

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA TERRE ET
DE L'UNIVERS
DEPARTEMENT DE : Science de la Nature et de la Vie



Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Spécialité/Option : Biologie Moléculaire et Cellulaire / Immunologie Approfondie

Thème : *L'effet du stress oxydant sur le système immunitaire*

Présenté par :

- Ghoumrani Latifa
- Hassainia Sarah

Devant le jury composé de :

Président (e) : Mme Ratem C	M.A.A	Université de Guelma
Examineur : Mme Ayed H	M.A.A	Université de Guelma
Encadreur : Bouden Ismail	M.A.A	Université de Guelma

Juin 2014

Remerciement

Remerciements

***Nous exprimons d'abord notre profonds remerciements à
notre DIEU qui nous a donné le courage et la
Volonté d'achever ce travail.***

***Mes sincères remerciements vont à Mme Retem C (MAA) à
l'université 8 MAI 1945 de GUELMA pour d'avoir accepté
d'assurer la présidence du jury.***

***Mes sincères remerciements à Mme Ayad H (MAA) à
l'université 8 MAI 1945 de GUELMA. Pour d'avoir accepté
d'examiner ce modeste travail.***

***Nous exprimons notre profonds remerciements à notre
encadreur Ms Bouden I (MAA) à l'université 8 MAI 1945 de
GUELMA. Sans ses encouragements et aides nous ne serions
jamais arrivées à ce stade de notre formation.***

Latifa et Sarah

Dédicace

Je dédie ce travail à Mes parents Qu'ils se trouvent ici tous
ma Gratitude pour leur soutien tous

Au long de Mes études

A mes sœurs Nawel Thahra zed et Spécialement à ma cher
sœur Djazira et son époux Sassi pour son aide et son
encouragement

A mes chers frères que Dieu les bénéfices Didi Thawki
surtout à Yassine qu'il n'était pas là mais a tous moments
présent dans mon cœur je t'aime beaucoup

Sans oublier mes nièces Imed Khadidja Abd Raheme
Rokaya et Serour

A tout ma famille spécialement ma cousine Sandra

A mes chers amis par ordre alphabétique pour ne faire pas
jaloux Fadia Hamida Imen Sameh et Sarah

A mon cher ami Kassem

A tous ceux que J'aime

Latifa

Dédicace

Je dédie tout particulièrement le fruit de mon travail :

*À la personne du messager d'Allah, MOHAMED que le salut soit sur lui porteur
d'espoir, homme de dialogue et de tolérance, et illuminateur des mondes obscurs.*

*À mes très chers parents pour leurs dévouements, leurs amours, leurs sacrifices et
leurs encouragements. Que ce travail soit, pour eux, un modeste témoignage
de ma profonde affection et tendresse.*

À mes chers frères : Mohamed, Chafik, Adem.

À ma petite très chère sœur : Khadidja.

À ma sœur chérie : Meriem.

Sans oublier la petite de la famille « Soujoud » que je l'aime beaucoup.

À celle qui a partagé ce travail avec moi, ma chère sœur Latifa.

*À mes amies sans exception, spécialement à Ahlem, Fadia, Sameh, Imen et
Hamida.*

À toute ma famille spécialement : mon Oncle Amar, Basma, Imen, Chaima.

Sans oublier tous les gens qui me considèrent proche.

À tous ceux qui j'aime et qui m'aiment . SARAH

Sommaire

Sommaire

Liste des abréviations
Liste des figures
Introduction

Partie bibliographique

Chapitre I : Stress oxydant

I-1. Définition	01
I-2. Radicaux libres.....	01
I-2-1. Histoire	03
I-2-2. Les différentes formes des radicaux libres.....	03
I-2-2-1. Le radical anion super oxyde.....	04
I-2-2-2. Le peroxyde de H ₂ O ₂	
I-2-2-3. Le radical hydroxyle.....	05
I-2-2-4. Oxyde nitrique	05
I-2-2-5. Nitrique dioxyde de NO ₂	06
I-2-2-6. Peroxynitrite.....	06
I-2-3. Origine des ERO.....	06
I-2-3-1. Principale source des radicaux libres	07
I-2-4. Rôle des ERO dans la situation physiologique.....	17
I-3. Système antioxydant.....	18
I-3-1. Système antioxydant enzymatique.....	19
I-3-2. Système antioxydant non enzymatique.....	20
I-4. Les dégâts cellulaires.....	22

