les membranes mais sont moins réactifs avec les ERO, donc moins concernés par le stress oxydant.

La peroxydation lipidique entraînée par l'action des radicaux libres est une réaction spontanée en chaîne qui comporte trois étapes : l'initiation, la propagation et la terminaison [67,68].



$L-H$ représente un lipide insaturé, généralement un acide gras polyinsaturé. L° représente un radical lipidique centré sur le carbone. Oxydant° représente évidemment un radical aux propriétés oxydatives sur $L-H$.

❖ Phase d'initiation

Dans la réaction d'initiation, les auteurs rapportent qu'un radical ne peut être oxydant pour un acide gras polyinsaturé que si son potentiel E° est supérieur à +600 mV (valeur moyenne en condition physiologique in vitro) [68]. On considère généralement que le radical

hydroxyle HO° , les radicaux alkoxyles RO° et peroxyes ROO° (les acteurs principaux de la propagation de la peroxydation lipidique), HOO° , et NO^{2° font parties des espèces initiatrices majeures chez les mammifères [69].

❖ Phase de propagation

C'est la phase de propagation qui fait de la peroxydation lipidique une « chaîne réactionnelle ». En effet, après la réaction d'initiation, les radicaux peroxyes et alkoxyes issus des acides gras contribuent eux-mêmes à la chaîne de propagation [70].

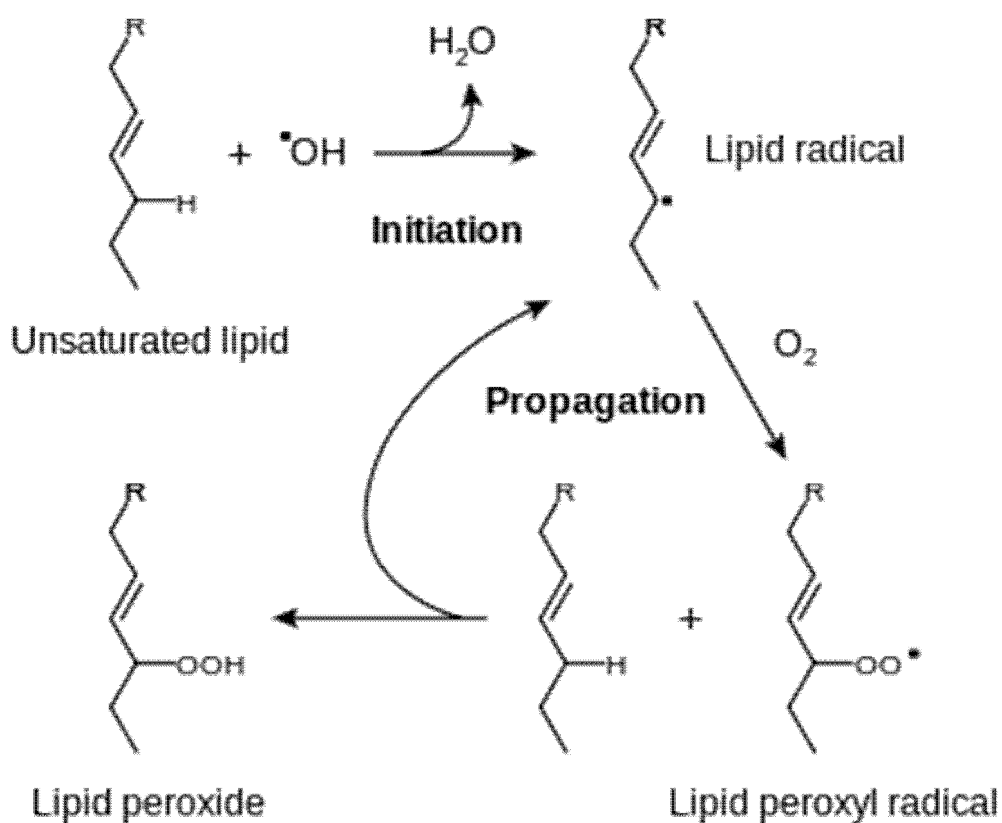


Figure 10 : Exemple classique de propagation d'une chaîne de peroxydation lipidique [70].

In vivo la peroxydation lipidique peut ainsi produire une grande diversité de produits lors de la propagation. On peut imaginer logiquement que plus cette phase est longue, plus les mécanismes pour y mettre fin sont difficiles à mettre en œuvre. Il est quasiment impossible de prévoir une terminaison, de surcroît lorsque la composition en acides gras polyinsaturés est variée et évolutive, ce qui est le cas dans les systèmes biologiques [67].

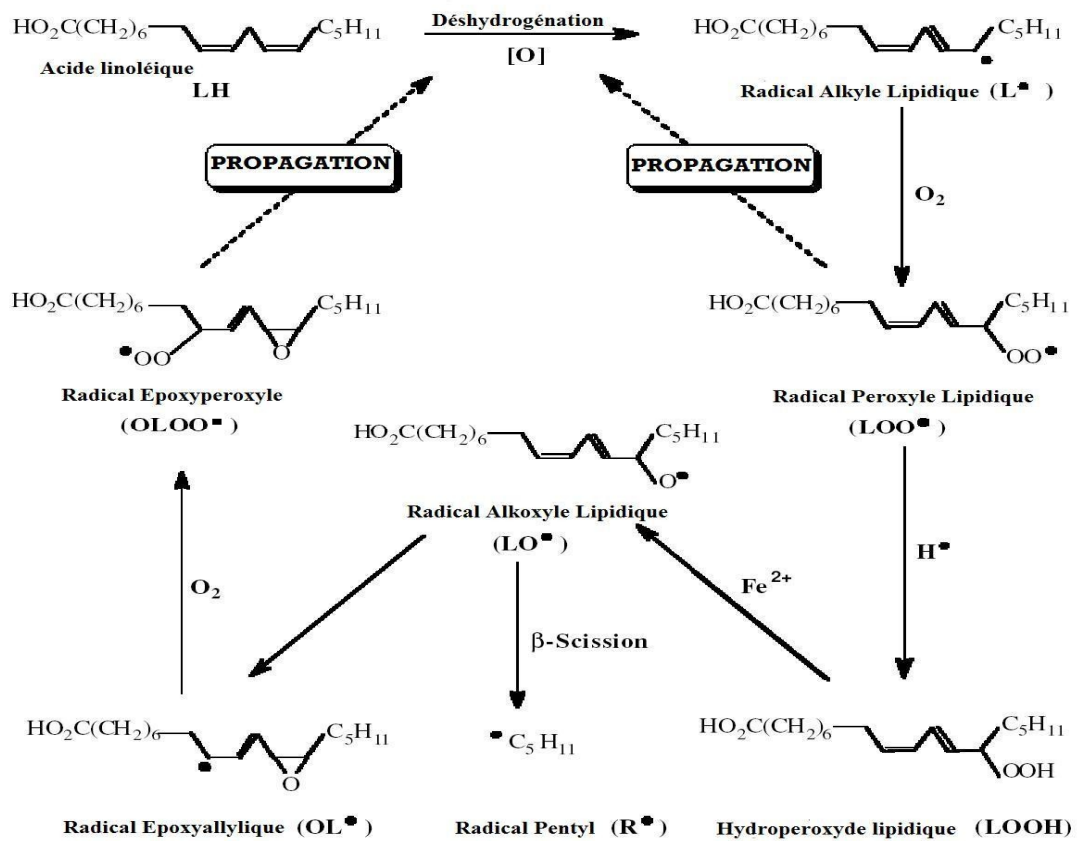


Figure 11 : Complexité réactionnelle de la peroxydation lipidique: peroxydation de l'acide linoléique(LH) [68].

La figure 11 est un exemple de peroxydation lipidique de l'acide linoléique (LH), un acide gras insaturé bien présent dans les membranes cellulaires. On remarque que les premiers produits radicalaires peroxydes et époxyperoxydes participent à la propagation de la peroxydation lipidique d'autres acides gras polyinsaturés initiaux. En présence de Fe^{2+} (métal de transition) et d'oxygène, ils peuvent également rejoindre un système de Fenton générateur de radicaux encore plus réactifs.

Ces radicaux ont une forte réactivité avec l'oxygène, participent à la formation de nouveaux radicaux peroxydes et le cycle recommence.

Des études ont montré in vivo que lors de la peroxydation lipidique des acides gras polyinsaturés:

- La longueur de l'acide gras n'a pas d'impact sur la quantité de radicaux formés.
- La quantité de radicaux lipidiques générés par peroxydation lipidique augmente si le nombre total d'atomes d'hydrogène en position bis-allylique (et donc le nombre de doubles liaisons) augmente. Ces derniers sont en effet particulièrement vulnérables car les liaisons C—H des carbones impliqués dans une double liaison C=C (hydrogènes bisallylique) sont plus faibles ce qui rend leur abstraction plus simple (figure 11) [68].

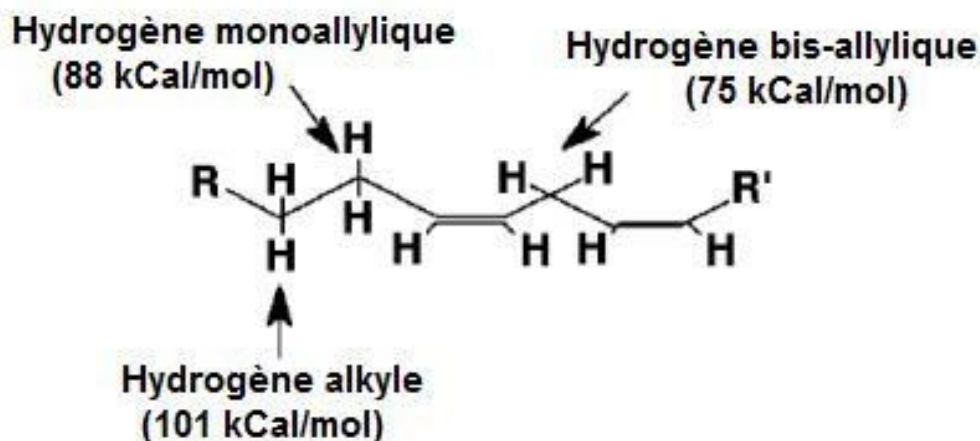
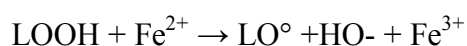


Figure 12 : Vulnérabilité des atomes d'hydrogène dans la chaîne polyinsaturée de l'acide gras [68].

- Et plus important encore, le taux de peroxydation lipidique cellulaire croît de manière exponentielle avec l'augmentation du nombre d'atome d'hydrogène en position bis-allylique [71].

❖ **Phase de terminaison**

La phase de terminaison correspond à la phase de formation de molécules plus stables non-radicalaires, obtenue le plus souvent par réaction entre deux radicaux libres ou grâce à l'action d'un antioxydant. Nous remarquerons par ailleurs que les hydroperoxydes lipidiques LOOH sont généralement assez instables en présence de métaux de transition et disposés à relancer une peroxydation lipidique en régénérant des radicaux libres alkoxydes:



puis

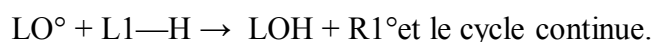


Tableau V : les différentes phases de la peroxydation lipidique en présence d'EROs et leurs réactions chimiques

Phase d'oxydation lipidique	Réaction(s) chimique(s)
Initiation	$\text{RH} + \text{OH}^\circ \rightarrow \text{R}^\circ + \text{H}_2\text{O}$
Propagation	$\text{R}^\circ + \text{O}_2 \rightarrow \text{ROO}^\circ$ $\text{ROO}^\circ + \text{RH} \rightarrow \text{ROOH} + \text{R}^\circ$
Terminaison	$\text{R}^\circ + \text{R}^\circ \rightarrow \text{RR}$ $\text{ROO}^\circ + \text{R}^\circ \rightarrow \text{ROR}$ $\text{ROO}^\circ + \text{ROO}^\circ \rightarrow \text{ROOR} + \text{O}_2$

• Oxydation du cholestérol

Le cholestérol présent dans les membranes plasmiques et dans les lipoprotéines peut également être oxydé durant la peroxydation lipidique, en générant une grande variété de produits regroupés sous le nom d'oxystérols (figure 13).

Cette oxydation peut avoir lieu sur plusieurs sites ce qui explique entre autre la complexité des produits générés. Les oxystérols (comme le 7-kéto-cholestérol) sont notamment caractérisés par une solubilité plus grande dans l'eau, modifiant la cinétique et la fluidité membranaire des cellules [70].

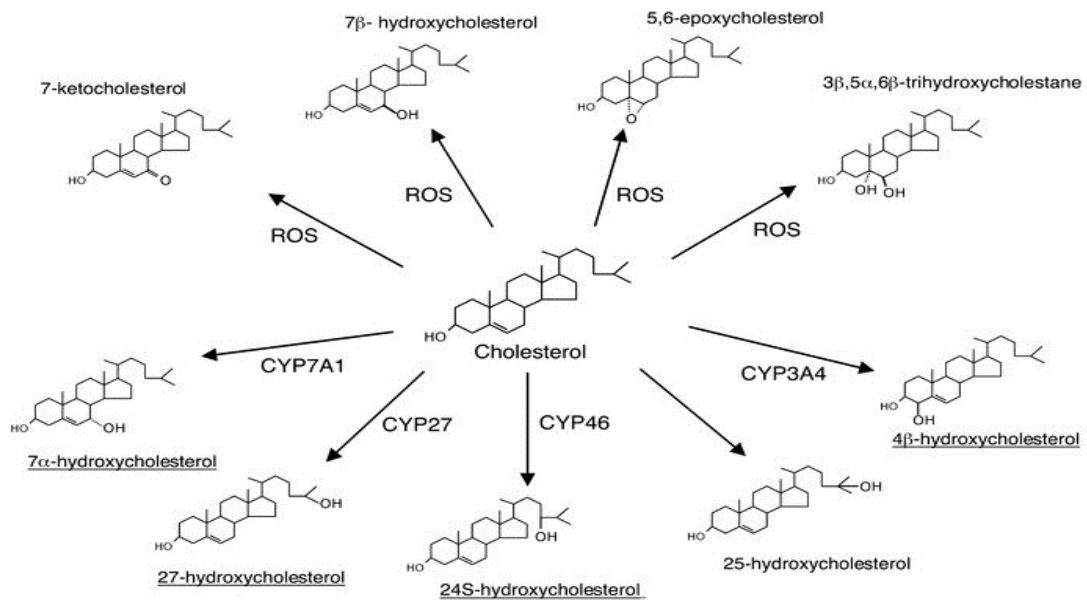


Figure 13 : Produits d'oxydation du cholestérol [70]

B. Stress oxydant et altérations des protéines et des acides aminés.

La biochimie de l'altération des protéines est beaucoup plus complexe que celle des lipides, premièrement à cause du nombre d'acides aminés différents (plus de 20).

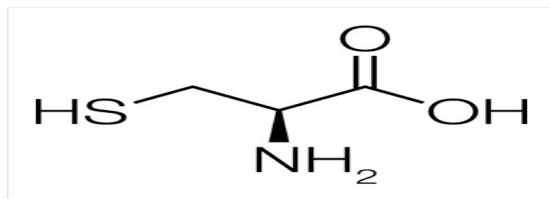
Les ERO les plus réactifs avec les protéines sont le radical hydroxyle HO° et le peroxy-nitrite ONOO^- . L'ion superoxyde $\text{O}_2^{\circ-}$ est le moins réactif des ERO mais est suffisamment fort pour oxyder les groupements thiols (-SH) de la cystéine [67].

Les ERO peuvent modifier les protéines suivant plusieurs modalités dont l'oxydation, la nitrosylation, la nitration ou encore la chlorination d'acides aminés spécifiques, menant plus ou moins directement à la modification de leur structure et donc à la perte de leur activité biologique [72].

Les chaînes latérales de tous les acides aminés des protéines sont susceptibles de subir l'oxydation des ERO [73]. Ces résultats ont évidemment été obtenus *in vitro*, où la quantité et la qualité des espèces réactives ainsi que les conditions expérimentales peuvent être modifiées jusqu'à obtenir un résultat ; *in vivo* il est clair que tous les acides aminés ne sont pas sensibles de la même manière au stress oxydant.

En effet, dans les conditions physiologiques, les acides aminés les plus sensibles aux ERO rapportés par la littérature sont :

- les acides aminés soufrés : **cystéine et méthionine**



Cystéine



Méthionine

Figure 14 : les acides aminés soufrés [72].

- les acides aminés basiques : **arginine, histidine et lysine**

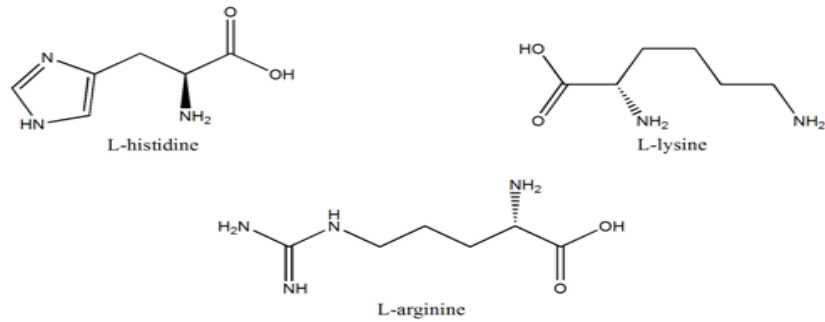


Figure 15 : les acides aminés basiques [72].

- les acides aminés aromatiques : **tyrosine, phénylalanine et tryptophane**

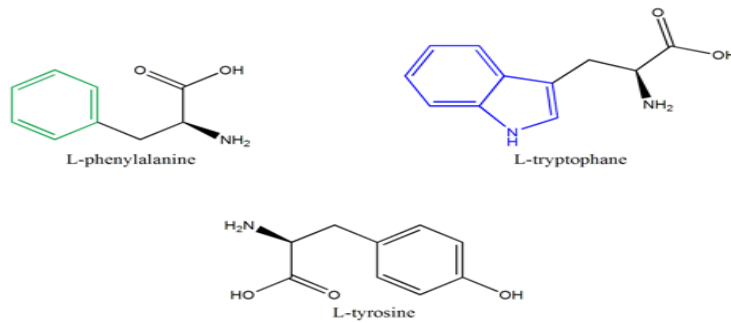


Figure 16 : les acides aminés aromatiques [72].

- Oxydation des chaînes latérales

Les acides aminés soufrés sont particulièrement sensibles à l'oxydation : l'oxydation du groupement thiols $-SH$ de la cystéine peut mener à la formation de groupements sulféniques ($-SOH$), sulfoniques ($-SOOH$), sulfoniques ($SOOOH$) ou à la formation de ponts

disulfures (-S—S-) entre deux cystéines. La méthionine peut également être oxydée en sulfoxyde de méthionine (>S=O) ou en sulfone de méthionine (-S(=O)(=O)-) [74].

L'oxydation des acides aminés aromatiques (phénylalanine, tryptophane et tyrosine) provoque l'ouverture du cycle aromatique ou son oxygénation (ajout de groupements hydroxyde -OH). La tyrosine peut également former le radical tyrosyle sous l'action des ERO à l'origine de ponts dityrosines qui modifient la structure tertiaire des protéines. Ce radical peut alors réagir avec $O_2^{\cdot-}$ pour former l'hydroperoxyde de tyrosine (oxygénation du cycle) [67].

Les composés carbonylés se forment très tôt lors de l'altération oxydative des protéines. Un composé carbonylé est un composé organique comportant une double liaison entre un atome de carbone et un atome d'oxygène (fonction cétone >C=O ou aldéhydes -CH=O). Les acides aminés les plus susceptibles de former des carbonyles sont les acides aminés basiques (lysine, l'arginine et histidine). Ce type d'altération est souvent catalysé par des métaux de transition. En effet, des ions comme Fe^{2+} ou Cu^{2+} peuvent se fixer sur les protéines et ainsi faciliter l'attaque de H_2O_2 ou même du dioxygène directement [75].

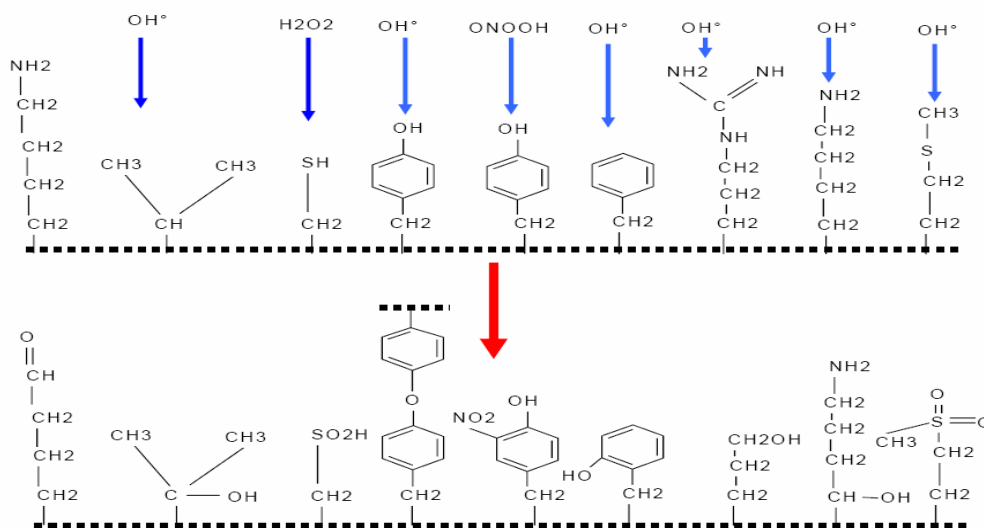


Figure 17 : Nature de quelques modifications des chaînes latérales, d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire [2].

- Nitration

La nitration correspond à l'attachement d'un groupe $-\text{NO}_2$ (nitro-) à un composé, ici en l'occurrence une chaîne latérale protéique. Cette liaison n'est généralement pas réversible [67].

Dans le contexte du stress oxydant, la nitration des protéines est en majeure partie orchestrée par le peroxy-nitrite et le radical nitryle NO_2° au niveau des acides aminés aromatiques comme la tyrosine [76]. Cette nitration a un impact sur les qualités physico-chimiques de cet acide aminé, en échangeant l'hydrophobie de la tyrosine pour l'hydrophilie de la nitrotyrosine, pouvant modifier la structure tertiaire de la protéine qui la porte [67].

- Nitrosylation

La nitrosylation correspond à l'attachement d'un groupe $-\text{NO}$ (nitroso-) à un résidu thiol (S-nitrosylation) ou à un métal (M-nitrosylation). Cette liaison est généralement réversible.

Les groupements thiols de la cystéine peuvent subir une nitrosylation par le peroxy-nitrite, le dioxyde ou le trioxyde d'azote (S-nitrosylation), et former un nitrosothiol ($-\text{S}-\text{NO}$) ; cette réaction est plus rare avec le monoxyde d'azote car NO° réagit rarement directement avec les groupements thiols $-\text{SH}$ [67].

- Glucoxydation

La glucoxydation d'une molécule regroupe une étape de glycation qui est suivie par une étape d'oxydation des produits glyqués. Les produits issus de la glycation sont facilement oxydés par de nombreuses espèces réactives, dont le radical hydroxyle HO° et le peroxy-nitrite ONOO^- pour donner les AGEs oxydés (AGEs pour « advanced glycation end products »).

