

I - Introduction :

La molécule d'oxygène présente la particularité d'avoir la structure d'un bi radical libre en raison de deux électrons célibataires situés sur les deux orbitales de plus grande énergie (chaque atome d'oxygène possède 8 électrons à l'état normal). Cette structure bi radicalaire confère à la molécule d'oxygène la capacité d'accepter facilement des électrons célibataires pour donner naissance à des espèces partiellement réduites. Ainsi en acceptant un électron supplémentaire la molécule O_2 devient la forme réduite $O_2^{\cdot -}$ (radical superoxyde) : $O_2 + 1 e^- \longrightarrow O_2^{\cdot -}$ (+ $H^+ \longrightarrow H-O-O^{\cdot}$ radical perhydroxyle (c'est la forme protonée du superoxyde)).

Les espèces intermédiaires formées au cours de ce processus (addition d'électrons) : $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 et $^{\cdot}OH$ sont des espèces partiellement réduites de l'oxygène ayant accepté respectivement un, deux, et trois électrons. Elles font partie des ERO.

Parmi les ERO, il existe d'autres radicaux libres centrés sur l'oxygène et qui sont les radicaux péroxyles ($RO_2^{\cdot}$) et les radicaux alkoyles ($RO^{\cdot}$).

1- Stress Oxydant

1-1 Equilibre physiologique :

- Les radicaux libres (R.L) sont produits en permanence
- Systèmes de défense: antioxydants

Le « Stress Oxydant » = rupture d'équilibre :

- ✓ déficit en antioxydants
- ✓ surproduction de radicaux libres
- ✓ les deux

1-2 Origines multiples :

- Intoxications aux métaux lourds (mercure, plomb, cadmium)
- Irradiations (UV, rayons X...)
- Phénomènes d'ischémies/reperfusions (thromboses, exercice) Carences nutritionnelles (vitamines, oligo-éléments)

Anomalies génétiques (mauvais codage pour une protéine)

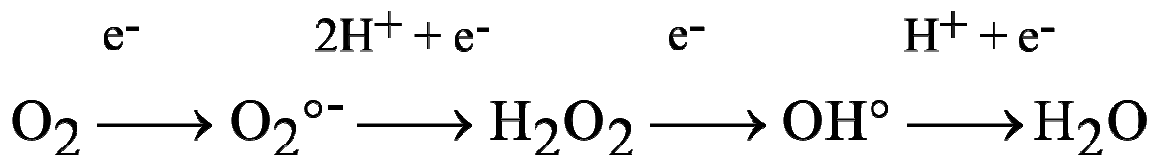
1-3 Localisation:

- Niveau tissulaire
- Type cellulaire précis
- Pas au niveau de l'organisme entier

1-4 Espèces réactives de l'oxygène (EROs / ROS):

espèces chimiques oxygénées rendues chimiquement très réactives par la présence d'électrons de valence non appariés