I-4-1. Peroxydation lipidique	22
I-4-2. Oxydation des protéines.....	23
I-4-3. Dommage de L'ADN.....	24
I-4-4. Activation des pores de perméabilité.....	25

Chapitre II : Stress oxydant et le système immunitaire

II-1. L'effet des antioxydants sur la réponse immunitaire.....	26
II-2. Les radicaux libres et la phagocytose microbiennes.....	28
II-3. Les antioxydants alimentaires et le système immunitaire.....	29
II-4. Conséquences de la malnutrition sur l'immunité.....	30
II-4-1. Sous-alimentation.....	30
II-4-2. Obésité.....	31
II-4-3. Caroténoïdes.....	31
II-4-4. Arginine.....	33

Chapitre III : Les pathologies liées aux stress oxydant

III-1. Les pathologies et le stress oxydant.....	36
III-1-1. Diabète et stress oxydant.....	37
III-1-1-1. Glycation (glycosylation).....	38
III-1-1-2. Les AGE-RAGE.....	39
III-1-1-3. Augmentation de la voie de polyol.....	40
III-1-1-4. L'épuisement des antioxydants sérique et cellulaire.....	41
III-1-1-5. Oxydation de l'DNA et le dysfonctionnement	41
mitochondriale au cours du diabète	
III-1-2. Stress oxydant et le vieillissement.....	42
III-1-2-1. La théorie radicalaire du vieillissement.....	42
III-1-2-2. Production d'ERO au cours du vieillissement.....	44
III-1-2-3. ERO entre pléiotropie et compromis.....	44

III-1-2-4. Système antioxydants au cours du vieillissement.....	45
III-1-2-5. Oxydation des constituants cellulaires au cours du vieillissement.....	46
III-1-2-6. Intérêt de la détermination du stress oxydant Chez le sujet âgé.....	49

Conclusion

Références bibliographiques

Résumés

Liste des Abréviations

- **·OH** : Radical **H**ydroxyl
- **4-HNE** : **4**-Hydroxy Non **E**nal
- **8-OH-dG** : **8**-Hydr**O**xy-2'-**d**ésoxy **G**uanosine
- **AA** : Anti mycine **A**
- **ADN** : Acide **D**ésoxyribo Nucléique.
- **ADP** : Adénosine **D**iphos **P**hate.
- **AGE** : Advanced **G**lycation **E**nd (dernier produit de la glycation des protéines)
- **AGMI** : Acide **G**ras **M**ono **I**nsaturé
- **AGPI** : Acide **G**ras **P**oly**I**nsaturé
- **AGS** : Acide **G**ras **S**aturé
- **AIF** : Apoptose **I**nducting **F**actor
- **ANT** : Transporteur Nucléotide Adénylique
- **Apaf-1** : Apoptosis activating factor-1
- **ATP** : Adénosine-5'-**T**ri**P**hosphate
- **ATPase** : **ATP** synthase
- **BER** : **B**ase **E**xcision **R**epair
- **CLHP** : Chromatographie **L**iquide **H**aute **P**erformance
- **CoQ** : Ubiquinone
- **DNPH** : **D**i**N**itro**P**henyl **H**ydrazine
- **EOA** : Espèces **O**xygénées **A**ctives
- **ERN** : Espèces **R**éactives de l'azote
- **ERO** : Espèces **R**éactives de l'**O**xygène
- **FADH₂/FAD⁺** : Flavine Adénine **D**inucléotide réduite/oxydée
- **Fe³⁺** : Fer Ferrique ou **O**xydé
- **FMN** : Flavines **M**ono Nucléotides
- **GPx** : Glutathion **P**eroxydase
- **GR** : Glutathion **R**eductase
- **GSH** : Glutathion **R**éduit
- **GSH/GSSG** : Glutathion **R**éduit/**O**xydé
- **GSSG** : Glutathion **O**xydé
- **GST** : Glutathion **S**-**T**ransférase.