La glycation est une réaction non enzymatique entre un sucre réducteur (par exemple le glucose) et une protéine pour former une base de Schiff réversible (surtout avec de la lysine et de l'arginine) [76,77].

La glycation in vivo est un phénomène très lent, et donc le phénomène global de glycoxydation touche essentiellement les molécules très faiblement recyclées, comme le collagène [67,76].

La plupart des AGEs sont généralement très instables, très réactifs et difficiles à analyser complètement. La pentosidine et la carboxyl-méthyl-lysine (CML) sont les plus connues car elles sont assez stables pour être mesurées [78].

- Chlorination

L'hypochlorite HOCl/CLO⁻ peut réagir rapidement avec le groupement amines (-NH₂) des acides aminés libres et des chaînes latérales aminés pour former les N- chloramines (R—NHCl).

La chlorination des protéines résulte également de la modification des chaînes latérales des acides aminés contenant des groupes fonctionnels tels que les groupements thiols -SH (dans les bases soufrées), les ponts disulfides -SS-, le groupement hydroxyle -OH (dans la tyrosine) ou encore le groupement indole du tryptophane [79].

- Déshydrogénation, rupture et remaniement de la chaîne protéique

Pour mémoire, la liaison peptidique est une liaison covalente qui s'établit entre la fonction carboxyle portée par le carbone α d'un acide aminé et la fonction amine portée par le carbone de l'acide aminé suivant.

Comme décrit précédemment, des ERO peuvent arracher les atomes d'hydrogène liés au de la chaîne polypeptidique (abstraction de -H) et créer des radicaux libres centrés sur le carbone, qui peuvent à leur tour rentrer dans de nouvelles réactions radicalaires. Des réarrangements peuvent également avoir lieu lors des réactions radicalaires en chaînes et aboutir à la fracture de la chaîne polypeptidique ou encore à la formation de liaisons interchaînes et/ou intra-chaînes, altérant de fait la structure de la protéine.

Enfin, certains aldéhydes issus de la peroxydation lipidique peuvent également être ajoutés à la chaîne sur les acides aminés en situation de stress oxydant [67,78].

C. Stress oxydant et altération de l'ADN

C.1. Support de l'information génétique

L'acide désoxyribonucléique (ADN) est présent dans toutes les cellules et constitue le patrimoine génétique d'une espèce. En effet, l'ADN contient un ensemble d'informations nécessaire à deux fonctions primordiales. Il assure d'une part la pérennité d'une espèce par une transmission fidèle des caractères héréditaires. Ceci est effectué par réplication des brins lors de la division cellulaire conduisant à la duplication de l'information qu'il contient et à la répartition entre les cellules filles. D'autre part, l'ADN possède les informations nécessaires au développement de chaque cellule, et ce notamment par la synthèse continue de protéines dont la nature et les propriétés fonctionnelles sont établies précisément [80].

C.2. Structure de l'ADN

La structure primaire de l'ADN correspond à un polymère de nucléotides, pouvant atteindre jusqu'à 1,60 m de long chez l'Homme lorsqu'il est déroulé. Chaque nucléotide est lui-même composé d'un phosphate relié à un sucre (le 2-désoxyribose) lui-même relié par une liaison N-glycosidique à l'une des quatre bases suivantes : Adénine (Ade) ou Guanine (Gua) qui constitue les bases puriques, et Thymines (Thy) ou Cytosine (Cyt) qui constituent les bases pyrimidiques [81].

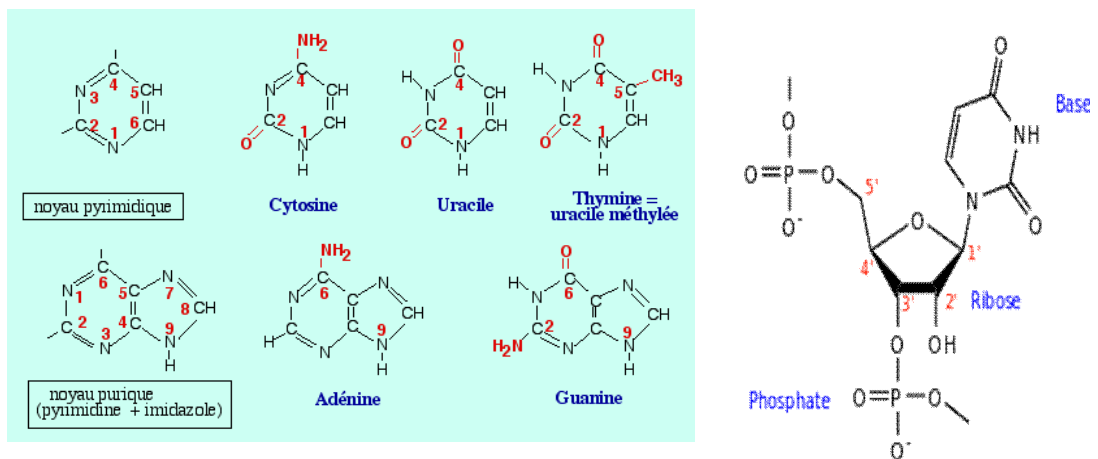


Figure 18 : structure des quatre bases et différents constituants de l'ADN [81].

Les nucléotides sont ensuite reliés entre eux par des ponts phosphodiesters impliquant les fonctions hydroxyle des extrémités 3' et 5' des 2-désoxyriboses [85].

C.3. Rôle biologique : ADN est « empreinte » de la cellule

- Synthèse protéique

Constituant essentiel de la matière vivante, une protéine peut être, selon sa nature, une molécule capable de détecter des entités biologiques étrangères, un transporteur d'énergie ou l'enzyme d'une réaction particulière. Chaque protéine est définie par une séquence bien précise d'acides aminés dont l'assemblage et la structure spatiale sont déterminés par l'information contenue dans une séquence correspondante d'ADN appelé gène. Il existe vingt acides aminés différents et chaque protéine est constituée d'une centaine voire de plusieurs centaines de milliers de ces unités. L'élaboration d'une protéine à partir d'une séquence d'ADN implique trois opérations essentielles mettant en jeu différents types d'ARN [84].

- Transmission de l'information

Pour assurer la transmission du message génétique, la molécule d'ADN doit se répliquer un grand nombre de fois à travers les générations cellulaires. En effet, chaque cellule avant de se diviser, dédouble son ADN afin d'en produire deux copies identiques, une pour chaque cellule fille. Ces dernières héritent ainsi normalement de l'intégralité de l'information génétique de la cellule mère. Après la dissociation initiale des deux brins d'ADN parents, les deux nouvelles chaînes sont synthétisées par un complexe composé de plusieurs enzymes qui comprend des ADN polymérase. Ce mécanisme de réplication est qualifié de semi-conservatif étant donné que chaque double hélice formée est composée d'une chaîne d'origine et d'une chaîne néo-synthétisée. La fidélité de la réplication est assurée par des processus enzymatiques complexes, vérifiant la complémentarité des bases (A-T et G-C) et corrigeant les erreurs aléatoires [83].

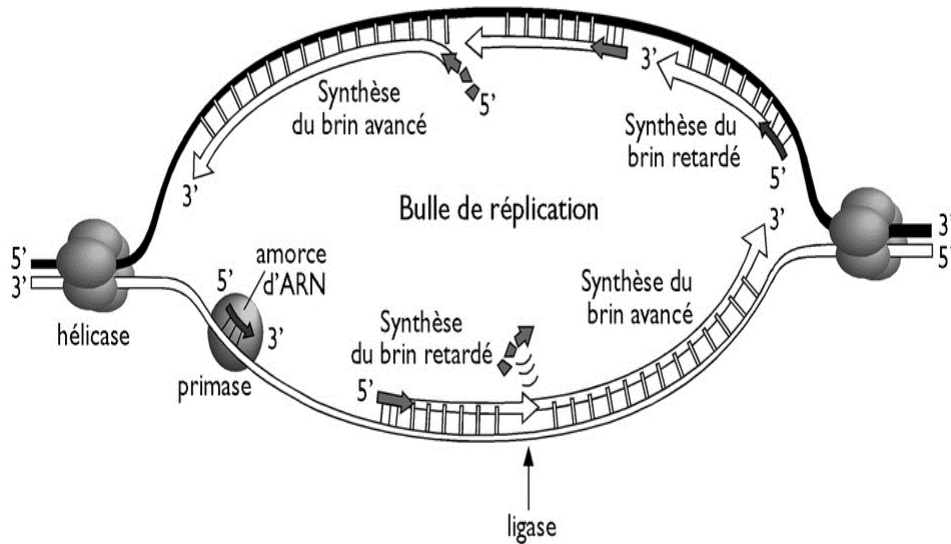


Figure 19 : Réplication de l'ADN [83].

C.4. L'ADN : Molécule cible des ERO.

C.4.1 Altération du biopolymère

L'ADN est la cible privilégiée des oxydations par les ERO du fait de son potentiel de réparation plus faible que celui de l'ADN nucléaire et de sa proximité directe de l'une des principales sources des ERO cellulaires : la chaîne respiratoire mitochondriale. Ainsi, le taux de bases oxydées serait 2 à 3 fois supérieur dans l'ADN mitochondriale par rapport à l'ADN nucléaire [80]. Selon la source des agressions, l'ADN est endommagé de différentes façons. On peut noter quatre classes principales de dommages : les coupures simples et doubles brins, les bases modifiées comme la 8-OH-2-désoxyguanosine (8-OH-dG) qui est un marqueur des dommages oxydatifs de l'ADN, les pontages ADN-ADN et ADN-protéines et les sites abasiques (figure 20) [81].

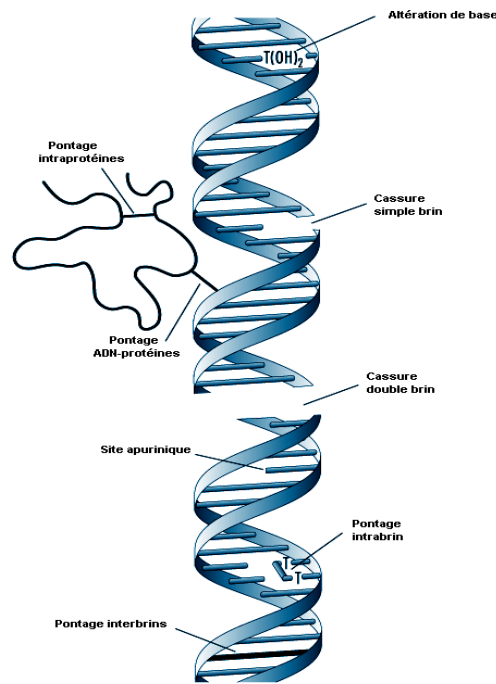


Figure 20 : Principales classes de dommages de l'ADN [81].

C.4.2. Oxydation directe

- Modification des bases pyrimidiques

Les modifications peuvent être dues à l'attaque des radicaux hydroxyles sur le cycle aromatique des pyrimidines. Le radical HO° est très électrophile et donc s'additionne préférentiellement en position 5 du cycle de la thymine et la cytosine. Il existe également une réaction minoritaire d'addition en position 6. Cette addition conduit à la formation des radicaux 5-hydroxy-6-yle ou 6-hydroxy-5-yle. Le radical HO° peut également réagir avec le groupement méthyle de la thymine en arrachant un atome d'hydrogène, conduisant à la formation d'un radical allylique. Ces radicaux formés vont réagir avec l'oxygène pour former des radicaux peroxydes.

Les hydroperoxydes, qui ont été isolés et caractérisés dans le cas de la thymidine et de la 2'-désoxycytidine, sont instables, particulièrement en présence de métaux de transition. Leur décomposition conduit à la formation de divers produits stables dont les diols et les

uréates. Les réactions d'oxydation à un électron qui impliquent uniquement la formation du radical cation pyrimidique conduisent à des produits finaux stables qui sont identiques à ceux générés par l'action du radical hydroxyle. Parallèlement, l'addition d'électrons a été observée et peut conduire, en l'absence d'oxygène, à la formation de radicaux 5,6-dihydropyrimid-5-yle. Ces radicaux peuvent être réduits ou oxydés pour donner respectivement les 5,6-dihydropyrimidines, et la base normale. Dans ces mêmes conditions anoxiques, les radicaux 5-hydroxy-6-hydropyrimid-6-yle et 6-hydroxy-5-hydropyrimid-5-yle sont les précurseurs des produits stables monohydroxylés [82,83].

- Modification des bases puriques

Les bases puriques sont plus sensibles aux espèces réactives de l'oxygène, en particulier la guanine, base qui présente le potentiel d'oxydation le plus bas. Nous ne traiterons donc ici que le cas de la guanine. Le premier mécanisme conduisant à la formation de 8-OHdG à partir de la guanine implique l'arrachement d'un électron à la guanine et la formation d'un cation radical. Le radical ainsi formé peut s'hydrater pour générer un radical neutre intermédiaire ou peut perdre un proton pour donner naissance à un radical neutre oxydant. Le radical 8-hydroxy-7,8-dihydroguan-7-yle produit par la réaction d'hydratation pourra être oxydé ou réduit pour conduire respectivement à la formation de la 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-OHdG) et de la 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (FapyGua) [84].

D'autre part, le radical oxydant formé par déprotonation du cation radical de la guanine est le précurseur de l'oxazolone. Dans ce phénomène, l'importance du radical hydroxyle a été démontrée. En effet, l'addition du radical HO° en position 8 de la guanine conduit à la formation de la 8-OHdG et des 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (FapyGua) par l'intermédiaire du radical 8-hydroxy-7,8-dihydroguan-7-yle.

Enfin, l'autre mécanisme de formation est celui qui met en jeu l'oxygène singlet. L'oxygène singlet conduit spécifiquement à la formation de la 8-OHdG. A l'inverse du radical hydroxyle, qui peut interagir avec l'ensemble des bases, l'oxygène singlet réagit avec la guanine uniquement [84].

L'oxygène singlet réagit avec la guanine par addition sur les positions 4 et 8 du cycle purique ce qui forme un endoperoxyde. Cet endoperoxyde conduit à la 8-hydroperoxy-7,8-dihydroguanine qui peut être réduit en 8-OHdG [84, 85, 86]. La mesure de la 8-OHdG est aujourd'hui utilisée comme biomarqueur du stress oxydant sur l'ADN [39, 87]. De plus le développement de nouvelles techniques de dosages notamment par HPLC-MS/MS permet de mesurer spécifiquement les différents types de dommages après hydrolyse de l'ADN [88].

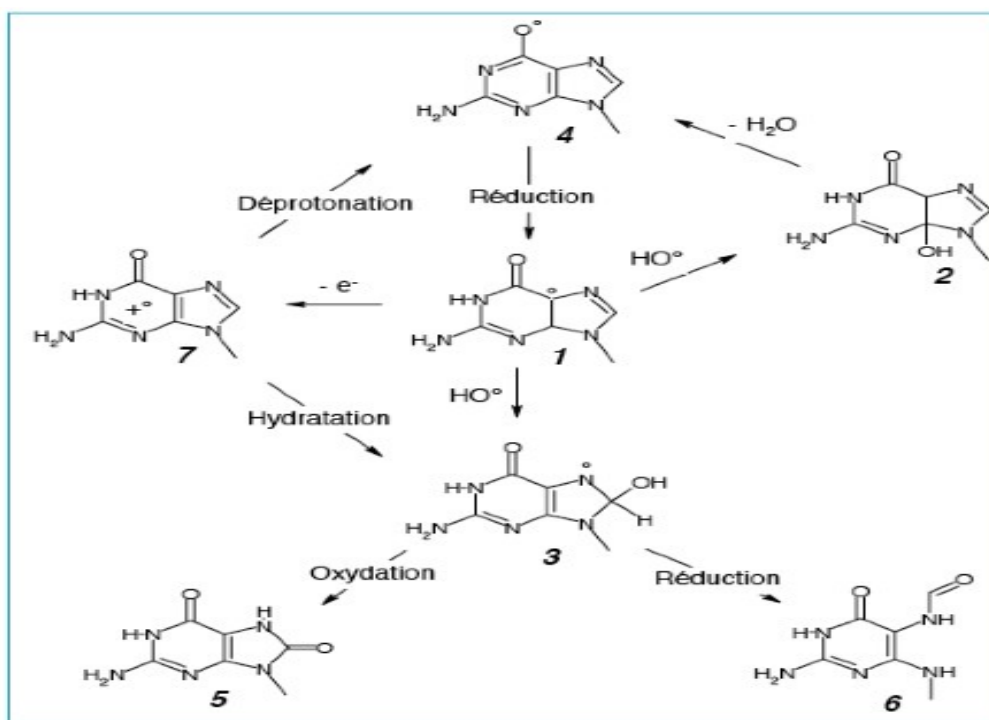


Figure 21 : Mécanisme de formation radio-induite par ionisation (effet direct) et par radical hydroxyle (effet indirect) de deux produits majoritaires et de dégradation de la guanine(1) : la 8-axo-7,8-dihydroguanine (5) et la 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (6) [88].

Ces différents dommages de l'ADN semblent fortement impliqués entre autres dans les phénomènes de cancérisation [89, 90]. En effet, la 8-OHdG est considérée comme une lésion pré-mutagénique car elle peut conduire, en l'absence de réparation, à une transversion GC → TA [91].

C.4.3. Modification de base par fixation de produits secondaires : formation d'adduits de L'ADN

Les aldéhydes réactifs issus de la peroxydation lipidique (dont le MDA et le 4-HNE) peuvent s'ajouter au groupe amine des bases de l'ADN et constituer ainsi une autre classe de dégâts oxydatifs de l'ADN [90, 92].

Le MDA réagit avec les acides nucléiques et forme des adduits aux bases dG, dA et dC. Il semble que le M1dGuo soit adduit le plus souvent formé. Cependant, une formation de M1dGuo serait possible, indépendamment de la peroxydation lipidique, par oxydation directe de l'ADN [92].

Le 4-HNE peut se fixer aux bases nucléotidiques pour former préférentiellement le 4-HNE-Guo [93].

Ces différents dommages de l'ADN semblent fortement impliqués entre autres dans les phénomènes de cancérisation [90, 93] de même que les mutations de l'ADN mitochondrial pourrait être impliquées dans les phénomènes de mort cellulaire en altérant le fonctionnement mitochondrial [91].

C.4.4. Modification des sucres de l'ADN

Une catégorie majeure de dommages oxydatifs de l'ADN est représentée par les cassures simple brin qui résultent principalement de l'arrachement initial par le radical HO° d'un atome d'hydrogène sur le résidu 2-désoxyribose en positions C3, C4 ou C5 et à un degré moindre sur le carbone 2 [94, 95, 96]. L'arrachement d'un atome d'hydrogène en position 1 du 2-désoxyribose par HO° conduit à la formation de 2-désoxyribonolactone [97, 98, 99, 100]. Cette lésion que l'on peut considérer comme un site abasique oxydé est susceptible de former un lien covalent avec plusieurs enzymes de réparation de l'ADN [101, 102, 103].

D. Stress oxydant et altération des glucides

Les cibles glucidiques sont essentiellement le glucose et les protéoglycanes du cartilage. L'oxydation au sens large du glucose est aussi appelée « glycosoxydation » et regroupe en fait 2 mécanismes possibles [12]:

➤ Soit oxydation au sens strict du glucose, donnant des dérivés carbonyles susceptibles de réagir avec une protéine, pour aboutir à la formation de « produits finaux de glycosylation » ou PFG (AGEs en anglais pour « advanced glycation end-products »).

➤ Soit formation d'une liaison covalente entre un ose et les groupements aminés libres d'une protéine : on parle de « glycosylation non-enzymatique des protéines ». Cela forme une protéine glyquée, qui peut être attaquée par des ERO telles que HO° ou NO_3^- pour former des PFG.

Ces PFG sont d'une importance capitale, car en présence de métaux de transition ils favorisent la libération d' $\text{O}_2^{\cdot-}$, et fragilisent les parois vasculaires et la rétine chez les patients diabétiques [104].

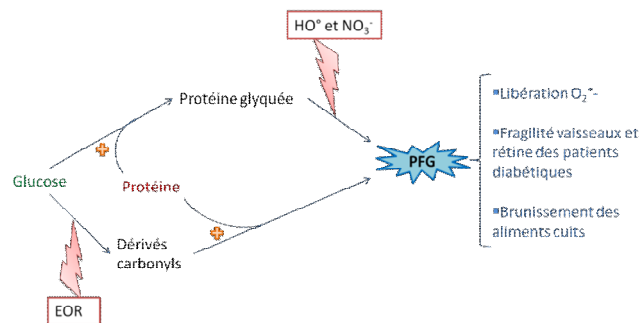


Figure 22 : Oxydation au sens large du glucose ou « Glycosoxydation », selon les 2 voies principales : glycosylation non enzymatique des protéines en haut, et oxydation au sens strict du glucose en bas. PFG : produits finaux de glycosylation [12].

En définitive, il apparaît que les cibles des ERO sont nombreuses dans la mesure où l'ensemble des molécules peut être touché. Pour autant les dommages les plus néfastes pour la cellule sont la peroxydation des lipides membranaires, et les altérations de l'ADN.

II. CONSEQUENCES DIRECTES DES ALTERATIONS BIOCHIMIQUES A L'ECHELLE CELLULAIRE

A. Conséquences fonctionnelles des altérations des lipides

La première conséquence de la peroxydation lipidique sur les cellules concerne la perturbation de la structure et de la composition des membranes cellulaires. La peroxydation des acides gras polyinsaturés des phospholipides membranaires fragilise leur chaîne carbonée qui finit par casser. Cette altération dans la fonction de barrière de la bicouche phospholipidique se manifeste généralement par une baisse de la fluidité membranaire et une augmentation de sa perméabilité.

La diminution de la fluidité entraîne une rigidification de la membrane, dont la première conséquence est la perte de la déformabilité globale de la cellule, pouvant entraîner la rupture cellulaire suite à une contrainte mécanique normalement supportée par la structure biphospholipidique. Ce phénomène est particulièrement palpable chez les hématies au passage dans les plus petits capillaires (hémolyse). Les hématies, qui traversent les tissus producteurs d'ERO sont particulièrement sensibles à cette peroxydation lipidique en situation de stress oxydant [105].

Les protéines membranaires comme des enzymes, transporteurs et canaux ioniques, ou encore des récepteurs sont sensibles aux modifications de la composition de la membrane; leur activité peut se retrouver modifiée par la baisse de la fluidité membranaire, pouvant avoir un impact notable sur l'ensemble du métabolisme cellulaire. Par exemple, l'exposition de cellules en culture ou de liposomes in vitro a pour conséquence l'altération des flux calciques [106].

Dans le cadre de la membrane mitochondriale, la rigidification des membranes entraîne une altération du mouvement latéral des protéines membranaires et notamment des complexes de la chaîne de phosphorylation oxydative. Ce mécanisme entre également dans le dysfonctionnement mitochondrial déjà évoqué plus tôt [67].