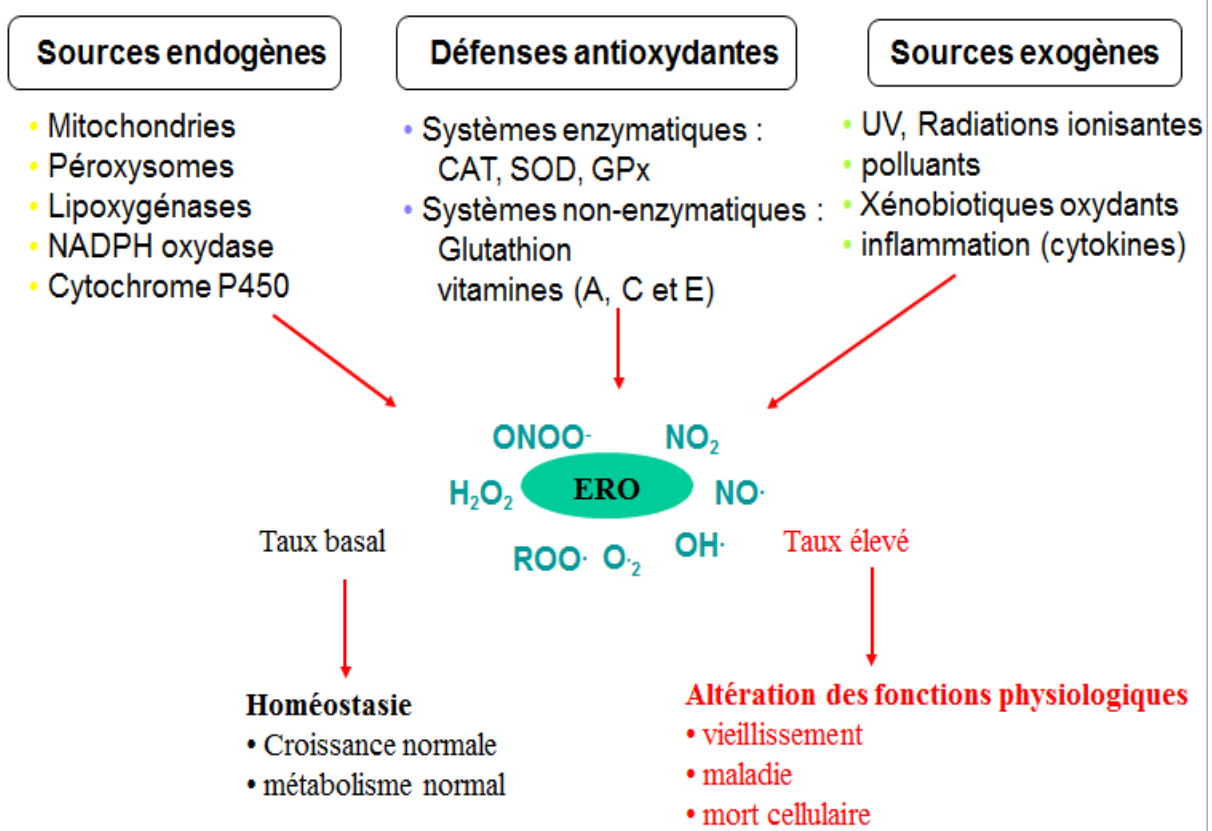
il existe plusieurs EROs, formées par 4 réductions successives de l'oxygène moléculaire en eau



« Les quatre étapes de réduction monoélectronique de l'oxygène »

Stress Oxydant et Pathologie

(Pr. Djebbar H.)



II- Stress oxydant et athérosclérose :

1- Définition :

L'athérosclérose, principale responsable des cardiopathies ischémiques et des accidents vasculaires cérébraux constitue la première cause de mortalité dans les pays industrialisés. C'est une inflammation chronique lentement évolutive de l'intima des grosses et moyennes artères associée à un dysfonctionnement endothélial et à une réaction fibroproliférative. Elle se caractérise par la formation de plaques athéroscléreuses dont la progression aboutit à la réduction de la lumière artérielle et la rupture provoque des accidents ischémiques aigus.

2- Rôle du stress oxydant :

Les derniers progrès dans ce domaine convergent vers le rôle essentiel joué par le stress oxydant. En effet il est apparu que l'oxydation des LDL (lipoprotéines de basse densité) leur confère leur haut pouvoir athérogène,

Stress Oxydant et Pathologie

(Pr. Djebbar H.)

associé à l'augmentation de production des ERO par les cellules de la paroi artérielle induite par les autres facteurs de risques de l'athérosclérose.

L'OMS définit l'athérosclérose comme une association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et de moyen calibre consistant en une accumulation de lipides, de glucides complexes de sang et de produits sanguins, de tissus fibreux et de dépôts calcaires. Le processus athéromateux débute dès l'enfance évolue et engendre progressivement des lésions. Les manifestations cliniques les plus fréquentes sont les cardiopathies ischémiques les accidents vasculaires cérébraux et l'artérite des membres inférieurs. Tous les individus à un âge plus ou moins avancé développent des plaques athéromateuses et seuls certains sujets présentent des manifestations cliniques de l'athérosclérose

3-Stress oxydant et athérogenèse :