- **H₂O₂** : Peroxyde d'**H**ydrogène
- **HSP** : **H**eat **S**hock **P**rotein (Protéine de Stress)
- **JATP** : Flux de synthèse d'**A**TP
- **JO₂** : Flux de consommation d'oxygène
- **KDa** : Kilo Dalton
- **LDL** : Lipoprotéines de **D**ensité **L**égère
- **MDA** : **M**alon **D**i **A**ldéhyde
- **Mn** : Manganèse
- **Mn-SOD** : Super **O**xide **D**ismutase associée au **M**anganèse
- **Mrs** : Méthionine sulfoxyde réductase
- **NADH, H⁺/NAD⁺** : Nicotinamide Adénine **D**inucléotide réduit/oxydé
- **NADPH** : Nicotinamide Adénine **D**inucléotide **P**hosphate
- **NADPH, H⁺/NADP⁺** : Nicotinamide Adénine **D**inucléotide **P**hosphat réduit/oxydé
- **NER** : Nucleotide **E**xcision **R**epair
- **NF-κB** : Nuclear **F**actor-**κ****B**
- **NK** : Natural **k**iller (cellule tueuse)
- **NO** : **O**xide Nitrique
- **NO** : **M**on**O**xide d'azote.
- **NO₂** : Nitrique **D**ioxyde.
- **NOS** : **M**ono **O**xide **S**ynthetase
- **O₂** : **O**xigène.
- **O₂^{•-}** : Anion **S**uperoxyde
- **OH⁻** : Ion **H**ydroxyde
- **OH[•]** : **R**adical **H**ydroxyle
- **ONOO⁻** : Peroxynitrite
- **PGE₂** : **P**rosta**G**landines **E****2**
- **pH** : **P**otentiel d'**H**ydrogène
- **PHGPx** : **P**hospholipide-**H**ydroperoxyde **G**lutathion **P**eroxydase
- **Pi** : **P**hosphate inorganique
- **PTP** : **P**ore de **T**ransition de **P**erméabilité
- **Q** : **Q**uinone
- **Rot** : **R**oténone

- **RPE** : **R**ésonance **P**aramagnétique **E**lectronique
- **Se** : Sélénium
- **SOD** : Super **O**xyde **D**ismutase
- **TBARS** : **A**cides **T**hiobarbiturique
- **Th2** : Lymphocyte **Th2**
- **TLR** : **T**o**L**l-like **R**eceptor
- **TRAP** : **T**otal peroxy **R**adical **T**rapping **A**ntioxidant **P**otential
- **Ub** : Ubiquinone
- **UbH[•]** : Ubisemiquinone
- **UbH₂** : Ubiquinol
- **UCP** : **U**n**C**oupling **P**rotein (protéine découplante)
- **VDAC** : **V**oltage **D**ependent **A**nion **C**hannel
- **Vit C** : Vitamine **C**
- **Vit E** : Vitamine **E**.
- **Zn** : **Z**inc