La peroxydation lipidique initiée par les radicaux libres génère également un large spectre d'aldéhydes réactifs. Ces aldéhydes, plus stables, amplifient les dégâts oxydatifs dans le temps et à distance de leur point de genèse, même une fois la production d'ERO terminée, en générant un mélange complexe de produits toxiques qui s'attaquent notamment aux protéines environnantes. Ils peuvent notamment modifier les chaînes aminées en formant des radicaux carbonylés.

C'est particulièrement le cas pour le 4-hydroxynonanal (4-HNE), l'acroléine et le malondialdéhyde (MDA). Très généralement retenus comme de simples marqueurs du stress oxydant, on oublie souvent que dans les conditions physiologiques le MDA et le 4-HNE par exemple modifient des protéines contenant de la lysine, les groupements imidazole de l'histidine, l'arginine, la méthionine et les groupes sulfhydryles (C—S) des cystéines [70].

L'exemple du 4-HNE est particulièrement illustrateur du pouvoir délétère et de la contribution toxique de ces aldéhydes au stress oxydant. Cette molécule est classée comme « second messenger toxique des radicaux libres » et pourrait être impliquée dans la physiopathologie de nombreuses maladies, surtout chez l'homme [113, 114], incluant l'athérosclérose, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la cirrhose du foie et plusieurs cancers. Sa haute réactivité provient particulièrement de l'association d'une double liaison covalente C=C avec un groupement carbonyle (>C=O, caractéristique des alkénals) [114].

On pense que ces aldéhydes favoriseraient le développement de plusieurs maladies où le stress oxydant est impliqué en entretenant des réponses proinflammatoires et profibrogéniques [70, 115].

D'autres auteurs ont trouvé des effets délétères du 4-HNE dans la communication transductionnelle. Leurs résultats suggèrent qu'à des concentrations pathologiques il réagit avec la surface de multiples types cellulaires et sites intracellulaires, aboutissant à la suppression des fonctions cellulaires pour entraîner l'apoptose [116].

Enfin, le 4-HNE, pourrait également contribuer à la diminution du pool de glutathion réduit en se conjuguant au GSH par double liaison covalente >C=C< [117].

Les isoprostanes générés *in vivo* par peroxydation des phospholipides, et plus particulièrement de l'acide arachidonique, sont également biologiquement actifs. Suivant leur nature chimique, ils peuvent être de puissants vasoconstricteurs ou vasodilatateurs. D'autres encore peuvent entraîner la résorption osseuse ou altérer l'agrégation plaquettaire normalement induite par l'ADP ou le contact avec le collagène. On attribue ces actions biologiques diverses à leur similarité structurale avec les éicosanoïdes (prostaglandines et leukotriènes) qui leur permettraient de se fixer sur leurs récepteurs [67].

L'oxydation des LDL tient un rôle clef dans l'initiation et le développement de la plaque athéroscléreuse. Les LDL oxydées deviennent cytotoxiques vis-à-vis des cellules endothéliales, par le biais des oxystérols essentiellement. Ces LDL modifiées sont reconnues par les macrophages au sein desquels elles s'accumulent en formant des cellules spumeuses (un macrophage gonflé de gouttelettes de graisse (LDL)). En s'accumulant dans l'espace interstitiel, ces cellules participeraient au développement de la plaque d'athérome [114].

Pour mémoire, des dommages indirects sur l'ADN peuvent résulter de l'attaque des aldéhydes issus de la peroxydation lipidique, formant des adduits sur les bases de l'ADN de type MDA-guanine par exemple [2].

B. Conséquences fonctionnelles des altérations des protéines

Il n'existe pas de système de réparation des protéines connu, sauf quelques enzymes dont l'action n'est que très ponctuelle ; on retiendra par exemple l'action conjointe de la méthionine sulfoxyde réductase et des peroxyrédoxines qui permettent la réduction du sulfoxyde de méthionine en méthionine.

Les protéines oxydées sont généralement détruites par les cellules comme mécanisme de défense. Ce mécanisme est orchestré par les protéasomes et quelques protéases des lysosomes. Les protéasomes sont des complexes enzymatiques multiprotéiques intracellulaires ayant pourtant une action assez modeste. Dans certains cas, les protéines fortement dégradées peuvent s'agréger entre elles sans pouvoir être éliminées par les protéasomes et s'accumulent alors dans le cytoplasme. Cette accumulation peut éventuellement dérégler le métabolisme cellulaire et mener à la mort de la cellule [107].

En effet, les protéines oxydées qui ne sont pas dégradées ont des propriétés biologiques modifiées souvent dues à un changement conformationnel. Il est impossible de citer toutes les conséquences fonctionnelles de l'attaque du stress pour la cellule oxydant sur les protéines ; cependant certaines d'entre elles sont mentionnées ci-après.

B.1. Dysfonctionnements enzymatiques

Les modalités d'altération des enzymes sont très variées. Bien sûr, l'oxydation d'acides aminés comme la cystéine peut désorganiser la structure protéique, pouvant alors changer la conformation des sites actifs et des sites modulateurs. De même, les nitrations mènent très souvent à l'inactivation enzymatique : le meilleur exemple concerne la SOD elle-même [76].

De nombreuses enzymes contiennent des métaux de transition indispensables à leurs fonctions biologiques. La dégradation de ces protéines peut notamment libérer dans le milieu de ces métaux et exacerber le stress oxydant ambiant. L'interaction simple que peuvent entretenir les métaux de transition avec les radicaux libres peut suffire à perturber le fonctionnement enzymatique. Ainsi, si on reprend la SOD, on remarque que la dismutation d' $O_2^{\circ-}$ diminue également en présence de peroxy-nitrite et/ou de NO° en quantité suffisante par un mécanisme de M-nitrosylation.

Enfin, l'affinité du monoxyde d'azote pour les radicaux libres l'amène également à inhiber de manière réversible les enzymes ayant des radicaux libres dans leur chaîne réactionnelle comme la ribonucléotique réductase (utilisant le radical tyrosyle).

La ribonucléotide réductase intervient dans la synthèse de l'ADN ou de sa réparation en produisant des désoxyribonucléotides di- ou triphosphates à partir de ribonucléotides di- ou triphosphates [108].

B.2. Dysfonctionnement des anticorps et perte des propriétés antigéniques des protéines.

Ce point a toute son importance dans l'entretien des mécanismes d'inflammation chroniques sur des sites soumis à un stress oxydant où une modification des épitopes cellulaires des récepteurs protéiques (reconnus alors étrangers) peut être constatée.

Sur le plan immunitaire, les AGEs peuvent également être reconnues par les monocytes, les macrophages et d'autres cellules via des récepteurs spécifiques, pouvant activer une réponse inflammatoire inappropriée au sein du site de production des ERO [67].

B.3. Dégradation des propriétés physicochimiques et biomécaniques des protéines.

Pour illustration, reprenons l'exemple de la nitration opérée par le peroxy-nitrite. Le peroxy-nitrite est responsable de la nitration de la chaîne latérale de la tyrosine et de sa conversion en nitrotyrosine. Il semble que les protéines structurales soient les plus atteintes par cette dégradation. Par exemple, chez les neurofilaments L de l'homme la nitration des tyrosines en nitrotyrosines transforme des résidus normalement hydrophobes en résidus hydrophiles chargés négativement, empêchant alors la complexation des sous-unités protéiques en une longue structure polymère [67].

De même, une étude a montré que le degré de nitration du collagène de type I était corrélé à une réduction de sa déformabilité et de la capacité des fibroblastes à restaurer la matrice collagénique ; la nitration entraînée par le peroxy-nitrite peut donc directement altérer les propriétés biomécaniques des tissus conjonctifs [76].

Enfin, la nitration du fibrinogène par le peroxy-nitrite peut également favoriser sa transformation en fibrine, initiant alors la coagulation intravasculaire.

L'accumulation des AGEs dans les protéines est généralement irréversible sauf si la protéine est dégradée. Pour illustration, au sein du collagène, les AGEs diminuent l'élasticité globale du tissu et sa résistance à l'étirement [67].

B.4. Dysfonctionnement/modulation des récepteurs cellulaires, des signaux de transduction et perturbation des fonctions de régulation

On retrouve des résidus cystéines « redox-sensibles » dans les récepteurs membranaires, des protéines d'adhésion, des protéines du cytosquelette chez les mammifères. Les domaines riches en cystéines au sein des récepteurs membranaires permettent une régulation du métabolisme et de la croissance cellulaire par le potentiel redox extracellulaire. Les récepteurs comme EGFR (« Epithelial Growth Factor Receptor ») et les récepteurs NMDA (au N-

méthyl-D-aspartate) en font partie. Dans le milieu intracellulaire aussi, certaines kinases et des phosphatases impliquées dans la cascade transductionnelle ont des sites sensibles à l'environnement redox qui module leur activité [74].

Par ailleurs, la formation de la nitrotyrosine est susceptible d'altérer la communication cellulaire puisque de nombreuses protéines impliquées dans plusieurs signaux intracellulaires utilisent la phosphorylation de la tyrosine pour leur activation [109].

B.5. Dysfonctionnement du transport protéique et du métabolisme énergétique

Chez les animaux, plusieurs études ont montré que le métabolisme énergétique pouvait être une cible directe pour $O_2^{\circ-}$ chez les mammifères.

Ainsi, l'aconitase (enzyme du cycle de Krebs transformant le citrate en isocitrate) possède comme de nombreuses enzymes des groupements [Fe-S]. Ces propriétés la rendent particulièrement sensible aux dégâts oxydatifs entraînés par la réaction de Fenton. Il a aussi été reporté qu' $O_2^{\circ-}$ pouvait inactiver la NADH déshydrogénase dans des mitochondries bovines in vitro.

Les protéines mitochondriales sont particulièrement exposées aux radicaux libres, particulièrement lorsque un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire est présent et notamment le canal membranaire VDAC (pour « voltage dependent anion channel »). De plus, la glycoxydation des protéines dans la chaîne respiratoire mitochondriale diminue l'efficacité du transport électronique, favorisant la fuite des électrons [67].

À des concentrations minimolaires, le monoxyde d'azote peut également inhiber la cytochrome-c oxydase, ce qui peut amplifier la fuite des électrons de la chaîne respiratoire mitochondriale [108].

C. Conséquences fonctionnelles des altérations de l'ADN

❖ ADN nucléaire

L'attaque radicalaire de l'ADN est quotidienne puisque le nombre de lésions se formant chaque jour dans une cellule au niveau de l'ADN est estimé à 10⁴ en moyenne. Heureusement, la fidélité de la séquence de notre ADN cellulaire est maintenue grâce à des systèmes de réparation perfectionnés, dont les principaux sont la réparation par excision de base ou par excision de nucléotide, couplées ou non à la transcription, le système de réparation des mésappariements et la réparation par recombinaison [2].

Cependant, les dégâts oxydatifs sur les bases azotées de l'ADN s'accumulent tout au long de la vie cellulaire et peuvent influencer de manière significative la sénescence cellulaire. Par exemple, les cellules sénescents présentent jusqu'à 30% de guanine oxydée dans leur ADN et quatre fois plus de 8-oxoguanine libre [110].

On imagine aisément que les altérations oxydatives de l'ADN induites par le stress oxydant sont particulièrement impliquées dans le vieillissement des cellules de faible capacité de renouvellement ou qui ne se divisent pas.

En cas de stress oxydant massif, les lésions non réparées comme les cassures et les absences ponctuelles en bases azotées s'accumulent et vont perturber les mécanismes de réplication de l'ADN et interférer avec la réplication et la transcription de l'ADN [2].

Ainsi, les liaisons croisées (comme thymidine—tyrosine) interfèrent significativement sur la réplication, la transcription, et la réparation de l'ADN [111] ; une impossibilité de copie de l'ADN en cas de dégradation oxydative sévère de l'ADN aboutira inévitablement à l'apoptose [2].

❖ ADN mitochondrial

Les conséquences des dégâts oxydatifs sur la double hélice et le mécanisme de formation des mutations sur l'ADN mitochondrial sont similaires à ceux de l'ADN nucléaire. Cependant, quelques précisions supplémentaires peuvent être apportées.

Chez l'homme il a été évalué que le taux de mutation de l'ADN mitochondrial est 20 fois supérieur à celui de l'ADN nucléaire. Le défaut du système de réparation de l'ADN dans la mitochondrie par rapport au noyau explique ce constat.

Les modifications dans l'ADN mitochondrial peuvent être responsables d'une libération accrue d'ERO et entraîner un cercle vicieux entre la production d'ERO avec les dégâts oxydatifs. Ce cercle vicieux mène rapidement à un déclin progressif des fonctions bioénergétiques des cellules concernées, et alors à la mort cellulaire.

Le dysfonctionnement mitochondrial entraîné par les modifications de l'ADN mitochondrial a été relié à la physiopathologie de nombreuses affections dégénératives chroniques [112].



Partie 3 :
Mesure du stress oxydant



I. EXPLORATION DU STRESS OXYDANT

Le stress oxydant n'est pas une maladie mais il crée les conditions de la maladie ou les accélère. Le diagnostic et le suivi ont donc une importance fondamentale dans le cadre de la médecine préventive, de la santé, du suivi des traitements et des pathologies.

L'implication du stress oxydatif dans le développement de nombreuses pathologies et dans le processus de vieillissement est largement documentée dans la littérature scientifique.

Un certain engouement a pu faire penser que les antioxydants pouvaient être la solution pour traiter et prévenir les maladies les plus graves, et bien vieillir. La prise empirique de certains antioxydants sur le long terme apparaît de plus en plus discutable. D'où l'intérêt grandissant pour la recherche de marqueurs du stress oxydatif.

Le bilan de stress oxydatif ne renseigne pas sur l'existence de telle ou telle pathologie. En revanche, certains marqueurs objectivent des risques plus élevés de développer dans un futur plus ou moins proche, différentes maladies.

Le bilan de stress oxydant permet de :

- Mettre en évidence des déficits en antioxydants
- Rechercher les origines possibles d'un stress oxydant
- Suivre les effets d'une prise en charge éventuelle
- Déceler une auto-médication excessive (éventuellement néfaste) en antioxydants
- Estimer les facteurs de risque de stress oxydant liés à certaines affections
- Fournir aux médecins des critères de décision [144].

1. Indication du stress oxydant

Le bilan de stress oxydatif s'impose dans les périodes liées à un stress, surmenage, fatigue intense, à des contraintes nouvelles ou anormales exposent la personne à une agression oxydative importante avec risque de maladies et quoiqu'il en soit de vieillissement accéléré.

Les situations où ce bilan est indiqué :

- ✓ L'existence d'une maladie chronique, évolutive pour laquelle la prise d'antioxydant est justifiée.
- ✓ La prise de conscience de la nécessité de prévenir les maladies, en particulier dégénératives, et de vieillissement.
- ✓ Après un événement difficile ou une période particulièrement stressante. Chez les sportifs de haut niveau en particulier.
- ✓ Lorsque l'on prend déjà, et qui plus est, depuis longtemps des suppléments alimentaires. Ceci permettra de faire le point et d'adapter la prescription [146].

2. Conditionnement et prélèvements

L'établissement de normes de référence ne peut s'envisager que si les échantillons sanguins sont prélevés dans de bonnes conditions.

Le système de prélèvement utilisé doit ainsi éviter au maximum la formation de tout phénomène d'hémolyse qui peut engendrer des artéfacts au niveau de l'analyse plasmatique de certains paramètres (lipides oxydés, vitamine C, sélénium,...).

Les prises de sang doivent toujours se faire entre 8 et 10 heures du matin. Il existe en effet des cycles circadiens qui modifient considérablement certains paramètres, comme la concentration en glutathion réduit ou en isoprostanes [146].

Les sujets doivent être à jeun depuis la veille au soir. A titre d'exemple, il faut un minimum de 6h à 8h pour que s'atténue l'augmentation temporaire de la vitamine C liée à la simple absorption d'un jus d'orange.

Les sujets doivent éviter toute activité sportive la veille du prélèvement puisque l'exercice physique induit un stress oxydant auquel l'organisme répond temporairement en surexprimant ses défenses antioxydantes.

Idéalement, les sujets doivent aussi s'astreindre à ne pas fumer (une source importante de production d'ERO) dans les heures qui précèdent la prise de sang.

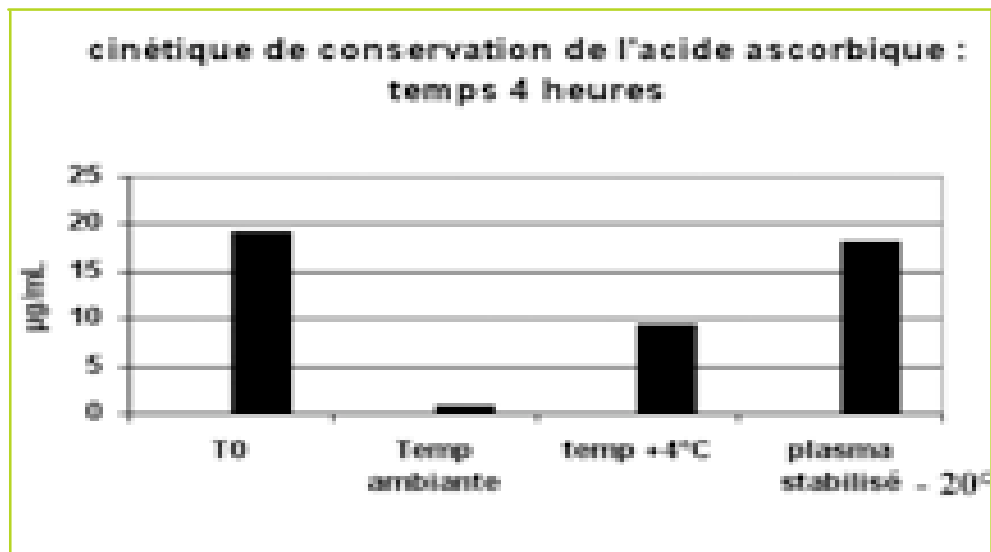


Figure 23 : Stabilité de la vitamine C selon les conditions de conservation de l'échantillon plasmatique [148].

Dans le cadre du cycle menstruel chez la femme, il est nécessaire de faire la prise de sang dans la phase folliculaire ou lutéale, car la production du 17 β -œstradiol, maximale au moment du pic ovulatoire est associée avec une augmentation d'environ 20 % du sélénium et de la glutathion peroxydase [144].

Enfin, il faut tenir compte du fait qu'il peut aussi exister des variations relativement importantes d'un jour à l'autre de la concentration de certains marqueurs, comme les isoprostanes par exemple [149].

3. Traitement pré analytique

Les règles d'or du traitement pré-analytique, au niveau du traitement pré-analytique de l'échantillon sanguin, deux règles d'or doivent toujours être de mise :

- centrifugation immédiate des tubes sanguins.
- et congélation des échantillons de plasma à une température comprise entre -40° et -80°C jusqu'à leur analyse.

Dans certains cas (vitamine C, glutathion oxydé), des stabilisateurs doivent être ajoutés. Ces précautions qui relèvent des bonnes pratiques de laboratoire sont basées sur les 3 considérations suivantes.

Premièrement, les antioxydants agissent dans le sang en synergie (système redox) et la concentration de l'un dépendra donc de celle de l'autre. Sachant que la vitamine C et le glutathion réduit (GSH), deux antioxydants majeurs de ce réseau complexe, sont bien connus pour leur caractère labile une fois le sang prélevé, il convient donc de "figer" au plus tôt ce réseau afin d'avoir le meilleur reflet possible de ce qui se passe in vivo.

Deuxièmement, il est connu depuis longtemps que beaucoup de marqueurs d'oxydation (notamment au niveau des lipides) se dégradent très vite en sous-produits dans le tube sanguin.

Troisièmement, les globules blancs, qui produisent naturellement et en permanence des ERO, peuvent être suractivés par certains anti-coagulants comme l'héparine, ce qui représente donc une source ex vivo non désirable de production d'ERO dans le tube sanguin. Dans ce contexte, imaginons donc ce qui pourrait se passer au niveau de la concentration en antioxydants chez un patient présentant un phénomène inflammatoire et dont l'échantillon sanguin ne serait traité que plusieurs heures après le prélèvement.

Afin de garantir un résultat de qualité, il est indispensable de sensibiliser au maximum le personnel de laboratoire à tous ces problèmes. Un stress oxydant ne se mesure pas comme un simple cholestérol [142].

II. EVALUATION EXPERIMENTALE DU STRESS OXYDANT

A. Principe de l'exploration du stress oxydant

Dans les systèmes biologiques, le stress oxydant est souvent caractérisé par les paramètres suivants:

- Une augmentation de la formation de radicaux libres ou d'autres oxydants
- Un déséquilibre du statut redox cellulaire
- Une diminution du pool d'antioxydants non-enzymatiques
- Une diminution de l'activité des enzymes antioxydantes
- Une augmentation des molécules témoins des dégâts oxydatifs (par exemple sur les lipides, les protéines ou encore l'ADN) [10].

B. Moyens d'exploration

Les moyens d'exploration présentés dans les parties qui suivent regroupent les principaux protocoles retrouvés dans la bibliographie ; cependant cette liste est évidemment non-exhaustive.

B.1. Méthodes directes

B.1.1. Résonance Paramagnétique Électronique

Le spectromètre à Résonance Paramagnétique Électronique (RPE) permet de mesurer directement les radicaux libres. Cependant elle est très difficile à utiliser *in vivo*. Elle est souvent associée aux techniques de « spin trapping » pour augmenter la sensibilité de la technique [76].

Schématiquement, la RPE désigne la capacité de certains électrons à absorber puis à réémettre l'énergie d'un rayonnement électromagnétique lorsqu'ils sont placés dans un champ magnétique précis (phénomène de résonance magnétique). Seuls les électrons non appariés, présents dans les espèces chimiques radicalaires, les sels et métaux de transition, ont cette propriété.

In vitro, la détection directe des radicaux lipidiques libres utilise un système continu de RPE dit « fast flow ».

La RPE « spin trapping » a pu être utilisée pour détecter une grande variété de radicaux dans les cellules et les tissus. Cette technologie utilise un composé diamagnétique, le « spin trap » qui réagit avec un radical libre pour former un radical plus stable (durée de vie moins brève) et plus facilement détectable (le « spin adduct »). Dans les systèmes biologiques, cette méthode permet notamment de détecter les radicaux hydroxyles et superoxydes ainsi que de nombreux produits issus de la peroxydation lipidique (radicaux peroxydes, alkoxydes et centrés sur le carbone). Deux molécules utilisées comme « spin traps » sont le 5,5-Diméthyl-pyrroline-1-oxide (DMPO) et l'alpha-(4-Pyridyl-1-oxide)-N-tert-butylnitron (POBN) [68].

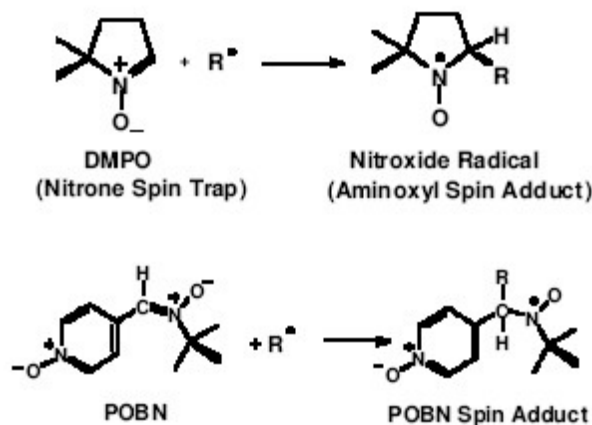


Figure 24 : Deux « spin traps » DMPO et POBN [68].