L'anion superoxyde et son produit de dismutation le peroxyde d'hydrogène, l'oxyde nitrique les hydroperoxydes, sont produits en permanence par plusieurs systèmes enzymatiques cellulaires (chaîne respiratoire mitochondriale, NADPH oxydases, NOSynthétases , lipooxygénases...). La production de $O_2^{\cdot-}$ et de H_2O_2 espèces peu réactives et à durée de vie relativement longue est contrôlée par des systèmes de défense enzymatiques et non enzymatiques (SOD, catalase, GSH...). Lorsque la balance antioxydant /pro oxydant penche pour ces derniers, les ERO cantonnés dans la cellule, peuvent être transportés d'un compartiment à l'autre et peuvent alors générer des ERO plus réactifs comme le radical hydroxyl $\cdot OH$ le peroxyneutre $ONOO^{\cdot}$ et les radicaux peroxydes $ROO^{\cdot}$.

Le déséquilibre entre la production et la destruction des ERO au sein de la paroi vasculaire sous l'influence de divers stimuli joue un rôle important dans l'athérogenèse d'une part en favorisant l'oxydation des lipoprotéines au niveau extracellulaire et d'autre part en induisant un stress oxydant intracellulaire altérant le fonctionnement de la cellule.

4-Anatomie de l'artère :

Une artère est constituée de :

L'intima : en contact avec le sang qui est mince lisse et tapissée de cellules endothéliales reposant sur une zone sous-endothéliale pauvre en cellules de structure lâche.

La média : tunique moyenne plus épaisse de nature à la fois musculaire (tissu musculaire lisse et un réseau de collagène et élastine).

L'adventice : tunique externe de nature fibreuse (plus résistante que les deux autres) plus rigide , elle contient les vaisseaux qui vont permettre l'apport des nutriments et de l'O₂ aux grosses artères.

4-1-Les Lipoprotéines de basse densité LDL :

Ce sont des macromolécules protéo-lipidiques contenant une molécule d'apolipoprotéine(apo100), et des acides gras polyinsaturés (AGPI) et qui sont la cible de la peroxydation lipidique.

4-2 - Attaque oxydative des LDL :

L'attaque des AGPI(acides gras polyinsaturés) par les ROS et suivie d'une phase de propagation au cours de laquelle se produit une déplétion des LDL, une formation de **LDL-LOOH** et l'apparition d'une grande variété de produits d'oxydation et de fragmentation dérivant des phospholipides et du cholestérol. L'oxydation se termine par la formation de dérivés stables comme les MDA.

5- Effets biologiques des LDLox :

Les cibles biologiques sont :

- Les cellules endothéliales de la paroi vasculaire.
- Les monocytes macrophages infiltrés et résidents dans l'espace sous endothélial.
- Les cellules musculaires lisses.

5-1 Effet sur les cellules endothéliales :

Les LDLox peuvent modifier plusieurs fonctions endothéliales importantes :

- diminution de la vasoréactivité par diminution et libération de NO.
- Réaction inflammatoire locale par l'adhésion des leucocytes et leur migration transendothéliale.

- Action procoagulante
- Augmentation de récepteurs des LDLox à la surface endothéliale
- Action cytotoxique et proapoptotique.

5-2 Action sur les monocytes macrophages :

Les LDLox ont une action chimiotactique sur les monocytes circulants et favorisent leur infiltration dans la paroi vasculaire et le déclenchement du processus inflammatoire qui favorise la progression athéromateuse.

L'infiltration des monocytes est suivie par la captation cellulaire des LDLox faisant intervenir les **récepteurs scavengers** (éboueurs) cette internalisation des LDLox dans les macrophages les transforme en **cellules spumeuses**.

La dégradation enzymatique au sein des cellules spumeuses est très limitée (les LDLox sont peu dégradables par les enzymes lysosomiales). Ces cellules finiront par mourir libérant les LDLox **conduisant** à la **formation de la strie lipidique**.