Liste des figures

Liste des figures

Figures	Titre	Page
Fig.1	Stress oxydant	1
Fig.2	Des différents radicaux libres oxygénés espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie	3
Fig.3	Principaux sites cellulaires de productions des ERO	7
Fig.4	La chaîne respiratoire mitochondriale	9
Fig.5	Utilisation de l'énergie (O₂ et ATP) par l'organisme entier en condition De métabolisme basal	12
Fig.6	Phénomène de proton leak	12
Fig.7	Phénomène de redox slipping	13
Fig.8	Phénomène de proton slipping.	14
Fig.9	Sites de production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire.	14
Fig.10	Boucle des quinones et production d'anion super oxyde.	16
Fig.11	Rôles physiologiques des espèces réactives.	18
Fig.12	Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants.	18
Fig.13	Défenses anti oxydantes enzymatiques.	19
Fig.14	Réactions d'élimination des radicaux lipidiques par les vitamines E et C.	22
Fig.15	Cibles biologiques et endommagement oxydatifs induits par les ROS.	22
Fig.16	Représentation simplifiée de la peroxydation lipidique.	23
Fig.17	Types de lésions de l'ADN provoqués par les attaques radicalaires.	25
Fig.18	Production de ROS, ouverture du PTP et apoptose.	26

Fig.19	Rôle immuno modulateur de la vitamine E.	28
Fig.20	Explosion oxydative et production d'HOCl.	29
Fig.21	Mode d'action d'antioxydants.	31
Fig.22	Site d'action de la lutéine.	33
Fig.23	Origine de monoxyde d'azote (NO).	34
Fig.24	Principales circonstances pathologiques s'accompagnant d'un stress oxydant primitif ou secondaire.	38
Fig.25	Principales étapes de formation des AGE.	39
Fig.26	Interactions des AGES avec les RAGEs et la production des ROS.	40
Fig.27	Activation de la voie des polyols comme conséquence de l'hyperglycémie.	41
Fig.28	Production de l'anion super oxyde par la mitochondrie suite à l'hyperglycémie.	43
Fig.29	Théorie radicalaire et autres théories du vieillissement.	45
Fig.30	La double vie des ERO (pléiotropie contradictoire et compromis).	46

Introduction

Introduction :

Une espèce réactive de l'oxygène (Reactive Oxygen Species : ROS) est un radical oxygéné ($O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot}) ou une molécule pouvant produire des radicaux libres (H_2O_2). Ces espèces chimiques très instables et très réactives sont produites d'une manière continue au sein de notre organisme dans le cadre de nombreux phénomènes biologiques. En condition dite "physiologique", la production de ROS reste faible et ne concerne qu'un faible pourcentage de l'oxygène capté par la respiration. Elle est alors indispensable à l'organisme en participant à divers processus vitaux tels que : la transduction de signaux cellulaires, la régulation des gènes et le fonctionnement de certaines enzymes, la défense immunitaire contre les agents pathogènes et la destruction par apoptose de certaines cellules tumorales (**Blandin, 2006**).

Cependant, cette production de ROS peut être amplifiée de façon excessive par différents mécanismes physiopathologiques (inflammation, activité sportive) ou facteurs environnementaux (tabac, alcool, médicament, rayons gamma ou ultra-violets) créant un déséquilibre de la balance pro-oxydant/antioxydant : c'est le stress oxydant. La cellule ne contrôle alors plus cet excès de ROS qui va engendrer de nombreux dégâts cellulaires ; une situation que l'on retrouve dans le processus de vieillissement (théorie radicalaire du vieillissement) et dans la plupart des pathologies humaines (Alzheimer, diabète, cancer, cataracte, parkinson, psoriasis, sida) (**Blandin, 2006**).

Ainsi, ayant besoin d'une certaine quantité de ROS, l'organisme ne cherche pas à éliminer mais à contrôler leur niveau pour éviter ce stress oxydant.

Les ROS sont principalement générés au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Parmi les différents paramètres modulant leur production, la nature des équivalents réduits ($NADH$, H^+ et $FADH_2$) et l'apport en oxygène sont essentiels. Ces équivalents réduits sont fournis par les divers nutriments que nous ingérons, la composition des régimes alimentaires peut donc avoir une répercussion sur la production de ROS. Les concentrations en oxygène inspirées sont elles modifiées par des conditions environnementales comme l'altitude (hypoxie), ou lors de traitement pour certaines pathologies respiratoires (hyperoxie) (**Blandin, 2006**).