Le DMPO permet de capturer une grande variété de radicaux libres (de l'azote, de l'oxygène, du soufre et des radicaux centrés sur le carbone notamment), mais également parce que ses « spin adducts » ont une durée de vie plus grande et se concentrent en quantité suffisante pour être correctement analysés [119].

Le POBN « attrape » aussi des radicaux libres de l'oxygène mais la durée de vie des « spin adducts » est bien plus courte qu'avec le DMPO ; par exemple, la durée de vie du « spin adduct » issue de la réaction entre le POBN et HO• est d'environ 10 secondes. Cependant, le

POBN trouve son intérêt pour la détection des radicaux libres centrés sur le carbone, dont une partie des produits de la peroxydation lipidique, dont les « spin adducts » ont une durée de vie plus longue qu'avec DMPO. Pour cette dernière raison, POBN est souvent préféré à DMPO pour l'étude de la peroxydation lipidique [68].

Pour mémoire, on peut combiner l'utilisation de la RPE avec la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse pour préciser la nature des « spin adducts ». En effet, avec la technique de RPE standard on ne peut que connaître les types du radical (centré sur l'oxygène, sur le carbone ...) et la quantité de radicaux « attrapés » par POBN. Ainsi, la durée de vie des radicaux de POBN permet d'utiliser d'autres procédés pour caractériser la nature des produits radicalaires.

La présence de fer et métaux de transition dans les prélèvements biologiques est une autre limite du « spin-trapping ». En effet, leur présence, particulièrement dans l'étude des mécanismes de peroxydation lipidique, entraîne la formation de nouveaux radicaux libres (et notamment des radicaux alkyles) qui peuvent alors anéantir ceux qui sont étudiés par RPE ; par exemple :



De plus, étant par définition une réaction en chaîne, arrêter la peroxydation lipidique à un point précis du mécanisme étudié est très difficile [68].

Afin d'éviter la destruction des produits de RPE issus du « spin-trapping » par d'autres radicaux libres, des techniques d'extraction chimique ont également été utilisées pour notamment séparer les lipides (phase organique) de la phase aqueuse où se trouve le fer. Ainsi, on ralentit le cycle de peroxydation lipidique et limite également la destruction des POBN/L^o ou des DMPO/L^o.

Enfin, associer la RPE « spin-trapping » à des techniques d'extraction permet de différencier les radicaux selon les phases étudiées : par exemple on retrouvera les radicaux à longue chaîne lipidique dans la phase organique alors que les plus petits fragments iront plutôt dans la phase aqueuse. Evidemment, l'extraction permet de différencier les radicaux selon leur nature plutôt hydrophile ou lipophile [120].

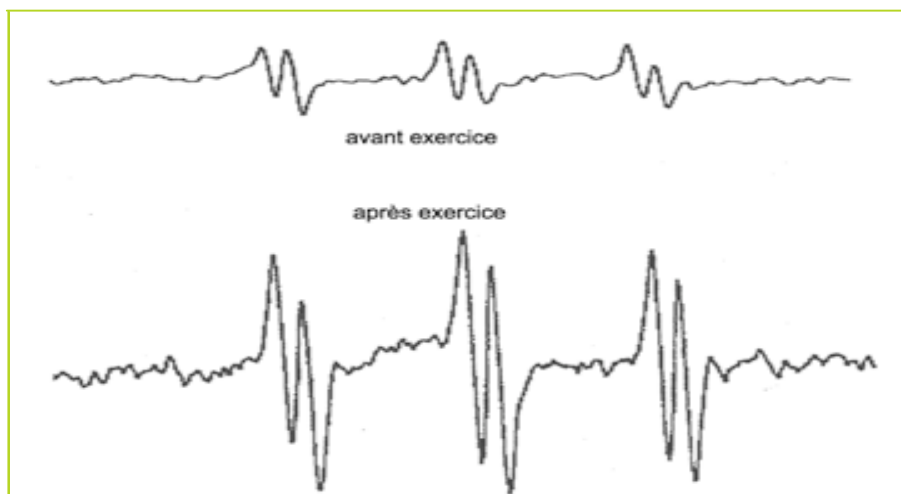


Figure 25 : Spectres de résonance paramagnétique électronique (RPE) de radicaux libres d'origine lipidique piégés par le spin trap PBN (alpha-phenyl N-tert-butyl nitron) obtenus dans le sang de sujets sains avant et après un exercice physique. La hauteur du signal est directement proportionnelle à la quantité de radicaux libres dans l'échantillon sanguin [76].

B.1.2. Chimioluminescence

La chimioluminescence utilise la propriété physique de certaines molécules excitées à réémettre de la lumière en retournant à l'état basal. Certains ERO, tel que l'oxygène singulet, en font partie. Elles peuvent être ainsi détectées directement dans les tissus et les organes sources. Pour l'oxygène singulet, deux types d'émission lumineuse peuvent être produites : l'émission infrarouge monomol (1270 nm, la plus utilisée au laboratoire) et l'émission dimol qui vient de la collision entre deux molécules d'oxygène singulet (630 à 701nm).

D'autres réactions impliquant des radicaux peuvent également émettre de la lumière comme la réaction de Fenton par exemple (en particulier entre le peroxyde d'hydrogène et les protéines de l'hème), ou encore certaines impliquant le peroxyde nitrite.

Cette technique permet une exploration et un suivi dynamique de la production de certains ERO lors d'un phénomène biologique d'intérêt au sein des cellules, tissus et organes isolés [67].

B.2. Méthodes indirectes : témoins de la peroxydation lipidique

B.2.1. Mesure de la fluidité membranaire érythrocytaire

Il existe plusieurs techniques de mesure de la fluidité membranaire comme la diffraction des rayons X, la microscopie électronique, la microcalorimétrie différentielle, la diffusion de la lumière, la résonance magnétique nucléaire (RMN) ainsi que les marqueurs paramagnétiques et de fluorescence. On distingue dans son travail trois niveaux d'analyse [105]:

- **Le niveau microscopique** permet d'obtenir des informations sur chacune des atomes ou molécules constitutifs des lipides. La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (spectroscopie RMN) est une technique utilisée. La spectroscopie RMN fournit des informations qualitatives très fines sur la coordination, la mobilité et l'environnement électronique immédiat des noyaux observés, ce qui permet de remonter à la structure moléculaire du composé étudié et à la symétrie de la phase dans laquelle il est inséré. Elle utilise la propriété de certains atomes à absorber l'énergie électromagnétique puis à la relâcher lors d'une phase de relaxation..

L'intégration des raies de RMN peut ainsi fournir des informations quantitatives sur la molécule étudiée. Les phospholipides ne donnent en général qu'une raie unique dite ^{31}P (seul atome ayant un spin nucléaire) dont le déplacement chimique est caractéristique de la nature de la tête polaire du lipide et des conditions du milieu. De fait, ces spectres ^{31}P n'apportent que des informations relatives à la tête polaire du lipide et non aux chaînes latérales hydrophobes.

Dans la bicouche lipidique, les phospholipides possèdent des orientations privilégiées et le passage d'une orientation à l'autre est souvent un phénomène lent qui peut être mesuré par RMN. Les spectres ^{31}P de ces systèmes sont donc plus ou moins larges suivant la mobilité des phospholipides. La forme du spectre est ainsi caractéristique de la phase phospholipidique et sa largeur à la base, appelée anisotropie de déplacement chimique, est reliée au degré de mobilité des groupes phosphates.

- **Le niveau sub-macroscopique** où l'on étudie de manière globale la fluidité membranaire à l'aide d'une sonde marquée « stable » et sa diffusion au sein de la membrane plasmique pendant un temps d'étude donné. Cela permet éventuellement de mettre en évidence une zone de rigidité membranaire, non spécifique. Pour ce faire, la polarisation de fluorescence ou RPE peuvent être utilisées [105].

- RPE

Schématiquement, la RPE utilise une sonde paramagnétique (classiquement l'acide 16-nitroxyde stéarique (16 NS)), constituée d'un acide gras saturé sur lequel est greffé au niveau du carbone 16 un radical nitroxy ($-\text{NO}^\circ$), « piégeant » en son sein l'électron célibataire. Cette sonde est un radical relativement stable et inoffensif pour la cellule. La sonde va ensuite se localiser près du centre de la bicouche biphospholipidique pour explorer la région hydrophobe de la membrane. On irradie alors l'échantillon avec une onde radio et on étudie le spectre émis par la sonde.

Libre, la sonde émet un spectre propre ; incorporé dans la membrane, le spectre prend une allure différente (en amplitude et en largeur de raie de résonance). L'analyse des spectres obtenus met notamment en évidence un temps caractéristique de la technique appelé temps de corrélation-relaxation. Ce temps de corrélation-relaxation T_c est inversement proportionnel à la largeur de la raie de résonance mais surtout inversement proportionnel à la fluidité membranaire.

La rotation de la sonde sur elle-même définit un cône ; T_c correspond au temps que met la sonde pour parcourir un radian (57°) de rotation. Si le cône est très large, cela signifie que la sonde a peu de contraintes: la sonde tourne très vite donc T_c est faible. Plus T_c est élevé, plus la fluidité membranaire est faible et inversement [105].

- Polarisation de fluorescence

Une molécule fluorescente (ou fluorophore) a la capacité d'absorber un photon d'une énergie suffisante pour lui permettre d'atteindre un état d'excitation (plus particulièrement un

de ses électrons). Après un moment qui peut être plus ou moins long (noté τ), cette molécule rejoint son état basal en perdant de l'énergie sous forme de chaleur et de photons.

Si on excite un échantillon avec de la lumière polarisée linéairement, on remarque que la fluorescence est, dans certains cas, également polarisée. Ainsi, lorsque de la lumière polarisée est appliquée à un groupe de fluorophores orientés de manière aléatoire par rapport à elle, les molécules qui pourront entrer en fluorescence seront celles qui seront disposées avec une angulation comprise dans un intervalle défini par rapport à cette lumière polarisée. Si elles ne sont pas en mouvements, la lumière qu'elles émettent sera elle aussi polarisée : le degré de polarisation de la fluorescence est quantifié par une grandeur appelée anisotropie de fluorescence, notée r .

Dans les protocoles expérimentaux, l'anisotropie de fluorescence est une mesure qui indique le degré de liberté d'une molécule fluorescente, le degré de liberté étant vu comme la facilité avec laquelle une molécule ou la partie fluorescente d'une molécule tourne sur elle-même.

Plus précisément, l'anisotropie est une mesure de la dépolarisation de la fluorescence, et ce dans la mesure où tout changement de direction pendant la durée de vie de l'état excité (τ) provoquera une diminution de l'anisotropie. La dépolarisation de fluorescence peut être causée par plusieurs phénomènes dont l'importance relative dépend de l'échantillon étudié (mouvement brownien, vibration de torsion, transfert d'énergie ...), mais la principale cause est la rotation par diffusion des fluorophores. La direction de l'émission de fluorescence dépend de la liberté de rotation du fluorophore dans le milieu.

A partir des intensités de fluorescence émises parallèlement (I_{pa}) et perpendiculairement au rayon incident (I_{pe}) on calcule alors le degré de polarisation (p) : $p = (I_{pa} - I_{pe}) / (I_{pa} + I_{pe})$.

Ainsi, grâce à la polarisation de fluorescence on peut évaluer son degré de mouvement de rotation dans une membrane plasmique et étudier la fluidité membranaire [98].

- **Le niveau macroscopique** correspondant à la formation de domaines lipidiques plus rigides (« îlots ») et pouvant être atteint par des mesures calorimétriques ou mécaniques.

La fluidité membranaire des érythrocytes pourrait être considérée comme un marqueur direct du stress oxydant dans certaines conditions mais est moins sensible que d'autres marqueurs du stress cellulaire tels que la mesure de la concentration plasmatique en peroxydes lipidiques spécifiques [105].

B.2.2. Méthode des TBARS

La méthode des TBARS est l'un des premiers tests d'étude du stress oxydant; en effet, au début des années 1980, peu d'autres méthodes simples étaient disponibles et surtout applicables à des prélèvements biologiques. Son développement a notamment suivi l'analyse plus approfondie du rancissement des graisses contenant des acides gras polyinsaturés dans l'industrie agro-alimentaire [121].

L'appellation TBARS vient de Thiobarbituric Acid Reactivity Reactive Substances. C'est une méthode très simple consistant à chauffer le prélèvement en condition acide et le faire réagir avec de l'acide 2-thiobarbiturique. L'obtention d'une solution rose signe un résultat positif. L'absorbance est lue par spectrophotométrie dans le visible.

Cette technique fut appliquée à de nombreuses reprises en médecine, impliquant alors les radicaux libres dans de très nombreux mécanismes physiopathologiques. Pourtant il n'a jamais été clair sur ce que cette technique mesure réellement, et cela a pris de nombreuses années avant que la communauté scientifique ne se rende compte du manque de spécificité et de fiabilité de la technique. Ainsi, le TBARS test a effectivement de la valeur pour évaluer l'oxydation globale de systèmes lipidiques définis, mais ne peut pas être utilisé pour comparer les peroxydations dans différents systèmes de compositions différentes en acides gras polyinsaturés, notamment des prélèvements in vivo (différents acides gras polyinsaturés génèrent des niveaux en TBARS différents) [67].

Ce manque de spécificité est notamment illustré par le fait que les TBARS sont retrouvés dans les fluides corporels et tissus en quantité augmentée chez n'importe quel individu malade, indépendamment de la physiopathologie de la maladie [121].

Ainsi, utilisée seule, la méthode de mesure des TBARS n'est pas fiable pour mesurer le niveau de peroxydation lipidique dans les cellules, les tissus ou d'autres fluides corporels. De plus, il faut bien rappeler que contrairement à ce que clament certaines études, la méthode des TBARS ne mesure pas spécifiquement le malondialdéhyde (MDA) dans un échantillon [67]. D'autres aldéhydes que le MDA peuvent également réagir avec l'acide thiobarbiturique et produire des composés qui absorbent la lumière dans les mêmes longueurs d'onde que le MDA.

De plus, la décomposition des peroxydes lipidiques pendant le test lui-même peut masquer le contenu en MDA présent dans le prélèvement avant les mesures. Cette décomposition est variable suivant la présence ou l'absence d'ions métalliques, dont les concentrations sont difficilement contrôlées dans les protocoles utilisant ce test [122].

B.2.3. Dosage des peroxydes lipidiques

La peroxydation lipidique est un système complexe produisant de nombreux peroxydes lipidiques. Il est possible de mettre en évidence et de quantifier un grand nombre de classes de peroxydes par chromatographie liquide haute performance. Certains protocoles utilisent également des enzymes de dégradation de ces peroxydes dont l'activité est ensuite mesurée par colorimétrie par exemple.

Un autre test mesurant les hydroperoxydes dans leur globalité et évaluant le statut global oxydant (d-ROMS test) a également été développé et sera revu plus tard [122].

B.2.4. Dosage des aldéhydes produits de la peroxydation lipidique

Comme nous l'avons vu précédemment, la peroxydation lipidique des acides gras polyinsaturés génère de nombreux aldéhydes. Ces derniers, bien que très variés et en concentration variable, peuvent être utilisés comme marqueurs du stress oxydant [70].

De nombreux α et β -aldéhydes insaturés ont été utilisés comme témoins du stress oxydant dans les systèmes biologiques : on retiendra notamment l'acroléine, le 4-hydroxynonenal (4-HNE) et le malondialdéhyde (MDA).

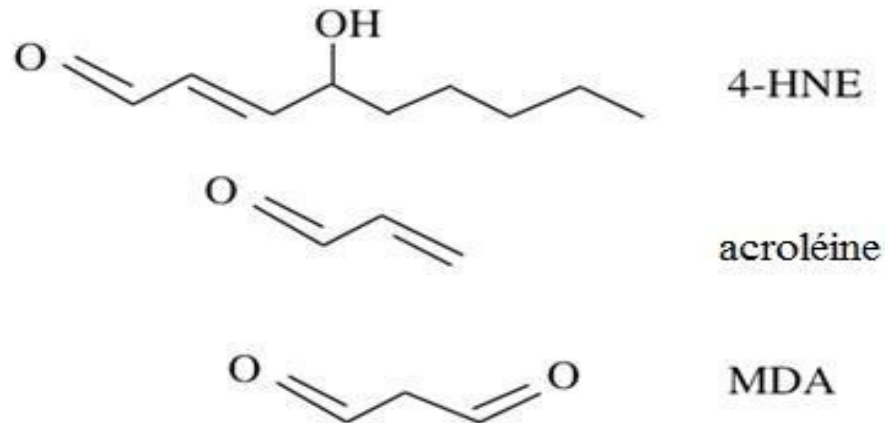


Figure 26 : 4-hydroxynonenal (4-HNE), acroléine et malondialdéhyde (MDA) [70].

❖ Acroléine

L'acroléine est un polluant issu de la combustion de nombreuses matières organiques et de plastiques (notamment la fumée de cigarette). Dans le cas du stress oxydant, c'est un métabolite naturel de la peroxydation lipidique. L'oxydation de la thréonine (acide aminé, homologue hydroxylé de la valine) par la myéloperoxydase (MPO) entraîne également une augmentation de l'acroléine.

C'est le plus réactif des trois. Comme pour le 4-HNE, il est aussi responsable de l'oxydation des protéines en réagissant avec les groupements sulfhydryls (S-H) des cystéines, des groupes imidazoles des histidines et mais aussi la lysine ; cette réactivité ne facilite pas son utilisation dans les modèles biologiques pour évaluer le stress oxydant.

La 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNPH), présente sur le support du dispositif de prélèvement, réagit avec l'acroléine pour former l'hydrazone correspondante, qui sera analysée en chromatographie liquide haute performance détection UV [70].

❖ **4-hydroxynonenal (4-HNE)**

Le 4-HNE appartient à la famille des alkénals. C'est un produit de la peroxydation lipidique, en particulier des acides gras polyinsaturés du groupe des $\Omega 6$ (1ère double liaison $>C=C<$ sur le 6ième atome de carbone) comme l'acide linoléique et l'acide arachidonique, particulièrement abondants dans les membranes cellulaires. C'est donc un marqueur d'intérêt pour l'étude du stress oxydant dans les systèmes biologiques et les organismes vivants [70].

La pharmacocinétique de 4-HNE a été caractérisée. Lorsqu'il est administré par voie intraveineuse ou intrapéritonéale, les métabolites du 4-HNE sont principalement excrétés dans la bile et l'urine, avec un fort cycle entéro-hépatique. Une très faible quantité de métabolites est liée aux protéines.

Deux groupes de métabolites existent : ceux liés à la conjugaison du 4-HNE avec le GSH par la glutathion-S-transférase puis sa réduction en alcool par une réductase, ou son oxydation par une déshydrogénase ; ceux lié à l'hydroxylation par le cytochrome P450 et son éventuelle conjugaison à la GSH et la formation de conjugués d'acide mercapturique éliminés par la voie biliaire [123].

Le dosage du 4-HNE est beaucoup moins répandu que celui du MDA en biologie clinique, toutefois, le 4-HNE peut être mesuré par des méthodes de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse [70].

❖ **Malondialdéhyde (MDA)**

Dans les prélèvements frais, le malondialdéhyde (MDA) est formé principalement par la peroxydation lipidique d'acides gras comme l'acide arachidonique [70].

Le malondialdéhyde trouve son intérêt dans le fait qu'il indique que des radicaux lipidiques ont été formés au sein de la membrane cellulaire [76].

Si initialement on pensait que le MDA était mis en évidence par la technique des TBARS, on sait aujourd'hui le doser spécifiquement avec ses produits de dégradation, notamment en utilisant la chromatographie liquide haute performance en phase inversée suite à une détection par fluorescence [70].

Par ailleurs la principale limite du dosage du malondialdéhyde est que les réactions chimiques qui permettent sa détection sont influencées par la présence de fer dans l'échantillon [76].

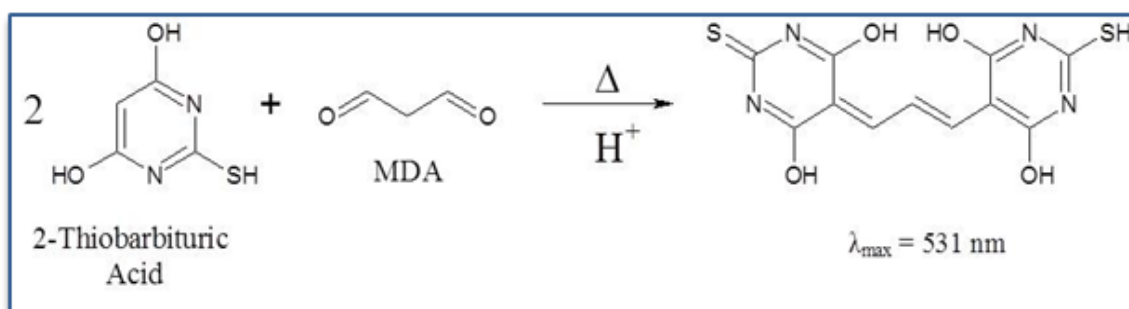


Figure 27 : Réaction du dialdéhyde malonique avec l'acide thiobarbiturique [70].

La réaction a lieu en milieu acide et à chaud entre le MDA et deux molécules de TBA, avec formation d'un pigment absorbant à 532 nm et extractible par les solvants organique comme le butanol.

B.2.5. Dosage des hydrocarbures volatils expirés

L'éthane et le pentane sont deux hydrocarbures produits dans les tissus lors de la peroxydation lipidique et pouvant être retrouvés dans l'air exhalé. L'éthane est notamment issu de l'oxydation des acides gras $\Omega 3$ tel que l'acide linoléique, alors que le pentane dérive plutôt de l'oxydation des $\Omega 6$ comme l'acide linoléique et l'acide arachidonique. On s'est parfois un peu plus intéressé à l'éthane car sa mesure chromatographique sur gaz (CPG) est plus facile et plus rapide que les autres hydrocarbures [124].

Le dosage du pentane et de l'éthane est particulièrement précis et répétable car les types d'acides gras dont ils dérivent sont trouvés de manière prépondérante dans les membranes cellulaires [122].

Une des difficultés inhérentes à ces mesures dans l'air expiré consiste à éliminer les hydrocarbures déjà présents dans l'espace mort des voies pulmonaires comme la trachée, illustrant les difficultés techniques de recueil chez l'animal [124]. De plus, les valeurs peuvent être affectées par la présence de dioxygène et de métaux de transition dans les milieux utilisées pour les protocoles de dosage [122].

B.2.6. Dosage des isoprostanes

Les isoprostanes ou composés "prostaglandines like" ont été décrits récemment comme des marqueurs de la peroxydation lipidique. A la différence des prostaglandines qui sont synthétisées par voie enzymatique (action des cyclo-oxygénases sur l'acide arachidonique), les isoprostanes résultent de l'attaque directe des ERO sur l'acide arachidonique des phospholipides, suivie d'une libération par une phospholipase. Ce sont des composés stables et spécifiques de la peroxydation lipidique qui peuvent être dosés au niveau des liquides biologiques et des tissus et qui fournissent un indice non invasif et quantitatif du stress oxydant. Leur mesure représente certainement la technique la plus spécifique d'évaluation de cette réaction en chaîne in vivo et in vitro [67].