Ainsi, le processus de formation de la plaque démarre par :

a- l'infiltration des LDL dans l'intima puis modification de leur structure par les ROS : LDL s'enrichissent en hydroperoxydes lipidiques(LOOH) .

b- Internalisation des LDLox dans les macrophages qui se transforment en cellules spumeuses (macrophages gonflés de gouttelettes de graisse) dont l'accumulation forme la strie lipidique. **C'est le stade réversible de l'athérosclérose.**

c- Migration et prolifération des cellules musculaires lisses et des fibroblastes dans l'espace sous endothélial avec induction d'un stress oxydant intracellulaire avec pour conséquence une **prolifération et une hypertrophie cellulaire** . Cette accumulation excessive de la matrice et la prolifération cellulaire entourent la masse lipidique formant une plaque **fibrolipidique** conduisant à l'occlusion partielle de la lumière artérielle.

5-3 Evolution de la plaque athéroscléreuse :

L'évolution de la plaque dépend de l'équilibre entre la prolifération et la mort cellulaire (macrophages et cellules musculaires lisses CML). **L'augmentation du cœur lipidique, la dégradation matricielle et la déplétion en CML contribuent à l'instabilité de la plaque.** La plaque instable est caractérisée par

Stress Oxydant et Pathologie

(Pr. Djebbar H.)

un pourcentage élevé de cellules en apoptose et par un appauvrissement en CML qui ne peuvent plus synthétiser de protéines matricielles pour compenser la dégradation de la matrice par les métalloprotéases(MPP).

L'exposition des phosphatidylsérines membranaires des cellules apoptotiques s'ajoutent aux effets des LDLox pour engendrer un environnement procoagulant. **Les fissures et la rupture de la plaque favorisent l'agrégation plaquettaire (formation de thrombus ou caillot sanguin) entraînant des accidents vasculaires.**

Stress oxydant et processus neurodégénératif

I- Introduction :

L'utilisation de l'oxygène comme accepteur terminal d'électrons cause un grand problème aux cellules puisqu'il est à l'origine de la formation de ROS ou ERO. Environ 1% de l'O₂ est réduit en O₂⁻ ou H₂O₂.

Généralement le flux électronique à travers des systèmes utilisant l'O₂ tels que la chaîne respiratoire mitochondriale, les flavoprotéines, les CYP450 sont étroitement couplés à une réduction partielle de l'O₂. Dans la cellule nerveuse, une perturbation du transfert d'électrons (découplage du complexe I ou un déficit génétique en complexe IV au niveau de la mitochondrie peut contribuer à la dégénérescence neuronale.

La forte utilisation de l'O₂ par le cerveau et sa richesse en acides gras polyinsaturés fortement peroxydables en font un tissu particulièrement vulnérable au stress oxydant. Ces oxydants peuvent être produits par toutes les cellules du cerveau.

1- Agrégation protéique, inflammation et production de ROS dans les maladies neurodégénératives :

Le peptide amyloïde dans la MA (maladie d'alzheimer), l'α synucléine (protéine abondante dans le cerveau) dans la MP (maladie de Parkinson), la superoxyde dismutase à Cuivre et à Zinc mutée dans la SLA (sclérose latérale amyotrophique) s'accumulent et forment des agrégats et des plaques qui contribuent ainsi à l'activation microgliale (la microglie est un ensemble de cellules qui composent entre 5% et un quart des cellules du SNC elles possèdent une forme en étoile sont de petites taille et peuvent se mouvoir. Elles sont apparentées aux macrophages et ont pour rôle d'assurer l'immunité du SN).

L'activation microgliale conduit à l'initiation et à la propagation de l'inflammation. Ce processus inflammatoire va conduire directement ou indirectement à la mort par apoptose et/ou nécrose des neurones avoisinants.

2- Cas de la maladie de Parkinson :

C'est une maladie neurodégénérative caractérisée par la présence de symptômes et de lésions neuropathologiques spécifiques. La prévalence de cette maladie qui augmente avec l'âge est de 2% dans la population de 65 ans et plus. Elle se manifeste par des tremblements, une rigidité doublée d'une instabilité posturale et une bradykinésie (mouvement ralenti et perte du mouvement fin).

2-1 Manifestations de la maladie :

Au niveau cérébral la maladie se manifeste par une dégénérescence de la voie nigrostriée : zone constituée de substantia nigra (substance noire) et le striatum. Cette voie est formée par les neurones produisant **la dopamine** un neurotransmetteur qui influe sur le comportement et le mouvement, les corps cellulaires sont situés dans la substantia nigra et les axones dans les ganglions de la base (série de noyaux situés à la base du cerveau antérieur) où ils libèrent la dopamine.