On a travaillé sur ce thème afin de mieux prendre une idée concerne les conséquences du stress oxydant sur le système immunitaire.

Ainsi notre travail est scindé en 3 parties :

La première partie visant à expliquer la notion de stress oxydant, la deuxième partie consiste sur l'effet du stress oxydant sur le système immunitaire et en terminera par les pathologies liées aux stress oxydant dans la troisième partie.

Chapitre I

Stress Oxydant

I-1. Définition :

Dans les systèmes biologiques, le stress oxydant est la conséquence d'un déséquilibre entre la production des radicaux libres et la destruction par des systèmes de défenses anti oxydantes (**Fig.1**). Les radicaux libres peuvent engendrer des dommages importants sur la structure et le métabolisme cellulaire en dégradant de nombreuses cibles : protéines, lipides et acide nucléiques. Les radicaux libres sont une forme particulière d'espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un électron célibataire (ou non apparié) (**Angelos et al.,2005**).

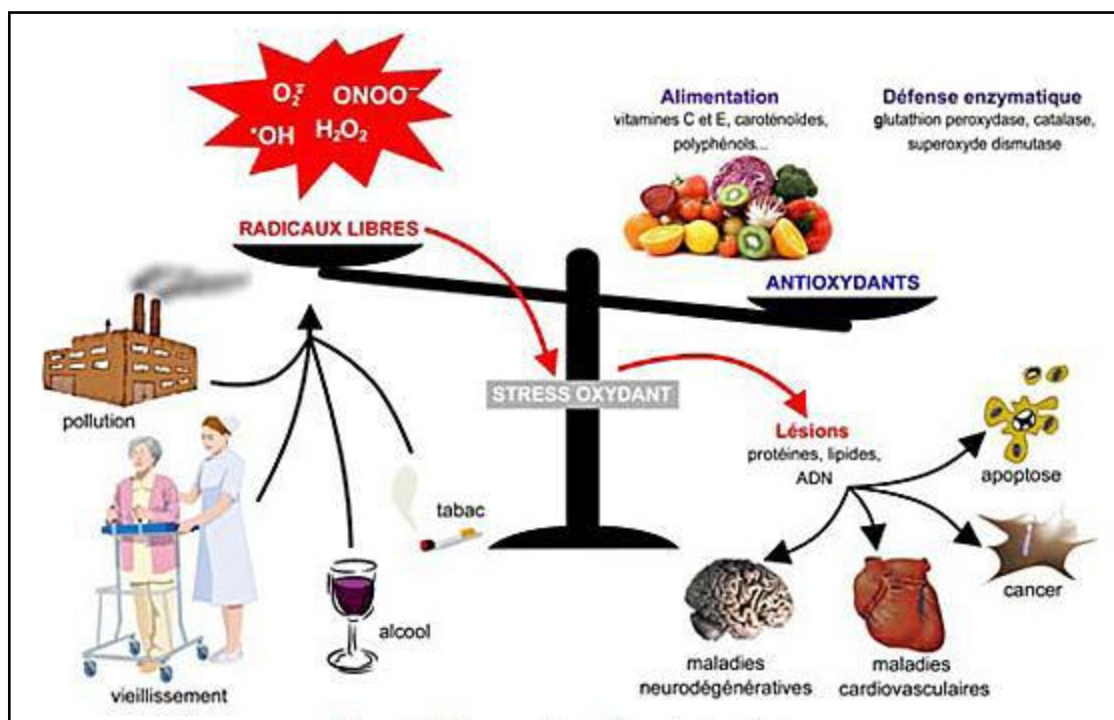


Fig.1 : Stress oxydant (**Durackova, 2008**).