De nombreux protocoles de mesure (notamment par chromatographie gazeuse et liquide haute performance) ont été développés pour mesurer les isoprostanes et leurs métabolites dans les urines et le plasma essentiellement (même à de très faibles concentrations).

Actuellement, l'isoprostane le plus fréquemment dosé est la 8-iso-prostaglandine deux alpha (8-iso-PGF₂α) en utilisant la chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (HPLC-MS/MS). Des méthodes immuno-enzymatiques ont été développées, dont certaines sont commercialisées sous formes de « kits ».

Un métabolite urinaire majeur de la 8-iso-PGF₂ a été identifié, il résulte d'une β-oxydation de la chaîne portant le carboxyle et de la réduction de la double liaison sur cette même chaîne [49].

Bien sûr, comme tous les marqueurs du stress oxydant, ils ne sont pas parfaits. Un des artéfacts classiques est que les isoprostanes peuvent aussi être produits par les plaquettes et ce indépendamment du stress oxydant [76]. De plus, une mauvaise conservation des prélèvements (particulièrement de plasma, moins fréquent pour l'urine) peut entraîner une peroxydation lipidique faussant les dosages en isoprostanes [67].

Les isoprostanes font parti des alcanes ciblés lors d'étude du stress oxydatif affectant plus spécifiquement les poumons et les voies respiratoires et peuvent aussi être également mesurés dans l'air expiré [124].

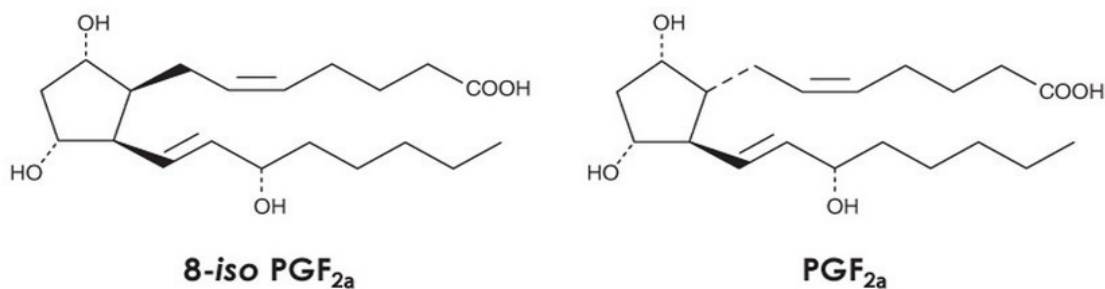


Figure 28 : Structure de la prostaglandine PGF_{2α} et de l'isoprostane iso-PGF_{2α} [49].

B.2.7. Dosage des diènes conjugués

Les diènes conjugués sont des diènes dont les deux doubles liaisons sont séparées par une liaison simple selon le motif -CH=CH-CH₂-CH₂-C=CH-. Ils ont l'avantage d'absorber la lumière ultraviolette à 230-235 nm, permettant des techniques simples de dosage par spectrométrie.

Les diènes conjugués sont parmi les premiers produits de la peroxydation des acides gras insaturés. Si certains considèrent leur mesure fiable et répétable, d'autres remettent en cause la technique, en parti à cause de la grande fragilité des prélèvements. Le régime alimentaire peut également modifier significativement la concentration tissulaire basale en diènes conjugués, diminuant la spécificité de la technique concernant le stress oxydant [122].

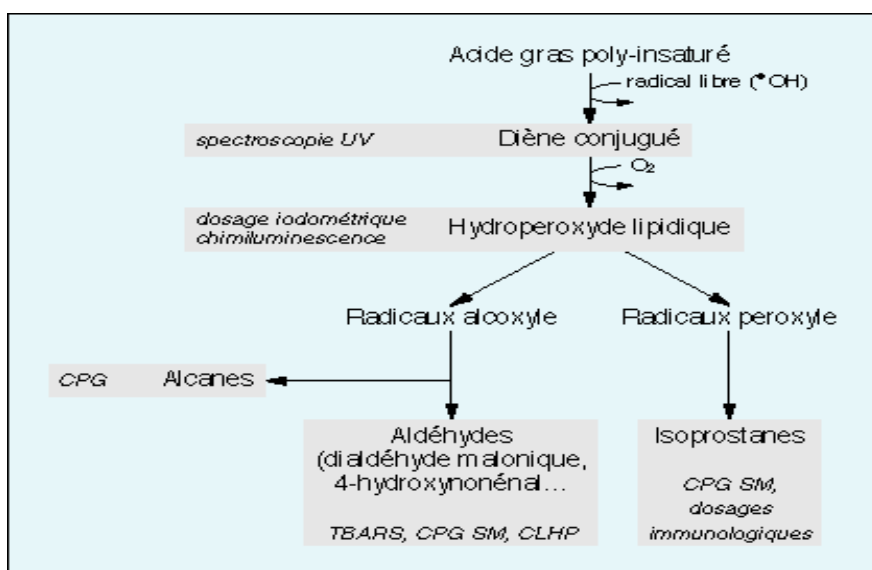


Figure 29 : Principaux marqueurs de la peroxydation lipidique et leurs dosages [49].

CPG-SM : Chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectrométrie de masse

CLHP : Chromatographie liquide en phase gazeuse à haute performance

TBARS : Substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (thiobarbituric acid-reactive substances)

B.3. Méthodes indirectes : témoins de l'altération des protéines

• Détection des carbonyles protéiques

Parmi toutes les modifications oxydatives des acides aminés des protéines, la formation de résidus carbonylés est certainement le marqueur le plus précoce et une bonne mesure de l'oxydation des protéines par les ERO [75, 78]. De nombreuses méthodes et protocoles de mesures ont été développés (spectrophotométrie, ELISA ...) et varient selon les laboratoires. Le dosage des carbonyles protéiques est adapté autant aux fluides qu'aux tissus biologiques.

Une méthode expérimentale courante consiste à utiliser le 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH, ou réactif de Brady, utilisé pour mettre en évidence les aldéhydes et les cétones) et ensuite mesurer la concentration en protéines carbonylées par spectrophotométrie à la longueur d'onde 370 nm [67, 125].

Ce dosage peut également être suivi de l'identification de ces protéines afin de cibler les régions et structures cellulaires affectées, pour plus de spécificité [67].

• Détection des protéines et acides aminés nitrates

Le but théorique de la mesure des protéines nitrates est de montrer que le stress oxydant suspecté implique la genèse de monoxyde d'azote, de la myéloperoxydase (MPO) mais surtout du peroxy-nitrite [76].

La 3-nitrotyrosine est généralement utilisée comme marqueur des dégâts oxydatifs lié à l'action du peroxy-nitrite. Dans les études concernant l'ostéoarthrose, le dosage de la 3-nitrotyrosine au sein de la matrice collagénique est fréquent [109].

B.4. Méthodes indirectes : témoins de l'altération de l'ADN

De nombreux produits de réaction des radicaux libres sur l'ADN ont été identifiés, tels que la 8-hydroxy-guanosine, le thymidine glycol, la 8-hydroxyguanine, la 8-hydroxy-adénine, la 5-hydroxy-méthyl-uracil, le cytosine-glycol [136]. Parmi les composés d'oxydation de l'ADN, deux d'entre eux se sont révélés être des marqueurs intéressants. Il s'agit de la 8-OH-dG et du thymidine glycol. La présence de ces produits d'oxydation peut être recherchée dans les cellules circulantes isolées ou dans des biopsies par la technique des comètes ou "Single technique Cell Gel Electrophoresis". Cette technique est l'une des plus sensibles et des plus faciles à mettre en œuvre. Elle permet de mettre en évidence les dommages de l'ADN au niveau de la cellule entière [137]. Elle est basée sur les propriétés de migration de l'ADN dans un champ électrique. Les cellules sont déposées sur un gel d'agarose coulé sur une lame de microscope. Les membranes plasmiques et nucléaires sont ensuite lysées et les lames sont incubées dans un milieu alcalin fortement salin qui permet la décondensation de l'ADN s'expliquant en partie par la perte des protéines de type histone. Sous l'action d'un champ électrique, l'ADN chargé négativement se déplace vers l'anode. Après électrophorèse, l'ADN peut être visualisé au moyen d'un marqueur fluorescent spécifique : le bromure d'éthidium. En absence d'altérations, la structure super-enroulée de l'ADN formée autour des nucléosomes persiste. Une rupture de brin induite par une altération de l'ADN suffit à relâcher une partie de l'ensemble et à permettre la migration de boucles d'ADN hors du nucléoïde en direction de l'anode, donnant ainsi une image de comète. L'ADN est alors réparti entre la tête de la comète (nucléoïde) et la queue de la comète [138].

Un exemple d'image obtenue est représenté sur la figure 30.

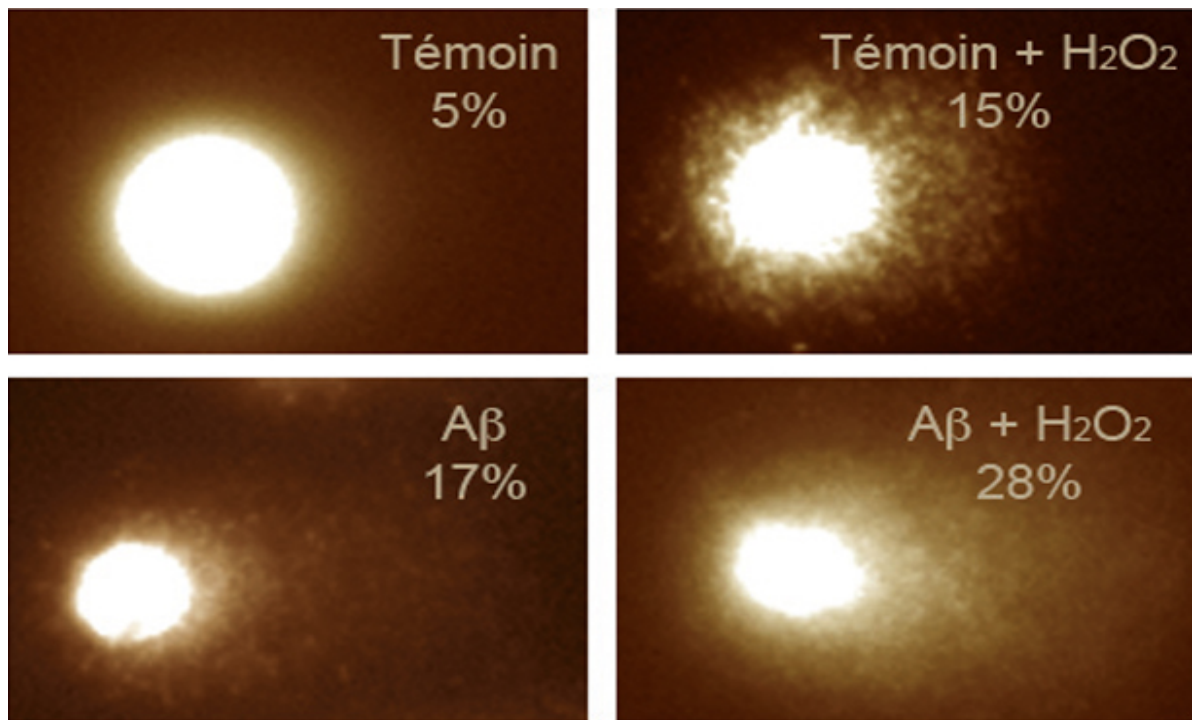


Figure 30 : Mesure des dommages de l'ADN par la méthode des comètes [138].

Les cellules témoins et irradiées ont été observées par microscopie à épifluorescence après coloration au bromure d'éthidium).

Les brins d'ADN cassés sont « extraits » du noyau des cellules par un champ électrique, et l'ADN est visualisé par fluorescence. Les noyaux prennent une forme de comète et le pourcentage de fluorescence dans la queue est corrélé à l'endommagement. Le peptide A β augmente le taux de lésion par rapport à l'échantillon témoin, et de façon encore plus marquée en présence d'eau oxygénée.

Ce marqueur, Le 8-OHdG est particulièrement bien filtré par le rein et concentré dans les urines. Ainsi un prélèvement d'urine est plus intéressant que du plasma. La 8-OH-dG dosée dans les urines ne représente que la forme libre et non incorporée à l'ADN [67].

❖ Méthode de dosage HPLC-MS/MS

L'intérêt pour la technique de CLHP-SM/SM n'a cessé de croître. Les molécules sont tout initialement séparées par CLHP avant d'arriver dans une source d'ionisation. Cette technique d'ionisation permet une ionisation douce des molécules. Une fois les molécules ionisées, ces dernières sont détectées en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z) dans un premier analyseur de type quadripôle.

L'utilisation de la spectrométrie de masse en mode tandem consiste à fragmenter ces molécules ainsi isolées dans le premier quadripôle à l'aide d'une cellule de collision, puis à détecter leurs fragments, appelés ion fils, dans un deuxième quadripôle. L'utilisation de spectromètres de masse en tandem permet d'être à la fois plus sensible et plus spécifique qu'un système de CHLP-SM simple [67].

Tableau VI : Biomarqueurs du stress oxydant ; les dérivés oxydés des macromolécules

	METHODE DE MESURE	SPECIFICITE DE LA PREDICTION DU STRESS OXYDANT	
RADICAUX LIBRES			
DERIVES OXYDES DES LIPIDES			
Diènes conjugués	Spectrométrie (234nm)	Mauvaise	Abandonnée
Peroxydes lipidiques	HPLC+ luminescence Spectrométrie	Bonne Bonne	Facile Facile
TBARS (thiobarbituric acid reactive substances)	Spectrométrie	Mauvaise	Facile
MDA	HPLC	Mauvaise	Difficile
4-hydroxynonéal (HNE)	HPLC+ CPG-SM +spectrométrie de masse	Bonne	Difficile
Métabolite HNE	Spectrométrie	Bonne	Facile
Ethane et pentane	Chromatographie gazeuse	Moyenne	Difficile
Hydroxydes	Spectrométrie (+anticorps)	Bonne	Potentielle
Oxystérols	HPLC +spectrométrie de masse	Bonne	Difficile
F2-isoprostanes	Chromatographie gazeuse + spectrométrie de masse Kit ELISA	Excellente Faible	Difficile et coûteuse Facile
LDL oxydées ou leurs anticorps	Kit ELISA	Bonne	Facile
Taille des LDL*	Electrophorèse	Bonne	Facile
DÉRIVÉS OXYDÉS DES PROTÉINES			
Protéines carbonylées	Spectrophotométrie	Mauvaise	Impossible
AOPP (advanced oxidation protein products)	Spectrophotométrie	Moyenne	Facile
DÉRIVÉS OXYDÉS DE L'ADN			
8-OHdG	Kit ELISA HPLC + spectrométrie de masse	Moyenne Excellente	Facile Difficile
Cassures de l'ADN	Electrophorèse + fluorescence ("COMET")	Excellente	Facile

B.5. Méthodes indirectes : Mesure des défenses antioxydantes

❖ Mesure de l'activité des antioxydants enzymatiques

✚ SOD

Le dosage de l'activité de la SOD est fait à l'aide du kit. Rappelons que cette enzyme catalyse la dismutation de l'ion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en une molécule d'oxygène. Ce kit permet le dosage de la SOD grâce au sel de tétrazolium WST-1.

En présence de l'ion superoxyde, ce sel produit un colorant très soluble dans l'eau, le WST-1 formazan. La Xanthine oxydase est ajoutée au milieu réactionnel afin de générer les anions superoxyde. Ainsi, la présence de la SOD dans le milieu réactionnel va diminuer la concentration des anions superoxyde et en conséquent la quantité du WST1-formazan va diminuer. De la sorte, la présence de SOD va inhiber la réaction. Le pourcentage d'inhibition peut être quantifié par la mesure de la décroissance de la coloration à 450 nm [120].

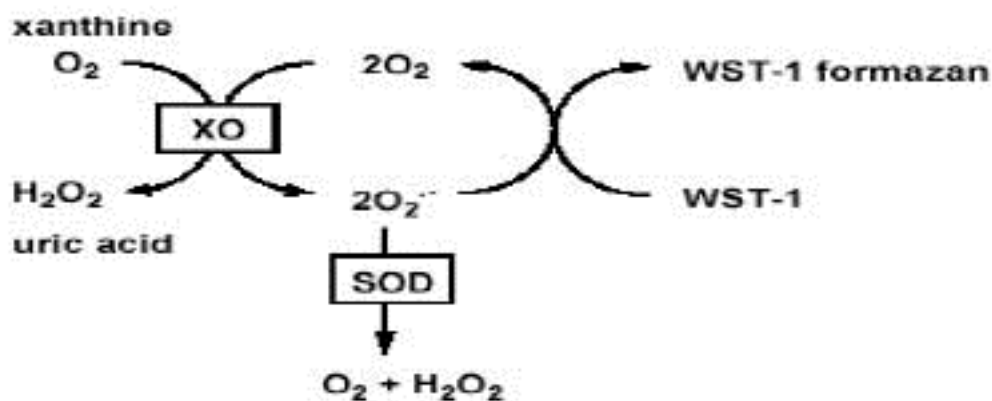


Figure 31 : principe de dosage de SOD [120].

La SOD est utilisée depuis longtemps dans l'exploration du stress oxydant. In vitro, sa capacité d'inhibition des réactions radicalaires menant à des dégâts oxydatifs s'avérait surtout être due à sa capacité à prévenir la réduction des ions fer par l'anion superoxyde plutôt que la dismutation de ce radical.

En effet, la SOD inhibe indirectement la réaction de Fenton entraînée par l'ion superoxyde. Cependant, la SOD n'empêche pas la réaction de Fenton entre Fe^{2+} et H_2O_2 menant à la production du radical hydroxyle HO° .

In vivo cependant, cela a peu d'importance selon les auteurs car le pool d'ions fer à l'état libre dans la cellule reste très faible [121].

Dans le cas du sang, on mesure généralement l'activité de la SOD intracellulaire et extracellulaire (moins prépondérante) simultanément sans les différencier.

Pour autant, l'interprétation des variations de son activité varie selon les auteurs. En effet, deux interprétations peuvent être données suite à une augmentation de la SOD après un effort:

- Soit l'organisme synthétise de la SOD en réponse à l'exercice physique ; lors d'effort de courte durée, cette hypothèse est improbable ;
- Soit les dommages tissulaires lors de l'effort entraînent la fuite de la SOD vers le sang au même titre que la créatine kinase par les muscles.

C'est la raison pour laquelle certains biochimistes considèrent d'ailleurs que la mesure de l'activité de la SOD ne présente pas beaucoup d'intérêt dans l'exploration du stress oxydant [121].

GPx

La glutathion peroxydase (GPx) est une des rares enzymes séléno-dépendantes antioxydantes pour laquelle une méthode de dosage a été mise au point et utilisée fréquemment dans les études. On la dose généralement dans le plasma (faible activité) et les hématies, mais aussi dans d'autres tissus comme dans les muscles striés, le myocarde ou encore le foie.

On a démontré qu'il existe une relation linéaire entre l'activité de la GPx sanguine et la teneur en sélénium dans le sang ou le plasma.

Le dosage de l'activité de la GPx plasmatique est délicat car son activité ne représente qu'1% de l'activité de la GPx érythrocytaire, majoritaire dans le sang. De plus son activité diminue très rapidement ex vivo et les prélèvements nécessitent des conditions particulières de réalisation et de transport ; pour autant, la GPx plasmatique représente la séléniémie instantanée.

Au contraire, la GPx érythrocytaire est stable 4 jours à température ambiante et permet de quantifier les apports en sélénium sur l'ensemble de la durée de vie du globule rouge.

L'étude des variations de l'activité GPx érythrocytaire doit généralement être couplée à celle de la concentration globale sanguine du glutathion réduit (GSH). En effet, l'activité de cette enzyme dépend directement de l'apport en GSH (utilisé comme donneur d'électrons) [126].

CAT

La catalase a été dosée dans la fraction des branchies et de l'hépatopancréas par la méthode spectrophotométrique. Il s'agit de mesurer la chute de l'absorbance liée à la disparition du peroxyde d'hydrogène, le substrat de l'enzyme. En effet, l'activité d'une enzyme est évaluée par la quantité de substrat transformé ou de produit formé par unité de temps et dans les conditions de fonctionnement optimales de l'enzyme. La concentration du substrat utilisée a été suffisamment élevée pour saturer tous les sites actifs des enzymes. Finalement, la loi de Beer-Lambert est appliquée pour le calcul de l'activité de la CAT.

La mesure de l'activité de la CAT n'est pas facile notamment à cause du manque de standardisation du protocole utilisé pour attester de l'activité de cette enzyme. De plus il semblerait que les propriétés de cette enzyme n'obéissent pas à la loi de Michaelis Menten. Ces difficultés se retrouvent dans les résultats controversés dans les études visant à montrer si l'activité de la CAT augmente après un exercice [10].

Paraoxonase-1 (PON-1)

La capacité du sang à hydrolyser le paraoxon est souvent utilisée comme marqueur de l'activité enzymatique de la paraoxonase-1. Des kits ELISA permettent la mesure sur le terrain de la concentration plasmatique en paraoxonase-1. L'activité de cette enzyme peut également être mesurée de manière plus sensible par fluorométrie et photométrie [122].

❖ **Dosage des antioxydants non enzymatiques**

Dosage du glutathion GSH, GSSG et la mesure du rapport GSH/GSSG

Le principe théorique de cette mesure repose sur le fait qu'en cas de stress oxydant, le taux en glutathion disulfide GSSG augmente parallèlement à la production d'ERO. Lorsque la concentration en GSSG dépasse les capacités de réduction de la glutathion réductase, du GSSG est retrouvé dans le sang. GSSG est un marqueur assez précis du processus oxydatif.

Le calcul du ratio GSH/GSSG (ou GSSG/GSH, le principe restant le même) permet de s'affranchir de l'augmentation en GSH possible lors d'un effort physique (particulièrement observé lors d'effort bref et intense) pour ne considérer que le déséquilibre entre la forme oxydée et la forme réduite : c'est la définition même du stress oxydant appliqué au niveau du glutathion.

Différentes techniques sont disponibles pour mesurer le taux en GSH et GSSG dans les prélèvements biologiques comme la colométrie et la chromatographie liquide haute performance [127].

le rapport GSH/GSSG pourrait cependant manquer de spécificité en raison d'une possibilité d'auto-oxydation du glutathion prélevé [67].

Dosage de la vitamine E

De nombreuses techniques ont été utilisées historiquement pour mesurer la vitamine E dans les prélèvements biologiques. La chromatographie liquide haute performance (CLHP) est actuellement la plus fiable et la plus utilisée pour isoler la vitamine E. Suivant les protocoles, l' α -tocophérol peut être mis en évidence seul, ou l'ensemble des tocophérols et de leurs métabolites.

La technique de chromatographie liquide haute performance dite « en phase inversée » peut notamment être utilisée sur du plasma ou du sérum [128].