Dans la MP, la dégénérescence de la voie nigrostriée signifie la destruction des corps cellulaires dopaminergiques conduisant à la dégénérescence des terminaisons nerveuses. Cette perte des neurones dopaminergiques est associée à la présence **d'inclusions protéiques** intra neuronales appelées **corps de Lewy** composés de neurofilaments et d'ubiquitine (qui est une petite protéine qui sert à « marquer » d'autres protéines pour commander leur destruction par protéolyse.)

La dégénérescence des neurones conduit à une déplétion en dopamine.

2-2 Facteurs influençant la maladie :

Certains facteurs environnementaux peuvent jouer un rôle dans l'émergence de la maladie : l'utilisation abusive de certains herbicides ou pesticides pourraient être des facteurs de risque. Ces xénobiotiques sont capables de passer à travers la membrane neuronale et avoir pour cibles des activités enzymatiques telles que l'acétylcholine estérase ou la chaîne respiratoire mitochondriale (le complexe I par exemple) générant un stress oxydatif.

3-Rôle du stress oxydant :

Le niveau basal de ROS est important dans les neurones dopaminergiques et le métabolisme propre de la dopamine pourrait être responsable de leur formation dans le SN normal.

3-1-La dégradation de la dopamine par la monoamine oxydase(MAO) dont l'activité augmente avec l'âge induit la formation de peroxyde d'hydrogène.

3-2-En présence de Fer dont les niveaux nigraux sont élevés , le peroxyde d'hydrogène est converti en radicaux hydroxyles via la réaction de Fenton.

La dopamine est oxydée à la fois enzymatiquement et non enzymatiquement (autooxydation) : les MAO A et B sont impliquées dans la désamination oxydative de la dopamine en 3,4-dihydroxyphénylacétaldéhyde dans la substance noire avec production de H_2O_2 qui participe à l'installation du stress oxydant.

La dopamine peut également s'auto-oxyder et former des quinones et du H_2O_2 .

3-3-La neuromélanine est formée par auto-oxydation de la dopamine et se retrouve à forte concentration dans les neurones qui dégénèrent.

3-4-Une diminution de l'activité GPx sélénodépendante,

donc diminution du potentiel d'élimination du H_2O_2 ainsi qu'une forte production de $O_2^{\cdot -}$

3-5-Le taux de GSH est normalement plus faible dans cette zone mais dans la MP il y a une réduction supplémentaire de cet élément ; cette déplétion du GSH est liée à la diminution de l'activité du complexe I mitochondrial.

4-Mécanisme des réactions radicalaires :

En situation normale, l'anion superoxyde est constamment produit par de nombreuses voies biologiques et sa concentration cellulaire est maintenue basse grâce à la SOD. L'oxyde nitrique est présent en abondance à la fois dans les cellules et dans l'espace extracellulaire à cause de la production de cette espèce réactive par les NOS(NO-synthases). Dans la MP le taux d' $O_2^{\cdot -}$

Stress Oxydant et Pathologie

(Pr. Djebbar H.)

augmente à cause du blocage de la respiration mitochondriale et la combinaison d' O_2^- avec le NO permettra la formation de peroxynitrite. Le niveau de stress augmente et la cytotoxicité également.

La formation de radicaux libres dans le SN parkinsonien est liée à une déficience de l'activité mitochondriale au niveau des neurones dopaminergiques et une augmentation du taux de Fer libre liée à une diminution de la ferritine (protéine de stockage du Fer) .

La combinaison de toutes ces sources potentielles de radicaux libres a pour conséquence l'activation de différentes voies de réponse au stress et à la peroxydation des macromolécules cellulaires.