Elle consiste à traiter l'échantillon avec un solvant organique comme l'éthanol qui a pour but de « libérer » la vitamine E des structures biologiques dans lesquelles elle est intégrée (membranes cellulaires notamment) et d'éliminer toutes les molécules insolubles dans le solvant organique avec lesquelles la vitamine E peut potentiellement réagir (et qui restent dans la phase aqueuse). Une phase de saponification avant extraction peut également compléter le protocole : elle a pour but de récupérer les éléments non saponifiables comme la vitamine E qui resteront dans le solvant organique lors de l'extraction alors que les éléments saponifiés comme les sels d'acides gras ou le glycérol resteront dans la phase aqueuse.

L'analyse de l'extrait brut de la vitamine E utilise alors la CLHP qui permet de séparer les différents tocophérols et métabolites, qui sont ensuite dosés par électrochimie, fluorescence, spectrométrie [129].

Dosage de la vitamine C

De la même manière que pour la vitamine E, des protocoles de mesure précis de la vitamine C ont été mis au point, utilisant notamment la CLHP et la spectrophotométrie [130].

La méthode de Schiiep a été utilisée dans certaines études. Schématiquement, cette dernière consiste à faire réagir la vitamine C présente dans le prélèvement avec de l'acide métaphosphorique (HPO_3) pour former du 2,4-dinitrophenylhydrazone de vitamine C analysée par CLHP et spectrophotométrie [131].

Une des limites du dosage repose sur le fait qu'une oxydation artéfactuelle de l'acide ascorbique peut se produire au cours du prélèvement sanguin, sous l'effet de la lumière et d'une température supérieure à 4°C. C'est pourquoi il est délicat de mesurer, de façon fiable, les concentrations plasmatiques en acide ascorbique et hydroascorbate [17].

Tableau VII : Biomarqueurs du stress oxydant ; les systèmes antioxydants

	MÉTHODE DE MESURE	SPÉCIFICITÉ DE LA PRÉDICTION DU STRESS	UTILISATION EN ROUTINE CLINIQUE
Vitamine C	Spectrophotométrie ou HPLC-UV	Excellente Excellente	Facile Facile
Vitamine E (α et γ tocopherol)	HPLC-UV Ou HPLC-Fluo	Excellente	Facile
Caroténoïdes	HPLC-UV	Excellente	Facile carotène)
Coenzyme Q10	HPLC-UV	Excellente	Facile
Glutathion réduit et oxydé	HPLC-UV HPLC+électro- phorèse capillaire Kits commerciaux	Excellente Excellente Excellente	Difficile Difficile Facile
Protéines thiols	Spectrophotométrie	Bonne	Facile
Superoxyde dismutase	Kits commerciaux	Excellente	Facile
Glutathion	Kits commerciaux	Excellente	Facile
Capacité antioxydante totale (TAS,FRAP,TRAP,	Spectrophotométrie	Mauvaise	Facile
Polyphénols	HPLC	Bonne	Potentielle
Paraoxonase	Spectrophotométrie	Bonne	Potentielle
Oligo-éléments (Sélénium, Cuivre, Zinc)	Spectrométrie d'absorption atomique	Excellente	Facile

❖ Mesure de la capacité antioxydante globale

Dans le cas d'un stress oxydatif, chaque antioxydant est affecté à des degrés divers. Il est dès lors intéressant de disposer de méthodes permettant d'évaluer de manière plus globale la capacité antioxydante globale d'un échantillon biologique. Il s'agit d'une méthode de mesure globale qui consiste à évaluer l'effet inhibiteur des antioxydants plasmatiques sur une réaction radicalaire induite in vitro.

La technique consiste à mettre en contact un système in vitro générant des ERO avec une cible (acide gras, sonde fluorescente) dont la destruction oxydative est suivie en fonction du temps par spectrophotométrie ou luminescence. Si cette réaction est réalisée en présence d'un échantillon de plasma, les antioxydants présents dans celui-ci vont interagir avec les ERO, et ce n'est qu'après leur consommation complète, que l'oxydation de la cible pourra démarrer. Le temps de latence (temps avant le démarrage de l'oxydation) sera donc directement proportionnel à la quantité d'antioxydants présents dans l'échantillon plasmatique [67].

⚡ Voltamétrie cyclique

La voltampérométrie cyclique (ou voltamétrie cyclique) est une mesure électrochimique basée sur une variation contrôlée du potentiel électrique appliqué à un échantillon. Le résultat est ce qu'on appelle un diagramme de voltampérométrie cyclique où on mesure le cycle que suit la variation du courant électrique par rapport à celle du potentiel appliqué.

Ce type de voltamétrie est utilisé pour étudier les propriétés redox de composés chimiques dans une solution et identifier un grand nombre de composés aux potentiels d'oxydation bien connus. Les diagrammes peuvent également être utilisés pour mesurer la capacité réductrice totale des agents réducteurs présents.

Très souvent, les antioxydants de faible poids moléculaire sont des agents réducteurs. la voltamétrie cyclique permet de mesurer la concentration globale en agents réducteurs et donc avoir une approximation de la concentration globale en antioxydants de faible poids moléculaire [67].

FRAP assay = ferric reducing antioxidant power assay

Le FRAP assay mesure la capacité des antioxydants plasmatiques (urate, vitamine E, vitamine C, mais pas l'albumine) à réduire Fe^{3+} en Fe^{2+} à pH faible, par un test spectrophotométrique.

Le plasma du patient est mélangé à une solution colorée (issue du mélange entre un dérivé thiocyanate et du chlorure ferrique). L'intensité de la décoloration correspondant à la réduction de Fe^{3+} est mesurée par spectrophotométrie à 505 nm ; cette intensité est proportionnelle à la capacité du plasma à réduire les ions ferriques. Les résultats sont exprimés en $\mu\text{mol/L}$ d'ions ferreux [132].

Un prétraitement de l'échantillon avec de l'ascorbate oxydase peut être réalisé pour déterminer la contribution jouée par la vitamine C dans la valeur obtenue. De par son principe, ce test présume que la capacité réductrice du plasma équivaut à sa capacité antioxydante totale, ce qui est évidemment contestable (le plasma contient des molécules comme l'albumine qui jouent un rôle antioxydant en se dégradant au contact des ERO en déchets bien éliminés par l'organisme, sans pour autant exercer un pouvoir réducteur direct) [67].

d-ROMS test

Il est également possible de doser la quantité globale des hydroperoxydes ROOH par le d-ROMS test (ROMS pour « reactive oxygen metabolites »). In vivo, les hydroperoxydes de l'organisme dosés sont issus de l'oxydation des lipides bien sûr, mais aussi des protéines et des nucléotides.

C'est une méthode de mesure du statut global oxydant ; il ne permet pas de mesurer des produits finaux mais permet d'évaluer le statut pro-oxydant en estimant la production potentielle d'ERO. Par ailleurs, c'est une technique de colorimétrie qui requiert un grand apport technique et matériel, difficilement adapté à des études de terrain [122].

Cette technique colorimétrique fait réagir des radicaux hydroperoxydes et alkoxydes produits par la réaction de Fenton (entre un métal de transition et les hydroperoxydes du prélèvement) avec un indicateur coloré, le N-diethyl-paraphénylendiamine en milieu acide à 37°C. Le milieu se colore alors en rose. Par photométrie on dose la concentration en substrat produit (proportionnelle à l'absorbance du milieu à la longueur d'onde 505 nm) et on exprime les résultats en unités Caratelli (du nom du chimiste à l'origine de la technique) ; une unité Caratelli correspond à 0.08 mg de peroxyde d'hydrogène par dL) [132].

TRAP = Total radical trapping antioxidant potential

TRAP est une technique de chimioluminescence qui de manière non spécifique détermine la capacité antioxydante d'un prélèvement en mesurant le potentiel de capture des radicaux peroxydes. Cette technique de mesure consiste à soumettre un échantillon à un flux constant de radicaux peroxydes et à mesurer le temps d'épuisement des antioxydants présents dans le milieu [67, 125].

En calibrant la mesure avec un antioxydant de concentration connue (généralement le Trolox C), une valeur de TRAP peut être obtenue et exprimée en micromoles de radicaux peroxydes « capturés » dans un litre de solution. Dans le plasma, les acteurs principaux de la valeur du TRAP sont généralement l'urate (35-65% de la valeur chez l'homme), les protéines plasmatiques (10-50%), la vitamine C (jusqu'à 24%) et la vitamine E (5-10%) [125].

Barrière antioxydante thiols : SHp test

Dans les parties précédentes, on a souligné l'importance des thiols (comme la cystéine et l'acide lipoïque), ces composés caractérisés par leurs groupements sulfhydryles (-SH) dans l'équilibre redox des milieux biologiques de l'organisme.

Le SHp Test ou mesure de la « barrière antioxydante thiols » est basé sur l'habileté des thiols à former un complexe coloré pouvant être mesuré par photométrie avec le réactif d'Ellman (acide DNTB ou acide 5,5-dithio-bis-2-nitrobenzoïque). Le titre en thiols dans le prélèvement est directement proportionnel à l'intensité de la couleur détectée [132].

OXY-absorbent test

L'OXY-absorbent test s'intéresse à l'acide hypochloreux HClO (produit par la myéloperoxydase). Ce test mesure la capacité d'un prélèvement de plasma à absorber les attaques d'une solution d'acide hypochloreux. Les kits disponibles dans le commerce utilisent un chromogène (indicateur coloré) et des mesures spectrophotométriques. La bilirubine, l'acide urique, la vitamine C, la vitamine E, l'albumine et, en général, les complexes macromoléculaires comme les glycoprotéines sont particulièrement mis en valeur dans ce test.

Chez les sujets sains, les valeurs de ce test sont supérieures à 350 $\mu\text{mol/L}$ d'acide hypochloreux HOCl, c'est-à-dire que 1mL de plasma est capable d'« absorber » 350 μmol d'acide hypochloreux HOCl [133].

B.6. Mesures des pro-oxydants

❖ Glucose

En présence de fer, le glucose s'oxyde entraînant la génération d'ERO, mais aussi la production de la forme aldéhyde du glucose, le glyoxal. Cette molécule se fixe rapidement sur les protéines dans lesquelles apparaît un résidu carboxyméthyllysine (CML) décelable par méthode HPLC. En captant facilement le cuivre, ce groupement, induit une augmentation de la production de radicaux libres et, par voie de fait, de la peroxydation lipidique [143]. Ce mécanisme pourrait expliquer pourquoi le diabète est souvent associé à des complications cardiovasculaires.

Par ailleurs, le glucose peut également se fixer sur l'hémoglobine qui se transforme en hémoglobine glyquée ou glycosylée (HbA1 c). Son dosage est aisé et proposé depuis de nombreuses années dans la pratique clinique. Le glucose se lie aussi facilement avec les groupements amines libres des protéines pour former des "produits d'Amadori" qui se dégradent en produits avancés de la glycation(AGE) dont la pentosidine est le chef de file [144, 145]. Sa concentration s'élève avec l'âge, dans le diabète, la rétinopathie, les maladies rénales en phase terminale et l'arthrite rhumatoïde.

Cette molécule reste assez difficile à doser de sorte que sa mesure ne s'est pas encore imposée dans le milieu médical. Une fois formés, les AGE plasmatiques peuvent se lier à des récepteurs présents sur les cellules endothéliales, les cellules glomérulaires et les macrophages et diminuer ainsi leur concentration plasmatique [146]. Des études récentes ont montré que le taux circulant de récepteurs des AGE (RAGE) qui est aisément mesuré à l'aide d'un kit ELISA était fortement diminué chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde en comparaison avec des sujets sains [147].

❖ Myéloperoxydase

Les neutrophiles qui subissent un processus d'activation augmentent leur consommation d'oxygène (flambée respiratoire) d'environ 400 % avec comme conséquence une production massive d'ERO dans l'organisme.

Mettre en évidence cette activation sera donc une façon indirecte de prouver la formation d'ERO. Une fois activés, les neutrophiles secrètent également dans le milieu extracellulaire diverses enzymes (dégranulation) dont la fameuse myéloperoxydase (MPO). Comme expliqué ci dessus, celle-ci est à l'origine de la formation d'oxydants chlorés très puissants comme l'acide hypochloreux ou les chloramines. La mesure de la MPO (comme témoin de la production d'ERO par les neutrophiles activés) se fait facilement dans le plasma à l'aide de kits ELISA [148].

❖ Homocystéine

Les taux plasmatiques de l'homocystéine totale ont été déterminés par une technique de dosage immunoenzymatique par polarisation de fluorescence (FPIA). Toutes les formes oxydées de l'homocystéine sont réduites par un traitement au dithiothréitol (DTT).

L'homocystéine est ensuite transformée en S-adénosylhomocystéine (SAH) par une SAH hydrolase bovine, en présence d'adénosine qui est l'autre substrat de la réaction. Un anticorps primaire monoclonal de souris anti-SAH est ajouté au mélange et le complexe SAH-anticorps anti-SAH sera détecté par un anticorps secondaire marqué à la fluorescéine. Le mélange réactionnel est aussi incubé avec la S-adénosylcystéine qui entrera en compétition avec la SAH sur les sites de liaison de l'anticorps primaire anti-SAH. L'intensité de la fluorescence est mesurée par le système FPIA [149].

❖ Statut en fer

○ Le fer libre

Le fer sérique mesuré dans les bilans sanguins classiques représente le pool de fer lié aux protéines et à d'autres agents chélateurs comme les pyrophosphates. Il ne s'agit donc pas du fameux fer libre toxique qui peut se mesurer en routine moyennant quelques contraintes techniques. En situation physiologique, le fer libre n'est pas décelable [139].

○ La ferritine

Cette protéine représente le site majeur de stockage du fer intracellulaire non métabolisé et joue en conséquence un rôle primordial en régulant la disponibilité du fer libre qui est l'agent catalyseur des réactions conduisant à la formation d'espèces oxygénées activées. Plusieurs études ont montré qu'une augmentation des taux de ferritine (notamment au niveau de la peau) constituait une réponse adaptative au stress oxydant [139].

○ La transferrine et sa capacité de saturation en fer

En situation physiologique, la transferrine est saturée entre 25 et 30% en fer. Toute augmentation par rapport à ces valeurs indiquera que du fer a été libéré sous une forme libre. A titre d'exemple, une circulation extracorporelle utilisée au cours de pontages coronariens induit une libération importante de fer suite à l'hémolyse des globules rouges. Plusieurs travaux ont montré que le coefficient de saturation en fer de la transferrine augmente progressivement au cours de la circulation extracorporelle jusqu'à atteindre des valeurs de 80 à 90%, ce qui est associé avec une augmentation des marqueurs de stress oxydant [139].

Tableau VIII : Biomarqueurs du stress oxydant ; les systèmes prooxydants

	<i>MÉTHODE DE MESURE</i>	<i>SPÉCIFICITÉ DE LA PRÉDICTION DU STRESS OXYDANT</i>	<i>UTILISATION EN ROUTINE CLINIQUE</i>
SOURCES D'OXYDATION			
Glucose, hémoglobine glycosylée	Spectrophotométrie	Excellente	Facile
Produits AGE (pentosidine)	HPLC	Bonne	Difficile
Récepteurs AGE (RAGE)	Kit ELISA	Bonne	Potentielle
Myéloperoxydase	Kit ELISA	Excellente	Facile
Homocystéine	HPLC Kits ELISA	Excellente Excellente	Facile Facile
MÉTABOLISME DU Fer	Spectrophotométrie	Excellente	Facile
MÉTABOLISME DU NO	spectrophotométrie, RPE, microarray	Bonne	Potentielle
EXPRESSION DE GÈNES ANTIOXYDANS	Microarray	Moyenne	Difficile

B.7. Autres moyens de mesure du stress oxydant

L'air expiré est composé d'une phase gazeuse qui contient du dioxygène, du monoxyde d'azote NO°, du diazote, du dioxyde de carbone et un petit peu de monoxyde de carbone, plus une phase contenant de la vapeur d'eau et des particules aérosols qui peuvent être analysées après liquéfaction de la vapeur. Ainsi on a pu identifier des F2-isoprostanes, des protéines modifiées par HNE, du malondialdéhyde, des protéines nitratées ainsi que du peroxyde d'hydrogène dans cette dernière phase. Leurs taux peuvent ainsi être mesurés et corrélés ou non avec un phénomène biologique d'intérêt et plus spécifiquement d'origine pulmonaire pour refléter un stress oxydant ou un phénomène inflammatoire ; à ce jour ces corrélations sont encore faites avec la plus grande prudence [122].

❖ Dosage du NO° expiré et dans les tissus biologiques

Le dosage du NO° dans l'air exhalé est souvent réalisé en même temps que les marqueurs du stress oxydant dans les études ciblant les affections de la sphère pulmonaire. Cependant, même s'il est lui même un radical libre, on ne le considère pas comme un marqueur du stress oxydant mais simplement de l'inflammation dans la mesure où ce sont les cytokines pro-inflammatoires qui activent la iNOS sont en majorité responsables de sa production. Sa mesure reste intéressante car on sait que le NO° peut activer l'hème oxygénase-1 (HO-1) et concourt donc à la production de CO (lors de la conversion de l'hème en biliverdine par HO-1) ; des hauts niveaux de CO inactivent également iNOS.

Le flux expiratoire, la fermeture du palais mou et l'espace mort sont autant de facteurs qui peuvent également influencer les niveaux en NO. Des dispositifs sont mis en place pour dissocier l'air des cavités nasales et de l'espace mort pulmonaire. Le dosage du monoxyde d'azote est ensuite généralement effectué par chimioluminescence [124].

La réaction très rapide du monoxyde d'azote avec des métalloprotéines (comme l'hémoglobine ou la guanylate cyclase), le radical superoxyde mais aussi les groupements thiols (comme sur la cystéine), sa faible solubilité et son peu de stabilité à de petites concentrations rendent sa mesure dans les tissus et fluides biologiques difficile [124].

❖ Dosage du monoxyde de carbone CO expiré

Le monoxyde de carbone CO est surtout produit par HO-1 lors du métabolisme de l'hémoglobine et de la myoglobine en bilirubine. Dans les poumons, l'hème oxygénase-1 est situé dans l'endothélium vasculaire pulmonaire et les macrophages alvéolaires, faisant du CO un marqueur double du stress oxydant et de l'inflammation pulmonaire (d'autant plus que la HO-1 est activée à la fois par les radicaux libres, comme NO°) mais aussi par les cytokines proinflammatoires).

Ainsi, la mesure du CO pour caractériser le stress oxydant reste intéressante mais n'est pas spécifique.

Dans la plupart des études, le CO est mesuré grâce à des méthodes électrochimiques. Les capteurs utilisés aujourd'hui sont sélectifs et procurent des résultats reproductibles. Le CO peut aussi être mesuré par spectrophotométrie laser et analyseurs infrarouges. La chromatographie sur colonne de gaz est la méthode de référence.

Chez l'homme, les mesures de monoxyde de carbone peuvent être influencées par la fumée de cigarette et si l'individu est un fumeur ou pas. [122].

❖ Autres facteurs exhalés pouvant être mesurés

De nombreux autres composés expirés peuvent également être mesurés comme le peroxyde d'hydrogène, d'autres produits de la peroxydation lipidique tels que le 8-isoprostane, 3-nitrotyrosine et les nitrosothiols.

Malheureusement, les protocoles et les valeurs normales sont encore trop faiblement standardisés, les sites anatomo-histologiques des molécules étudiées ne peut pas être connue et la contamination par l'environnement peut être grande. Enfin, l'utilité clinique de leur mesure doit encore être confirmée [122,134].

❖ Détection des anticorps dirigés contre les produits de dégradation

La présence de produits issus de la dégradation des protéines et des lipoprotéines par les radicaux libres mène en partie à la formation d'anticorps. Ce phénomène est particulièrement connu pour la peroxydation lipidique où des produits comme le 4-HNE se lient et modifient les protéines ; les laboratoires possèdent un répertoire d'anticorps connus et étudiés ensuite par ELISA, immunohistochimie et par immunotransfert [70].

Tableau IX : Condition propices à la surproduction d'ERO

CONDITIONS PATHOLOGIQUES	MARQUEUR BIOCHIMIQUE AU TAUX AUGMENTÉ
Diabète, rétinopathie, néphropathie, polyarthrite rhumatoïde	Glyoxal, carboxyméthyllisine, hémoglobine glyquée, "AGE"
Infection (dégranulation des neutrophiles), angine de poitrine	Myéloperoxydase
Carence en vitamine B6 ou acide folique, maladie cardiovasculaire	homocystéine
Surcharge génétique en fer	Fer total
Maladies cardiovasculaires	Peroxydes lipidiques, LDL oxydées, anticorps contre LDL oxydées, taille LDL, paraoxonase, vitamines C et E
Prise de pilule contraceptive	Péroxydes lipidiques, cuivre, zinc, β -carotène

III. DEFIS DE L'EXPLORATION DU STRESS OXYDANT

La mise en évidence directe des radicaux libres étant difficile, de nombreuses méthodes indirectes ont été proposées et basées sur la mesure de produits stables dérivant des effets des ERO et ERN (« marqueurs du stress oxydant »), d'antioxydants, ou encore de l'activité des enzymes protectrices.

Comme nous avons pu constater, tous les protocoles ont malheureusement leurs limites et ne sont pas tous spécifiques du stress oxydant ni même d'un ERO ou ERN en particulier.

De plus, ces marqueurs ne sont pas forcément spécifiques du tissu dans lequel ils sont issus, ce qui veut dire que si c'est l'articulation qui nous intéresse, on pourra réaliser des prélèvements de liquide synovial, sans oublier que des marqueurs relatifs peuvent aussi se retrouver dans l'urine ou le sang.

À cause du manque de spécificité et de sensibilité des marqueurs, on considère actuellement qu'on ne peut pas se fier à l'utilisation d'un seul marqueur pour définir le stress oxydant ; les études utilisent en généralement plusieurs au sein d'une même expérimentation.

Le statut antioxydant d'un individu comporte un grand nombre de facteurs de variation. Il n'y a souvent pas de normes, et des études longitudinales (suivi d'une population dans le temps) sont souvent requises pour s'affranchir de cette variabilité individuelle.

Enfin, les modèles de genèse d'ERO in vitro, sont souvent trop loin de la complexité biologique. Par exemple, la capacité d'un prélèvement biologiques isolé à inhiber des radicaux libres tels que $O_2^{\circ -}$ in vitro n'est pas forcément la même in vivo (variation de la capacité antioxydante) [76].

IV. ROLE DU PHARMACIEN DANS LE STRESS OXYDANT

1. Intérêt de la mesure du stress oxydant

Sur le plan préventif, les professionnels de santé prennent de plus en plus conscience du rôle primordial de la nutrition au sein de laquelle les antioxydants tiennent une place de choix. L'engouement actuel pour les antioxydants naturels et synthétiques ne doit pas nous faire oublier que beaucoup de recherches seront encore nécessaires pour comprendre leurs mécanismes d'action ainsi que leurs effets réels en termes de protection des fonctions vitales de l'organisme.

Des analyses sanguines du stress oxydant devraient permettre aux médecins de répondre, en pratique à plusieurs questions :

Mon patient présente-t-il réellement des déficits en antioxydants ou oligo-éléments (par rapport à des normes de référence ou usuelles établies selon les meilleurs critères scientifiques et de qualité et en accord avec les données de la littérature) ?

Toutes les études montrent que plus le statut en antioxydants d'un individu est bas, plus il présente un risque de développer des maladies cardiovasculaires et des cancers. En revanche, rien ne permet d'affirmer qu'un sujet ayant un statut en antioxydants dans les normes soit mieux protégé en prenant des compléments en antioxydants. Ainsi, en-dessous d'une valeur plasmatique de départ en sélénium de 106 µg/L, une complémentation journalière en cet oligo-élément à raison de 200 µg par jour s'avère efficace après 8 ans pour la prévention de l'apparition du cancer de la prostate chez l'homme [145].

• Sensibilisation de la population

Une alimentation riche en fruits et légumes (au moins 5 par jour) doit d'abord et avant tout être privilégiée. Quinze jours d'un régime enrichi en fruits et légumes permettent d'augmenter le taux plasmatique en vitamine C de 50 % et celui en β- carotène de 30 %.

La complémentation éventuelle en antioxydants et en oligo-éléments ne conduitelle pas à des valeurs sanguines dépassant les normes de référence ou usuelles ?

En effet il ne faut pas oublier et ceci est souvent ignoré du monde des praticiens que les ERO ont un rôle physiologique important à jouer (régulation de l'apoptose, défense immunitaire).

Par conséquent, des antioxydants pris de façon irraisonnée (à des mégadoses et sur plusieurs années) peuvent potentiellement inhiber des défenses primordiales pour l'organisme et même augmenter la mortalité.

L'exemple suivant montre comment la régulation du stress oxydant est un phénomène particulièrement complexe et qu'il est donc nécessaire d'avoir des analyses sanguines pour ne pas travailler à l'aveugle en matière de complémentation en antioxydants.

Une étude d'un très grand intérêt pratique montrant comment la prise d'un complément en vitamine E permet de réguler la concentration en isoprostanes plasmatiques. Cette étude montre que des doses journalières de vitamine E (sous forme d' α -tocophérol) comprises entre 0 et 134 mg n'entraînent aucune modification de la concentration en isoprostanes après 16 semaines de traitement.

Avec 298 mg par jour, une diminution non significative de 20 % est observée. Ce n'est que pour des mégadoses en vitamine E comprises entre 600 et 2388 mg que des diminutions significatives (30 - 60 %) sont mises en évidence. Néanmoins, une autre étude a démontré que ces doses en vitamine E (sous forme d' α -tocophérol) qui dépassent donc très largement l'apport journalier recommandé en vitamine E (10 mg) entraînent en seulement 1 semaine une diminution de 50% de son isomère γ -tocophérol [150].

Tableau X : Valeurs de référence des marqueurs sanguins du stress oxydant

MARQUEURS	MODE D'ACTION ET INTERET DU DOSAGE	VALEURS DE REFERENCE
ANTIOXYDANTS		
Vitamine C	piégeur de radicaux libres, marqueur de la consommation de fruits valeur plasmatique basse associée avec l'apparition de diverses pathologies	H : 8,6 à 18,83 µg/ml F : 6,21 à 15,18 µg/ml
α-tocophérol	inhibiteur de la peroxydation lipidique action de synergie avec la vitamine C (rapport idéal de concentration)	8 à 15 mg/L
γ-tocophérol	valeur plasmatique basse plus prédictive que l'α-tocophérol dans la survenue de pathologies cardiovasculaires et de cancer de la prostate	0,28 à 2,42 mg/L
Vitamine A	piégeur de radicaux libres - implication dans la vision	1200 à 3700 UI/L
β-carotène	marqueur de la consommation de légumes piégeur de l'oxygène singulet (→ photoprotecteur) inhibition à forte concentration de mécanismes physiologiques de défense	0,05 à 0,68 mg/L
Glutathion réduit Glutathion oxydé Rapport GSH/GSSG	marqueur de la présence d'un stress oxydant action de synergie avec la vitamine C et l'α-tocophérol	717 à 1110 µmol/L 1,17 à 5,32 µmol/L 156 à 705
Capacité antioxydante totale (test ORAC)	test global de screening (ne peut être interprété seul)	11 000 – 16 000 µM Equiv Trolox (plasma non déprotéinisé)
Ubiquinone	inhibiteur de la peroxydation lipidique implication dans la chaîne respiratoire mitochondriale	0,3 à 1,39 mg/L
Acide urique	antioxydant possédant la plus forte réactivité avec les radicaux libres - reflet de la présence de phénomènes d'ischémie - reperfusion	H ≤ 70 mg/L F ≤ 60 mg/L
Vitamines B6, B9 et B12	régulatrices de la concentration plasmatique en homocystéine implication dans la synthèse de l'ubiquinone	B9 : 2,2 à 17,5 ng/ml B12 > 200 pg/ml
Superoxydes dismutase (SOD)	élimination de l'anion superoxyde	785 à 1570 UI/g Hb
Glutathion peroxydase(GPx)	élimination du peroxyde d'hydrogène et des peroxydes lipidiques reflet d'une adaptation au stress oxydant facteur de risque cardiovasculaire	H : 20-56 UI/ g Hb F : 26-58 UI/ g Hb
OLIGOELEMENTS		
Selenium	cofacteur des différentes GPx - rôle dans l'immunité	94-130 µg/L
Cuivre	cofacteur de la SOD facteur prooxydant à forte concentration	H : 0,7 – 1,40mg/L F : 0,8 - 1,55 mg/L

Zinc	cofacteur de la SOD inhibe les réactions d'oxydation induites par le cuivre rôle dans l'immunité	0,7-1,20 mg/L
Rapport Cu/Zn	marqueur de la présence d'un stress oxydant corrélation positive avec le taux plasmatique de peroxydes lipidiques	1 - 1,17
MARQUEURS D'OXYDATION		
Peroxydes lipidiques	marqueur des dommages oxydatifs au niveau des lipides implication dans le développement de l'athérosclérose	10-400 µmol/L
LDL oxydées	facteur de risque cardiovasculaire (LDL petites et denses plus susceptibles à l'oxydation)	0 – 500 ng/ml
Anticorps contre les LDL oxydées	réponse de l'organisme à la production de LDL oxydées facteur de risque cardiovasculaire	200-600 UI/L
Isoprostanes	marqueur spécifique de la peroxydation lipidique	en développement
8hydroxydéoxyguanosine	marqueur d'oxydation de l'ADN facteur de risque de développement de cancer	0-16 µg/L 0-20 µg / g créatinines
Protéasome	système de régulation des protéines oxydées sensible à la production des radicaux libres	
Advanced glycated endproducts (AGE) (pentosidine) et récepteurs des AGE	marqueur de la glycolysation des protéines dans le diabète, l'athérosclérose, les maladies rénales et l'arthrite rhumatoïde	
SOURCES D'OXYDATION		
Fer libre	fer toxique conduisant à une augmentation accrue de radicaux libres	0
Fer sérique	surcharge en fer	H 8-33 µmol/L F 6-31 µmol/L
Ferritine		H 30-400 ng/ml F 15-150 ng/ml
Coefficient de saturation en fer de la transferrine		H 0,2-0,4 F 0,2-0,5
Homocystéine	facteur de risque cardiovasculaire indépendant du cholestérol - contribue à l'oxydation des LDL	< 60 ans : 5-15 µmol/L > 60 ans : 5-20 µmol/L
Myéloperoxydase	marqueur de l'inflammation (source de production de radicaux libres) - facteur de risque cardiovasculaire	10 à 75 ng/ml
Glucose	amplifie la peroxydation lipidique implication dans la glycation des protéines	0,6-1,1 g/L



Conclusion



Le stress oxydant cellulaire se caractérise par la production excessive d'espèces oxydantes dérivées de l'oxygène, dont certaines sont très réactives.

De nombreux marqueurs biologiques du stress oxydant ont été décrits. Cependant, le stress oxydant est un phénomène dont la mise en évidence en pathologie humaine est limitée par l'absence de marqueur à la fois sensible, spécifique, de dosage aisé, répétable et non invasif. Les scientifiques se sont intéressés, dès le début des recherches sur le stress oxydant, à la découverte d'un marqueur biologique qui identifierait à coup sûr la présence d'un stress oxydant dans diverses situations expérimentales ou cliniques. Toutes les méthodes proposées, quelles qu'elles soient, présentent toujours leurs propres spécificités et limites, montrant qu'il serait utopique de croire en l'existence d'un marqueur idéal et unique de stress oxydant.

En raison de la demi-vie très courte des radicaux libres, il est très difficile de déterminer directement leur existence et d'en conclure un lien de cause à effet avec une pathologie. Ainsi, le stress oxydant est habituellement estimé par des méthodes indirectes.

Une connaissance approfondie de la littérature scientifique s'avère donc nécessaire pour garder un esprit critique sur tous ces moyens d'investigation. Evaluer correctement un statut de stress oxydant ne pourra donc se réaliser que sur base d'une combinaison de tests qui se compléteront. Dans tous les cas, une attention toute particulière devra être accordée aux conditions de prélèvement et de traitement des échantillons sanguins, car la plupart des molécules testées sont en réalité peu stables. A ce titre, il conviendra de centrifuger les échantillons sanguins immédiatement après le prélèvement, mais également maintenir la chaîne du froid pour les plasmas ou les autres types d'échantillons jusqu'à l'analyse. Ces deux conditions pré-analytiques, bien que contraignantes, sont les principales garanties de résultats de qualité [3,4].



Résumés



RESUME

Titre : Biomarqueurs du stress oxydant

Auteur : Zineb BOUBALI

Mots clés : Stress oxydant, Biomarqueur, altération biochimique, défense antioxydante, espèce oxydant réactive, exploration clinique.

Le stress oxydant cellulaire se caractérise par la production excessive d'espèces oxydantes dérivées de l'oxygène, dont certaines sont très réactives. Il résulte d'un déséquilibre entre des systèmes producteurs d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et des systèmes anti-oxydants, enzymatiques (superoxyde dismutases [SOD], glutathion peroxydases [GPx]) ou non (glutathion, vitamines, etc.). La difficulté de son étude réside dans la courte durée de vie des espèces en jeu et dans le fait qu'elles peuvent tout autant assurer des rôles physiologiques au sein de la cellule que se révéler nocives par oxydation des différents composants cellulaires.

Les ERO réagissent avec toute une série de substrats biologiques : les protéines, les lipides, l'ADN et les sucres en engendrant des altérations fonctionnelles. Plusieurs méthodes d'exploration sont décrites par la littérature. Par ailleurs, les limites et la difficulté de l'exploration expérimentale du stress oxydant doit également être pris en compte afin de faire le point sur son lien éventuel avec la physiopathologie concernée.

Il est impossible de dire quel est le meilleur marqueur du stress oxydant. Pour cette raison, les laboratoires d'analyse spécialisés proposent divers bilans du stress oxydatif, comprenant une série de dosages.

Certains prélèvements ne doivent pas être dégradés par l'oxygène de l'air. D'autres doivent suivre une chaîne du froid d'où le rôle du professionnel de santé surtout le pharmacien biologiste d'affiner les analyses pour orienter les décisions cliniques. Ainsi que le pharmacien d'officine qui doit sensibiliser et conseiller ses patients en cas de supplémentation par les antioxydants.

ABSTRACT

Title: Biomarkers of oxidative stress

Author: Zineb BOUBALI

Key words: Oxidative stress, Biomarker, biochemical alteration, antioxidant defense, reactive oxidizing species, clinical investigation.

Cellular oxidative stress is characterized by the excessive production of oxidative species derived from oxygen, some of which are highly reactive. It results from an imbalance between systems producing reactive oxygen species (ERO) and antioxidant systems, enzymatic (superoxide dismutases [SOD], glutathione peroxidases [GPx]) or not (glutathione, vitamins). The difficulty of its study lies in the short lifetime of the species involved and in the fact that they can equally ensure physiological roles within the cell and they prove to be harmful by oxidation of the various cellular components.

EROs reacts with a variety of biological substrates: proteins, lipids, DNA and sugars, causing functional changes. Several methods of exploration are reported in the literature. Moreover, the limitations and the difficulty of the experimental exploration of oxidative stress must also be taken into account in order to take stock of its possible link with the pathophysiology concerned.

It's hard to define the best marker of oxidative stress. For this reason, specialized analytical laboratories offer various assessments of oxidative stress, including a series of assays.

Some samples should not be degraded by oxygen from the air. Others must follow a cold chain hence the role of the health professional especially the pharmacist biologist to refine the analyzes to guide clinical decisions. As well as the dispensary pharmacist who must educate and advise his patients in case of supplementation by antioxidants.

ملخص

عنوان الأطروحة: المؤشرات الحيوية للأكسدة

المؤلف: زينب بوبالي

الكلمات الرئيسية: الأكسدة، العلامات البيولوجية، تغيير الكيمياء الحيوية، مضادة للأكسدة، الأنواع العامل المؤكسد الاستكشاف السريري

تتميز الأكسدة الخلوية عن الإنتاج المفرط للأنواع المؤكسدة المشتقة من الأكسجين، البعض منها شديدة التفاعل. ذلك ناتج

عن عدم التوازن بين الأنظمة المنتجة لأنواع الأكسجين التفاعلية والأنظمة الأنزيمية والغير الأنزيمية المضادة للأكسدة.

تكمن صعوبة دراسة الأكسدة الخلوية في العمر القصير لأنواع الأكسجين التفاعلية، وحقيقة إنها تلعب الكثير من الأدوار الفسيولوجية داخل الخلية وللتى تكون الضارة بسبب الأكسدة لمختلف المكونات الخلوية.

أنواع الأكسجين التفاعلية تتفاعل مع مجموعة متنوعة من الركائز العضوية منها البروتينات، الدهون، الحمض النووي والسكريات عن طريق توليد التعديلات الوظيفية. وصفت عدة طرق التنقيب عن العلامات البيولوجية للأكسدة في الأدب. وعلاوة على ذلك، ينبغي أيضا النظر في القيود وصعوبة التنقيب التجريبي من الأكسدة من أجل الوقوف على الصلة المحتملة مع الفيزيولوجيا المرضية المعنية والعلامات البيولوجية للأكسدة.

من المستحيل القول ما هو أفضل علامة بيولوجية للأكسدة. لهذا السبب، المختبرات المتخصصة تقدم تقييمات مختلفة للأكسدة، بما في ذلك سلسلة من المقاييسات.

يجب ألا تتدهور بعض العينات بواسطة الأكسجين. يجب أن يتبع البعض منها سلسلة التبريد حيث يظهر دور مهمي الصحة و خصوصا الصيدلي الإحيائي الذي يضمن صيرورة التجارب لتوجيه القرارات السريرية. وكذلك الصيدلي الذي يجب عليه تثقيف المرضى ونصحهم في تناول مضادات الأكسدة.



Références



- [1] **Cadenas, E., Davies, JA.** Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Free Radic Biol Med.* 2007; 29 (3-4): 222-230.
- [2] **Favier A.** Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique.* 2011 ; 65 (4) 108-115.
- [3] **Favier A.** Le stress oxydant: intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. *Ann Biol Clin.* 2009 ; 54(1) : 9-16.
- [4] **J Pincemail, M Meurisse, R Limet et JO Defraigne.** Méthodes d'évaluation du stress oxydatif chez l'homme: importance en matière de prévention. *Medi sphère.* 2013 ; 87 (12) :1-4.
- [5] **J.-L. Beaudeau, J. Peynet, D. Bonnefont-Rousselot, P. Therond, J. Delattre, A. Legrand.** Sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote Implication dans la transcription et la régulation des gènes. *Ann Pharm Fr.* 2006 ; 64(24) :373-81.
- [6] **Monique Gardès-Albert, Dominique Bonnefont-Rousselot, Zohreh Abedinzadeh et Daniel Jore.** Espèces réactives de l'oxygène Comment l'oxygène peut-il devenir toxique. *L'actualité Chimique.* 2010 ; 16 (3) :91-96.
- [7] **Valéry Afonso, Romuald Champy, Dragoslav Mitrovic, Pascal Collin, Abderrahim Lomri.** Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du Rhumatisme.* 2014 ; 74(5) :636–643.
- [8] **Éric Fontaine.** Radicaux libres et vieillissement. *Cah Nutr Diét.* 2007; 42(2):100-15.
- [9] **Mandelker, L.** Introduction to oxidative and mitochondrial dysfunction. *Vet Clin: Small Anim Practice.* f. r. Oxidative stress: the role of mitochondria, and antioxidants, Elsevier Inc. 2008; 38(15): 1- 30.
- [10] **Powers, S. and M. Jackson.** Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev.* 2008; 88(3): 1243-76.

- [11] **McMichael, M.** Oxidative stress, antioxidants, and assessment of oxidative stress in dogs and cats. *JAVMA* .2007; 231(5): 714-20.
- [12] **Halliwell, B. and J. M. Gutteridge.**Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford University press. 2007; 345(12):43-52.
- [13] **Halliwell, B. and J. M. Gutteridge.**The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys*. 2014; 280 :1-8.
- [14] **Grandjean, D.** Le stress oxydatif cellulaire chez le chien: conséquences et prévention nutritionnelle. *Bull Acad Vet de France*. 2013; 154(8) :49-61.
- [15] **Tessier, F. and P. Marconnet.** Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice. *Science & Sports*. 2015; 10(16): 1-13.
- [16] **Moller, P., H. Wallin, et al.** Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. *Chemico-Biological Interactions*.2012; 102 (4):17-36.
- [17] **Deaton, C. M. and D. J. Marlin.** Exercice-associated oxidative stress.Clinical Techniques in Equine Praticice. 2011; 2(3): 278-91.
- [18] **Urso, M. L. and P. M. Clarkson.** Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation.*Toxicology*. 2016; 189(6): 41-54.
- [19] **Souza, H.P., Laurindo, F.R, Ziegelstein, R.C, Berlowitz, C.O Zweier, J.L**Vascular NAD(P)H oxidase is distinct from the phagocytic enzyme and modulates vascular reactivity control. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010; 280 (9): 658-67.
- [20] **Babior, B.M.** NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol*.2014; 16 (5): 42-47.
- [21] **Babior, B.M.**The activity of leukocyte NADPH oxidase: regulation by p47PHOX cysteine and serine residues. *Antioxid Redox Signal*. 2012; 4 (3):35-38.
- [22] **Bergendi, L., Benes, L, Duracková, Z Ferencik, M.** Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci*.2015; 65(23): 1865-74.

- [23] **Robert Barouki.** Stress oxydant et vieillissement. Méd/Sciences. 2008 ; 22(37) : 266-72.
- [24] **Grandjean, D.**Conséquences biologiques et nutritionnelles du travail en haute altitude chez le chien de recherche. Rec Méd Vét. 2015 ; 172(112): 601-21.
- [25] **Jenkins, R. R.** Exercise and oxidative stress methodology: acritique. Am J Clin Nutr. 2012; 72(4): 670-674.
- [26] **Sachdev, S. and K. J. A. Davies.**Production, detection, and adaptative responses to free radicals in exercise.Free Radical Biology and Medicine.2008; 44(20): 215-23.
- [27] **Sacheck, J. M. and J. B. Blumberg.** Role of Vitamin E and Oxidative Stress in Exercice.Nutrition. 2011; 17(10): 809-14.
- [28] **Brigelius-Flohé, R.** Commentary: oxidative stress reconsidered. Genes Nutr.2013; 54(3): 161-163.
- [29] **Kayatekin, B. M., S. Gonenc, et al.** Effects of sprint exercise on oxidative stress in skeletal muscle and liver. Eur J Appl Physiol. 2014; 87(2): 141-4.
- [30] **Groussard, C., F. Rannou-Bekono, et al.**Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. Eur J Appl Physiol.2016; 89(1): 14-20.
- [31] **McAnulty, S. R., L. McAnulty, et al.** Hyperthermia increases exercise-induced oxidative stress. Int J Sports Med. 2015; 26(3): 188-92.
- [32] **Youngman, L. D.**Protein restriction (PR) and caloric restriction (CR) compared: effects on DNA damage, carcinogenesis, and oxidative damage. Mutation Research/DNAging. 2013; 295(46): 165-179.
- [33] **Walters, J. M., T. B. Hackett, et al.** Polyunsaturated Fatty Acid dietary supplementation induces lipid peroxidation in normal dogs. Vet Med Int. 2012; 56(14): 1-4.

- [34] **Ristow, M. and S. Schmeisser.** Extending life span by increasing oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine.* 2011; 51(2): 327-36.
- [35] **Cristina-Gabriela GRIGORAŞ.** Valorisation des fruits et des sous-produits de l'industrie de transformation des fruits par extraction des composés bioactifs [Thèse]. *Chimie : Génie de l'Environnement : Paris ;* 2012.
- [36] **Dosek, A., H. Ohno, et al.** High altitude and oxidative stress. *Respiratory Physiology & Neurobiology.* 2007; 158(23): 128-131.
- [37] **Martarelli, D., M. Cocchioni, et al.** Cold exposure increases exercise-induced oxidative stress. *J Sports Med Phys Fitness.* 2011; 51(2): 299-304.
- [38] **Baeuerle P A, Rupec R A, Pahl H L.** Reactive oxygen intermediates as second messengers of a general pathogen response. *Pathologie Biologie.* 2015; 44(25): 29-35.
- [39] **Valko M, Rhodes C J, Moncol J, et al.** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions.* 2006; 160 (48): 1-40.
- [40] **Trachootham D, Alexandre J, Huang P.** Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov.* 2009; 18(2): 579-91.
- [41] **Wolyniec K H, Sue; Haupt, Ygal.** P53 and Cell Death. In: *Encyclopedia of Life Science.* John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. 2009; 94 (16): 92-5.
- [42] **Wang J, Yi J.** Cancer cell killing via ROS. To increase or decrease, that is the question. *Cancer Biology & therapy.* 2008; 7(12): 1875-84.
- [43] **Ozben T.** Oxidative Stress an Apoptosis: Impact on Cancer therapy. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2007; 96 (34): 2181-96.
- [44] **Cairns R A, Harris I S, Mak T W.** Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer.* 2012; 11(8): 85-95.

- [45] **Valko M, Rhodes C J, Moncol J, et al.** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 2016; 160 (87): 1-40.
- [46] **Halliwell, B., Gutteridge, JMC.** Role of free radicals and catalytic metals ions in human disease: an overview. In *Methods in Enzymology*. Academic Press, San Diego. 2014; 186 (45): 1-85.
- [47] **Joël Pincemail, Karine Bonjean, Karine Cayeux, Jean-Olivier Defraigne.** Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition clinique et métabolisme*. 2012; 16(6): 233–239.
- [48] **Zelko, IN., Marian, TJ. Folz, RJ.** Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Rad Biol Med*. 2013; 33 (3): 337-349.
- [49] **Bonnefont-Rousselot, D., Thérond, P., Delattre, J, In Delattre J, Durand G, Jardillier JC.** Radicaux libres et anti-oxydants. *Biochimie pathologique: aspects moléculaires et cellulaires*. Médecine-sciences Flammarion Paris. 2015 ;45(28): 59-81.
- [50] **Thérond, P., Denis, B, In Delattre J, Beaudoux, JL, Bonnefont-Rousselot, D.** Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques : Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales, Paris. 2016; 87(16): 114-67.
- [51] **Ganther, HE.** Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis*. 2014; 20(19): 1657- 66.
- [52] **Dominique BONNEFONT-ROUSSELOT.** Stress oxydant et vieillissement. *Sepectra biologie*. 2007 ; 157(36) :23-26.
- [53] **Arner, E. S. and A. Holmgren.** Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem*. 2010; 267(59): 6102–09.