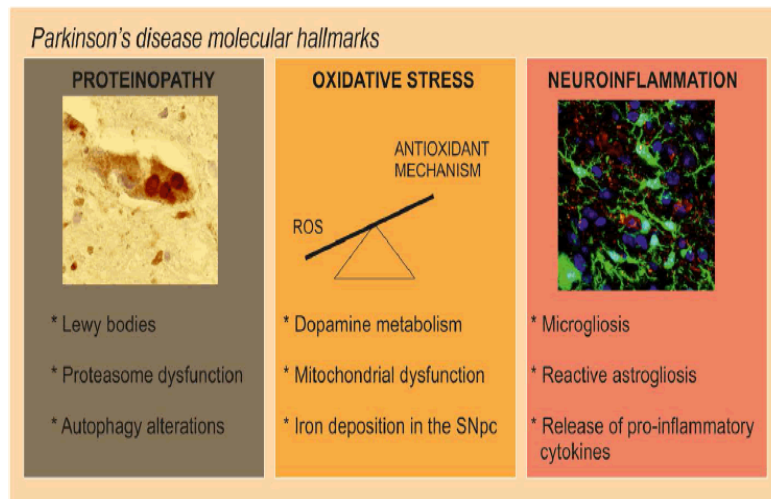


Figure 2: Hallmarks of Parkinson's disease.

At the molecular level, PD is characterized by proteinopathy (accumulation of proteins like α -synuclein in Lewy bodies, dysfunction of the proteasome and autophagy alterations), oxidative stress (dysregulation of reactive oxidative species (ROS) and the antioxidant machinery; Dopamine (DA) metabolism increased oxidation, alteration in mitochondria function and increased iron deposition in the SNpc) and neuroinflammatory (microgliosis, reactive astrogliosis and increased pro-inflammatory cytokines) processes

5-Radicaux libres et maladie cancéreuse

Les cancers sont les principales causes de décès dans le monde. Ce sont des maladies complexes présentant de nombreuses formes et dépendent d'un grand nombre de facteurs. Parmi ces facteurs les radicaux libres jouent un rôle de premier plan à tous les stades de la maladie.

Agents carcinogènes et stress oxydant :

L'exposition à des facteurs de risque (facteurs carcinogènes) qu'elle soit due à des comportements à risque, à une pollution importante ou à la vie professionnelle est une des principales causes du cancer et souvent ces facteurs carcinogènes qui vont créer des lésions dans nos gènes sont des générateurs directs de ou indirects de radicaux oxygénés et de ROS.

Ainsi, l'air pollué apporte directement des espèces oxydantes comme l'ozone, les rayonnements ionisants (rayons X) génèrent des radicaux hydroxyles, les UVA des radicaux super oxydes. La fumée de tabac apporte directement des radicaux oxygénés au niveau des poumons mais en libère également par des mécanismes indirects. Au total, la fumée de cigarette contiendrait plus de 200 molécules pro-oxydantes, il en est ainsi du goudron, des particules de diesel ou rejets d'hydrocarbures aromatiques polycycliques(HAP). Les métaux carcinogènes comme le nickel ou le chrome se lient directement à l'ADN et endommagent *in situ* les bases de l'ADN en présence de superoxydes ou de H_2O_2 par réaction de Fenton.

Certains produits organiques carcinogènes deviennent toxiques après passage par les enzymes des phases I et II. Les enzymes de phase I convertissent les agents chimiques inertes en intermédiaires électrophiles par des réactions d'oxydation. Les radicaux oxygénés agissent directement sur le premier type de mécanismes en oxydant des composés inertes en composés carcinogènes et sur le deuxième mécanisme en diminuant la teneur cellulaire en glutathion réduit nécessaire à certains processus d'élimination de carcinogènes. Inversement, certains pro carcinogènes libèrent des radicaux oxygénés lors de leur activation comme le métabolisme des HAP dont le plus important représentant : le benzo(a)pyrène génère des radicaux par des mécanismes de

Stress Oxydant et Pathologie

(Pr. Djebbar H.)

cycles redox après action du CYP450. Le métabolisme hépatique de l'éthanol responsable des cancers du foie est une source de radicaux hydroxyéthyles.

Les carcinogènes peuvent agir indirectement en abaissant les défenses antioxydantes par surconsommation du GSH dans leur métabolisme ou comme le cadmium et le mercure en inhibant les enzymes antioxydantes. L'alimentation peut apporter des nutriments dont l'excès favorise à la fois la peroxydation et le risque de cancer, la consommation excessive de lipides et de glucides induisent une surproduction de radicaux oxygénés par la mitochondrie.