- [54] **Berndt, C., C. H. Lillig, et al.** Thiol-based mechanisms of the thioredoxin and glutaredoxin systems: implications for diseases in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2016; 292(74): 1227-36.
- [55] **Rhee, S. G., H. Z. Chae, et al.** Peroxiredoxins: A historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling." *Free Radical Biology and Medicine.*2015; 38(12): 1543-52.
- [56] **Goswami, B., D. Tayal, et al.** Paraoxonase: a multifaceted biomolecule. *Clinica Chimica Acta.*2009; 410 (4): 1-12.
- [57] **Motta, S., C. Letellier, et al.** Protecting effect of vitamin E supplementation on submaximal exercise-induced oxidative stress in sedentary dogs, assessed by erythrocyte membrane fluidity and paraoxonase-1 activity." *The Veterinary Journal* .2009; 181(46): 288-95.
- [58] **Aviram, M., M. Rosenblat, et al.**Human serum Paraoxonase (PON-1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine.* 2012; 36(8): 892-904.
- [59] **Krinsky, N. I.** Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radical Biology and Medicine.* 2014; 7(6): 617-635.
- [60] **Ernster, L. and P. Forsmark-Andree.** Ubiquinol: an endogenous antioxidant in aerobic organisms. *Clin Investig.* 2012; 71(29): 60-65.
- [61] **Rozenberg, O. and M. Aviram.**S-Glutathionylation regulates HDL-associated paraoxonase 1 (PON1) activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2010; 351(2): 492-498.
- [62] **Lawler, J. M. and S. R. Demaree.** Relationship between NADP-specific isocitrate dehydrogenase and glutathione peroxidase in aging rat skeletal muscle.*Mechanisms of Ageing and Development.* 2011; 122(3): 291-304.

- [63] **Liu, Y., J. Liu, et al.** Biliverdin reductase, a major physiologic cytoprotectant, suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *Free Radical Biology and Medicine*. 2016; 40(6): 960- 67.
- [64] **Packer, L., E. H. Witt, et al.** Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014; 19(2): 227-250.
- [65] **Frankel, E. N., J. B. German, et al.** Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *The Lancet*. 2013; 341(43): 454-457.
- [66] **Sun, A. Y., A. Simonyi, et al.** The French paradox and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. *Free Radical Biology and Medicine*. 2012; 32(4): 314-318.
- [67] **Halliwell B., J. M. C. Gutteridge.** *Free Radicals in Biology and Medicine*. Fourth Edition. Oxford University Press. 2008; 87(9): 45-52.
- [68] **Venkataraman S., Schafer F. Q., Buettner G. R.** Detection of lipid radicals using EPR. *Antioxidants and Redox Signaling*. 2014; 6(3): 631–638.
- [69] **Wilcox A.L., Marnett L.J.** Polyunsaturated fatty acid alkoxyl radicals exist as carbon-centered epoxyallylic radicals: a key step in hydroperoxide-amplified lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol*. 2015; 6(4): 413–416.
- [70] **Jairam V., Uchida K., Narayanaswami V.** Pathophysiology of lipoprotein oxidation. In *Lipoproteins - Role in Health and Diseases*. Biochemistry, Genetics and Molecular Biology. 2012; 16(5): 43–6
- [71] **Wagner B.A., Buettner G.R., Burns C.P.** Free radical mediated peroxidation in cells: Oxidizability is a function of cell lipid bis-allylic hydrogen content. *Biochemistry*. 2014; 33(15): 4449– 53.
- [72] **Henrotin Y.** The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2013; 11(10): 747–755.
- [73] **Stadtman, E. R.** Role of oxidant species in aging. *Curr. Med. Chem*. 2014; 11(9): 1105–12.

- [74] **Raman, Arjun V., and Marla J. Berry.** Selenoproteins in cellular redox regulation and signaling. *Oxidative Stress in Vertebrates and Invertebrates: Molecular Aspects of Cell Signaling.* 2011; 43(17): 195-208.
- [75] **Reznick A. and Packer L.** Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric Method for Carbonyl Assay. *Methods in Enzymology.* 2016; 233(83): 357–363.
- [76] **Alcaraz M. J., Gualillo O., Sánchez-Pernaute O.** Studies on Arthritis and Joint Disorders. Springer New York. 2013; 65(17):89-95.
- [77] **Andrades M.E., Lorenzi R.** Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases. *Oxidative Stress in Vertebrates and Invertebrates: Molecul Aspects of Cell Signaling.* Med ans Sci. 2011; 45(7): 153 - 166.
- [78] **Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M., Telser J.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2007; 39(1): 44–84.
- [79] **Olszowski S., Mak P., Olszowska E., Marcinkiewicz J.** Collagen type II modification by hypochlorite. *Acta Biochim Pol.* 2013; 50(2): 471-479.
- [80] **Stevnsner, T., Thorslund, T., de Souza-Pinto, N. C., and Bohr, V. A.** Mitochondrial repair of 8-oxoguanine and changes with aging. *Experimental gerontology.* 2012; 37(6): 1189-96.
- [81] **Hayakawa, M., Ogawa, T., Sugiyama, S., Tanaka, M., and Ozawa, T.** Massive conversion of guanosine to 8-hydroxy-guanosine in mouse liver mitochondrial DNA by administration of azidothymidine. *Biochemical and biophysical research communications.* 2011; 176(45): 87-93.
- [82] **Cadet, J., Berger, M., Douki, T., and Ravanat, J. L.** Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology.* 2010; 131(76): 1-87.

- [83] Tremblay, S., Douki, T., Cadet, J., and Wagner, J. R. 2'-Deoxycytidine glycols, a missing link in the free radical-mediated oxidation of DNA. *The Journal of biological chemistry*. 2009; 274(56): 20833-8.
- [84] Cadet, J., Douki, T., Pouget, J. P., Ravanat, J. L., and Sauvaigo, S. Effects of UV and visible radiations on cellular DNA. *Current problems in dermatology*. 2010; 29(49):62-73.
- [85] Shigenaga, M. K., Gimeno, C. J., and Ames, B. N. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015; 86(7): 9697-701.
- [86] Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., and Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*. 2016; 160 (89): 1-40.
- [87] Halliwell, B., and Chirico, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American journal of clinical nutrition*. 2013; 57(46): 715-24.
- [88] Collins, A. R. Alcohol and DNA damage. *The Journal of laboratory and clinical medicine* .2009; 136 (61): 258-9.
- [89] Feng, Z., Hu, W., Amin, S., and Tang, M. S. Mutational spectrum and genotoxicity of the major lipid peroxidation product, trans-4-hydroxy-2-nonenal, induced DNA adducts in nucleotide excision repair-proficient and -deficient human cells. *Biochemistry*. 2013; 42(82): 7848-54.
- [90] Nair, J., Barbin, A., Velic, I., and Bartsch, H. Etheno DNA-base adducts from endogenous reactive species. *Mutation research*. 2014; 424 (34): 59-69.
- [91] Bohr, V. A., Stevnsner, T., and de Souza-Pinto, N. C. Mitochondrial DNA repair of oxidative damage in mammalian cells. *Gene*. 2012; 286(51): 127-34.
- [92] Marnett, L.J. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat. Res*. 2010; 424 (48): 83-95.

- [93] **Feng, Z. ; Hu, W. ; Amin, S. ; Tang, M. S.** Mutational spectrum and genotoxicity of the major lipid peroxidation product, trans-4-hydroxy-2-nonenal, induced DNA adducts in nucleotide excision repair-proficient and -deficient human cells. *Biochemistry*. 2013; 42(5): 7848-54.
- [94] **Angeloff, A., Dubey, I., Pratviel, G., Bernadou, J., and Meunier, B.** Characterization of a 5'-aldehyde terminus resulting from the oxidative attack at C5' of a 2-deoxyribose on DNA. *Chemical research in toxicology*. 2011; 14(8): 1413-20.
- [95] **Breen, A. P., and Murphy, J. A.** Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free radical biology & medicine*. 2015; 18(7): 1033-77.
- [96] **Von Sonntag, C.** *The Chemical Basis of Radiation Biology*. Taylor Francis, London. 2012; 56(78):13-22.
- [97] **Cadet, J., Berger, M., Douki, T., and Ravanat, J. L.** Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*. 2011; 131(45): 1-87.
- [98] **Chatgililoglu, C. F., C. Bazzanini, R. Guerra, M. Choi, SY. Emanuel, CJ. Horner, JH. Newcomb M.** Models of DNA C1' radicals. Structural, spectral, and chemical properties of the thymine methyl radical and the 2'-deoxyuridin-1'-yl radical. *J Am Chem Soc*. 2013; 122(64): 9525-33.
- [99] **Koreta, M. R., Y. Defrancq, E. Bourdat, AG. Garcia, J. Coulombeau, C. Lhomme, J.** The 7-nitroindole nucleoside as a photochemical precursor of 2'-deoxyribonolactone: access to DNA fragments containing this oxidative abasic lesion. *Chemistry*. 2014; 6(2): 4163-69.
- [100] **Roupioz, Y. L., J. Koreta, M.** Chemistry of the 2-deoxyribonolactone lesion in oligonucleotides: cleavage kinetics and products analysis. *J Am Chem Soc*. 2012; 124(65): 9129-35.

- [101] **DeMott, M. S., Beyret, E., Wong, D., Bales, B. C., Hwang, J. T., Greenberg, M. M., and Demple, B.** Covalent trapping of human DNA polymerase beta by the oxidative DNA lesion 2-deoxyribonolactone. *The Journal of biological chemistry*.2015; 277(36): 7637-40.
- [102] **Hashimoto, M., Greenberg, M. M., Kow, Y. W., Hwang, J. T., and Cunningham, R. P.**The 2-deoxyribonolactone lesion produced in DNA by neocarzinostatin and other damaging agents forms cross-links with the base-excision repair enzyme endonuclease III. *J Am Chem Soc.* 2016; 123(76): 3161-2.
- [103] **Xu, Yj. D., MS. Hwang, JT. Greenberg, MM. Demple, B.** Action of human apurinic endonuclease (Ape 1) on C1'-oxidized deoxyribose damage in DNA. *DNA repair.* 2013; 13(76): 175- 185.
- [104] **Grandjean, D.** Le stress oxydatif cellulaire: conséquences physiopathologiques chez le chien. *Le Nouv Prat Vet* .2015 ; 22(18): 22-24.
- [105] **Portier K.** Effets de l'oxygénation et de l'exercice sur la fluidité membranaire de l'érythrocyte du cheval [Thèse]. Université d'Auvergne : France ; 2007.
- [106] **Albano E., Bellomo G., Parola M., Carini R., Dianzani M.U.** Stimulation of lipid peroxidation increases the intracellular calcium content of isolated hepatocytes. *Biochim.Biophys.Acta.* 2010 ; 1091(245): 310-16.
- [107] **Grune T., Reinheckel T., Davies K.J.A.** Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB J.* 2013; 11(7): 526-34.
- [108] **Beckman J.S., Koppenol W.H.** Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *American Journal of Physiology - Cell Physiology.* 2014; 40(5): 1424-37.
- [109] **Loeser R. F., Carlson C.S, Del Carlo M., Cole A.**Detection of nitrotyrosine in aging and osteoarthritic cartilage: correlation of oxidative damage with the presence of interleukin-1? And with chondrocyte resistance to insulin-like growth factor 1. *Arthritis & Rheumatism.* 2012; 46(9): 2349–57.

- [110] **Houben J.M, Moonen H.J., Van Schooten F.J., Hageman G.J.** Telomere length assessment: biomarker of chronic oxidative stress? *Free Radical Biology and Medicine*. 2008; 44(3):235–46.
- [111] **Delattre J., Durant G., Jardillier C.** *Biochimie pathologique, aspects moléculaires et cellulaires*. Édition Flammarion, 2013 ; 76(54) : 176.
- [112] **Wu S.B., Wu Y.T, Ma Y.S, Yau-Huei Wei Y.H.** Oxidative stress and its biochemical consequences in mitochondrial DNA mutation-associated diseases: implications of redox therapy for mitochondrial diseases. *Oxidative Stress in Vertebrates and Invertebrates: Molecular Aspects of Cell Signaling*. 2011 ; 43(8): 33-49.
- [113] **Zarkovic, N.** 4-Hydroxynonenal as a bioactive marker of pathophysiological processes. *Mol. Asp. Med*. 2013; 24(5): 281-91.
- [114] **Dianzani, M.U.** 4-Hydroxynonenal from pathology to physiology. *Mol. Asp. Med*. 2014; 24(5):263-72.
- [115] **Webb C., Twedt D.** Oxidative stress and liver disease. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*.2008; 38(1): 125–35.
- [116] **Nakashima I., Liu W., Akhand A.A., Takeda K., Kawamoto Y., Kato M., Suzuki H. et al.** 4- Hydroxynonenal triggers multistep signal transduction cascades for suppression of cellular functions. *Mol. Asp. Med*. 2012; 24, (5):231-38.
- [117] **Forman H. J., D. A. Dickinson, K. E. Iles.** 4 - Hydroxynonenal: A lipid degradation product provided with cell regulatory functions. *Mol. Asp. Med*. 2013; 24(5) :189-94.
- [118] **Harman, D.** Free radical theory of aging: history. *Free radicals and aging*. B. Verlag. Basel. 2015; 87(7): 1-10.
- [119] **Buettner G.R.** Spin trapping: ESR parameters of spin adducts. *Free Radic Biol Med*. 2011; 13(9) : 259–303.

- [120] **Qian S.Y., Wang H.P., Schafer F.Q., Buettner G.R.** EPR detection of lipid-derived radicals from PUFA, LDL, and cell oxidations. *Free Radic Biol Med.* 2010; 29(6):568–79.
- [121] **Gutteridge J., Halliwell B.** Free radicals and antioxidants in the year 2012. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2012; 899(1): 136–47.
- [122] **Clarkson P.M. and Thompson H.S.** Antioxidants: what role do they play in physical activity and health ? *Am. J. Clin. Nutr.* 2009; 72(2): 637–46.
- [123] **Alary J., F. Guéraud, J.-P. Cravedi.** Fate of 4-hydroxynonenal in vivo: disposition and metabolic pathways. *Mol. Asp. Med.* 2013; 24(5):213-18.
- [124] **Paredi P., Kharitonov S.A., Barnes P.J.** Analysis of expired air for oxidation products. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 2012; 166(1): 31–37.
- [125] **Villasante A., Araneda O.F., Behn C., Galleguillos M., Adarmes H.** Antioxidant capacity and oxidative damage determination in synovial fluid of chronically damaged equine metacarpophalangeal joint. *Veterinary Research Communications.* 2010; 34(2): 133–41.
- [126] **Blackmore D.J., Campbell C., Dant C., Holden J.E., Kent J.E.** Selenium status of Thoroughbreds in the United Kingdom, *Equine Vet. J.* 2012; 14(2): 139-43.
- [127] **De Moffarts B., N. Kirschvink N., Lekeux P.** Evaluation et correction du stress oxydant. XXIème Journée d’Etude de la Belgian Equine Practitioners Society. 2014; 56(14): 6-14.
- [128] **De Leenheer A.P., De Bevere V.O., Claeys A.E.** Measurements of α - , β -, and γ - tocopherol in serum by liquid chromatography. *Clinical Chemistry.* 2009; 25(3): 425-28.

- [129] **Craig A.M., Blythe L.L., Rowe K.E., Lassen E.D., Barrington R., Walker K.C.**Variability of α -tocopherol values associated with procurement, storage, and freezing of equine serum and α plasma samples. *American Journal of Veterinary Research*. 2012; 53(12): 2228-34.
- [130] **Marlin D.J., Fenn K., Smith N., Deaton C.D., Roberts C.A., Harris P.A., Dunster C., Kelly, F.J.** Changes in circulatory antioxidant status in horses during prolonged exercise. *J. Nutr.* 2015; 132(2): 1622-27.
- [131] **Hargreaves, B. J., Kronfeld D. S., Waldron J. N., Lopes M.A, Gay L.S., Saker K.E., Cooper W.L., Sklan D.J., Harris P.A.**Antioxidant status and muscle cell leakage during endurance exercise. *Equine Veterinary Journal*. 2012; 34(34): 116–21.
- [132] **Celi P., M. Sullivan, D. Evans** .The stability of the reactive oxygen metabolites (d-ROMs) and biological antioxidant potential (BAP) tests on stored horse blood.*The Veterinary Journal*. 2010; 183(2):217–18.
- [133] **K. Kilk, R. Meitern, O. Härmsen, U. Soomets & P. Hõrak.**Assessment of oxidative stress in serum by d-ROMs test. *Free Radical Research*. 2014; 48(8): 883–89
- [134] **Cathcart M.P., Love S., Hughes K.J.**The application of exhaled breath gas and exhaled breath condensate analysis in the investigation of the lower respiratory tract in veterinary medicine: a review. *The Veterinary Journal*. 2012; 191(3): 282–91.
- [135] **Cutler, R. G., J. Plummer, et al.**Oxidative stress profiling: part II. ThEROy, technology, and practice. *Ann N Y Acad Sci*. 2015; 1055(76): 136-58.
- [136] **Demple B.** Regulation of bacterial oxidative stress genes.*Annu Rev Genet*. 2013; 25(4): 315-337.
- [137] **Fairbairn, DW., Olive, PL., O’Neill, KL.** The comet assay : a comprehensive review. *Mutat. Res*. 2014; 339(46) : 37-59.

- [138] **Pouget, JP.** Effet du rayonnement ionisant sur l'ADN cellulaire : mesure des bases puriques et pyrimidiques modifiées [Thèse], Grenoble, France ; 2009.
- [139] **Applegate LA, Scaletta C, Panizzon R and Frenk E.** Evidence that ferritin is UV inducible in human skin: part of a putative defense mechanism. *J Invest Dermatol.* 2014; 111(59):159-63.
- [140] **Valko M., Omova K.J.** Free Radicals, Signal Transduction, and Human Disease. *Oxidative Stress in Vertebrates and Invertebrates: Molecular Aspects of Cell Signaling.* 2011; 56(4): 17-32.
- [141] **Mendis E., Kim M.M., Rajapakse N., Kim S.K.** Sulfated glucosamine inhibits oxidation of biomolecules in cells via a mechanism involving intracellular free radical scavenging. *European Journal of Pharmacology.* 2010; 579(3): 74–85.
- [142] **Kalaci A., Yilmaz H.R., Aslan B., Söğüt S., Yanat A.N., Uz E.** Effects of hyaluronan on nitric oxide levels and superoxide dismutase activities in synovial fluid in kneeosteoarthritis. *Clin.Rheumatol.* 2007; 26(8): 1306-11.
- [143] **Wautier MP et al.** N (carboxymethyl) lysine as a biomarker for microvascular complications in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab.*2013; 29(16): 44-52.
- [144] **Furuya R et al.** Impact of residual renal function on plasma levels of advanced oxidation protein products and pentosidine in peritoneal dialysis patients. *Nephron Clin Pract.*2009; 112(76): 255-61.
- [145] **Salman AG et al.** Pentosidine - a new biochemical marker in diabetic retinopathy. *Ophthalmic Res.* 2009; 42(28): 96-8.
- [146] **Hudson BI et al.** Diabetic vascular disease: it's all the RAGE. *Antiox Rep Signal.*2015; 7(3): 1588-1600.
- [147] **Pullerits R et al.** Decreased levels of soluble receptor for advanced glycation end products in patients with rheumatoid arthritis indicating deficient inflammatory control. *Arthritis Res Therapy.*2014; 47(38): 817-24.

- [148] **Klebanoff SJ.** Phagocytic cells: products of oxygen metabolism. In: Inflammation basic principles and clinical correlates. Gallin JI, Golstein IM, Snyderman R, eds. Raven Press, New York. 2015; 45(6) 391-445.
- [149] **Kielstein JT et al.** Two cardiovascular risk factors in one? Homocysteine and its relation to glomerular filtration rate. A meta-analysis of 41 studies with 27000 participants. *Kidney Blood Press.* 2008; 31(17): 259-67.
- [150] **Hensley K et al.** New perspectives on vitamin E: gamma-tocopherol and carboxyethylhydroxychroman metabolites in biology and medicine. *Free Rad Biol Med.* 2014; 36(18): 1-15.



Serment de Galien

Je jure en présence des maîtres de cette faculté :

- *D'honorer ceux qui m'ont instruite dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- *D'exercer ma profession avec conscience, dans l'intérêt de la santé publique, sans jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.*
- *D'être fidèle dans l'exercice de la pharmacie à la législation en vigueur, aux règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- *De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession, de ne jamais consentir à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.*
- *Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses, que je sois méprisée de mes confrères si je manquais à mes engagements.*



قسم الصيدلي

بسم الله الرحمن الرحيم

أقسم بالله العظيم

- ◀ أن أراقب الله في مهنتي
- ◀ أن أبجل أساتذتي الذين تعلمت على أيديهم مبادئ مهنتي وأعترف لهم بالجميل وأبقى دوما وفيا لتعاليمهم.
- ◀ أن أزاول مهنتي بوازع من ضميري لما فيه صالح الصحة العمومية، وأن لا أقصر أبدا في مسؤوليتي وواجباتي تجاه المريض وكرامته الإنسانية.
- ◀ أن ألتزم أثناء ممارستي للصيدلة بالقوانين المعمول بها وبأدب السلوك والشرف، وكذا بالاستقامة والترفع.
- ◀ أن لا أفشي الأسرار التي قد تعهد إلى أو التي قد أطلع عليها أثناء القيام بمهامي، وأن لا أوافق على استعمال معلوماتي لإفساد الأخلاق أو تشجيع الأعمال الإجرامية.
- ◀ لأحضى بتقدير الناس إن أنا تقيدت بعهودي، أو احتقر من طرف زملائي إن أنا لم أف بالتزاماتي.

والله على ما أقول شهيد

جامعة محمد الخامس - الرباط
كلية الطب والصيدلة بالرباط

أطروحة رقم: 36

سنة: 2017

المؤشرات الحيوية للأكسدة

أطروحة

قدمت ونوقشت علانية يوم:

من طرفه

الآنسة: زينب بوبالي

المزدادة في: 29 غشت 1991 بالعيون

لنيل شهادة الدكتوراه في الصيدلة

الكلمات الأساسية: الأكسدة - العلامات البيولوجية - مضادات للأكسدة - الأنواع العامل المؤكسد -
الاستكشاف السريري.

تحت إشراف اللجنة المكونة من الأساتذة

رئيس

السيد: عز الدين إبراهيمي

أستاذ علم التكنولوجيا الحيوية الطبية

مشرف

السيد: رشيد الجودي

أستاذ في علم السموم

أعضاء

السيد: يونس الرحالي

أستاذ في الصيدلة الغالينية

السيد: مراد بوشريك

أستاذ في علم الطفيليات الطبية

السيد: ياسر بوسليمان

أستاذ في علم السموم