Mécanismes expliquant l'effet carcinogène du stress oxydant :

Les cellules cancéreuses prolifèrent indéfiniment sans stimulation ne répondant plus à l'inhibition de contact et ne peuvent plus se différencier elles semblent dériver d'une seule cellule souche. Chez les cellules cancéreuses le processus de l'apoptose est altéré, les cellules tumorales développent une stratégie pour échapper à l'immunité cellulaire et modifient la matrice extracellulaire pour envahir les tissus environnants. Les cellules tumorales induisent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogénèse) irriguant la tumeur et lui permettant de s'oxygéner et de se nourrir.

Elles produisent de plus grandes quantités de H_2O_2 que les cellules normales. Cette production pourrait provenir de la présence de polynucléaires infiltrés dans les tissus tumoraux et/ou d'anomalies des systèmes antioxydants (des mutations ont été observées chez la superoxyde dismutase-2). Cet excès des ROS dans la cellule tumorale pourrait maintenir la prolifération anormale et avec les mutations induites par oxydation de l'ADN participer au caractère invasif et les métastases.

Mécanisme :

Les radicaux libres et surtout le radical hydroxyle $\cdot OH$ considéré comme l'espèce réactive la plus impliquée dans les phénomènes d'oxydation endogènes de l'ADN cellulaire soit en l'oxydant soit en formant des adduits avec celui-ci.

Stress Oxydant et Pathologie

(Pr. Djebbar H.)

Cinq(5) classes principales de dommages oxydatifs médiés par $\cdot\text{OH}$ Peuvent être générées : bases oxydées, sites abasiques, adduits intracaténaux, des cassures de brins et des pontages ADN-protéines. Les lésions oxydatives touchent de nombreuses bases mais la plus étudiée est la 8-oxo-7,8-déshydroguanine. En effet la guanine est la cible privilégiée des réactions d'oxydation et cette base oxydée est un bon marqueur du stress oxydant. Ces modifications de base par oxydation sont des lésions courantes au niveau de l'ADN et sont induites de manière physiologique(l'ADN subirait 1000 attaques oxydatives /jour et l'ADN mitochondrial environ 10 fois plus. Les systèmes de réparation des bases endommagées de l'ADN sont très efficaces afin de maintenir l'intégrité de l'information génétique. Les mutations interviennent lorsque l'excès de lésions ou une déficience de réparation laissent persister ces anomalies au moment où le cycle repart et que les polymérases recopient mal cet ADN.

Ainsi l'attaque de l'ADN joue un rôle essentiel dans la phase d'initiation de la carcinogénèse.

Stress oxydant et immunité tumorale :

Notre organisme élimine chaque jour les cellules promues cancéreuses grâce à des macrophages et des lymphocytes spécialisés dans la destruction des cellules anormales malheureusement les lymphocytes chargés de détruire les cellules cancéreuses sont sensibles au stress oxydant. La mise en contact de cellules chargées de détruire les tumeurs avec les ROS diminue leur activité cytotoxique.

Des chercheurs ont démontré chez des femmes atteintes d'un cancer du sein que le stress oxydatif chronique stabilise une protéine appelée HIF (hypoxia Inducible Factors)protéines agissant comme facteurs de transcription dans tous les tissus et régulés par l'absence de l'oxygène . Cette protéine génère une angiogénèse càd la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins. En effet la tumeur met à sa disposition un réseau vasculaire complexe pour pouvoir s'alimenter. Le stress oxydatif permet également l'apparition d'un environnement tumoral inflammatoire.

Stress Oxydant et Pathologie

(Pr. Djebbar H.)

Le cancer découle d'une lésion non réparable de l'ADN . Cette ADN lésé va alors donner de mauvaises instructions à la cellule qui va se développer de façon anormale et anarchique et les radicaux libres ont la capacité de léser l'ADN.

Parallèlement l'addition de bcarotène améliore l'activité cytotoxique vis-à-vis d'une lignée tumorale, un tel effet a été observé chez l'homme où la supplémentation en carotène ou en glutathion se sont avérés bénéfiques pour l'immunité antitumorale.