I-2. Les radicaux libres :

I-2-1. Histoire des radicaux libres :

Au milieu des années 50, parmi les premiers, Gerschman montre que l'oxygène molécule pourtant indispensable à la vie, présente également une toxicité pour l'organisme. Inspiré par ces travaux, Harman propose la «free radical theory of ageing»: *via* la production de radicaux libres (entités chimiques très instables et réactionnelles suite à la présence d'un électron libre dans leur structure), l'oxygène est à l'origine du processus de vieillissement cellulaire. En 1969, date clé dans l'histoire du stress oxydant, les Américains Mc Cord et Fridovich isolent à partir de globules rouges

humains un système enzymatique anti oxydant : la super oxyde dismutase (SOD) qui élimine le radical libre anion super oxyde produit par réduction univalente de l'oxygène.

Cette découverte fondamentale montre indirectement que des radicaux libres sont produits dans notre organisme. Ceci est alors le point de départ d'un nombre farouche de recherches sur les sources de production de l'anion super oxyde et sur ses rôles pathologique et physiologique. Toutefois, pendant très longtemps, des doutes sont émis quant à l'existence réelle des radicaux libres et sur leurs effets *in vivo*. Tout au début des années 1990, cette incertitude est levée de façon irréfutable grâce à l'utilisation de la technique de la résonance paramagnétique électronique (RPE) associée au spin trapping (« piègeur de spin ») dans des modèles de stress oxydant *in vivo*. A titre d'exemple, la formation de radicaux libres a été mise en évidence dans le plasma de rats exposés au tétrachlorure de carbone ou de chiens et de lapins dont le cœur ou les reins étaient soumis à des phénomènes d'ischémie – reperfusion. Chez l'homme, démonstration a été faite chez des patients soumis à une angioplastie coronarienne ou à une chirurgie cardiovasculaire sous circulation extracorporelle (**Defraigne et Pincemail, 2007**).

Dans la foulée de la découverte de la SOD, les scientifiques élaborent également de multiples expériences *in vitro* qui montrent la toxicité des radicaux libres responsables de dégâts cellulaires importants via le déclenchement de cassures et de mutations au sein de l'ADN, l'inactivation de diverses enzymes, la modification des structures protéiques, l'oxydation des sucres et l'induction de peroxydation lipidique.

Parallèlement, une des étapes est le développement de marqueurs biologiques pour l'évaluation des dégâts cellulaires engendrés par les EOA. Au milieu des années 70, le test TBARS («thiobarbituric reactive substances») a été développé pour la détection du processus de peroxydation lipidique consécutive à l'interaction des EOA avec les lipides (**Defraigne et Pincemail, 2007**).

De nature simpliste, cette méthode mesure par voie colorimétrique le produit de la réaction de l'acide thiobarbiturique avec la malonaldéhyde (MDA), un sous – produit des lipides oxydés. Toutefois, les très nombreux artéfacts liés à la technique la rendent peu fiable. Ce n'est que vers la fin des années 80 qu'apparaissent d'autres méthodes plus appropriées pour l'évaluation des dommages oxydatifs au niveau des lipides, de l'ADN ou des protéines chez des sujets sains ou des patients. Grâce à l'ensemble de ces méthodes, l'efficacité de molécules à caractère antioxydant scientifiques peut alors être testée *in vivo* dans divers modèles de stress oxydant animaux et humains. Le développement de

nouvelles méthodes (e.g. le dosage des isoprostanes comme marqueur des dommages oxydatifs au niveau des lipides) reste cependant un sujet de préoccupation permanente pour les scientifiques impliqués dans le domaine du stress oxydant (**Defraigne et Pincemail, 2007**).

I-2-2. Différentes formes de radicaux libres de l'oxygène (ERO) :

Un radical libre est une espèce chimique, atome ou molécule, contenant un électron non apparié. Extrêmement instable, ce composé peut réagir avec les molécules les plus stables pour appairier son électron. Il peut soit arracher un électron (se comportant comme un oxydant), soit en céder un (agissant alors comme un réducteur). Cette première réaction conduit généralement à la formation en chaîne de nouveaux radicaux ; ceci explique que la production d'un premier radical libre puisse causer d'importantes lésions dans une cellule (**Fig.02**) (**Durakova, 2008**).

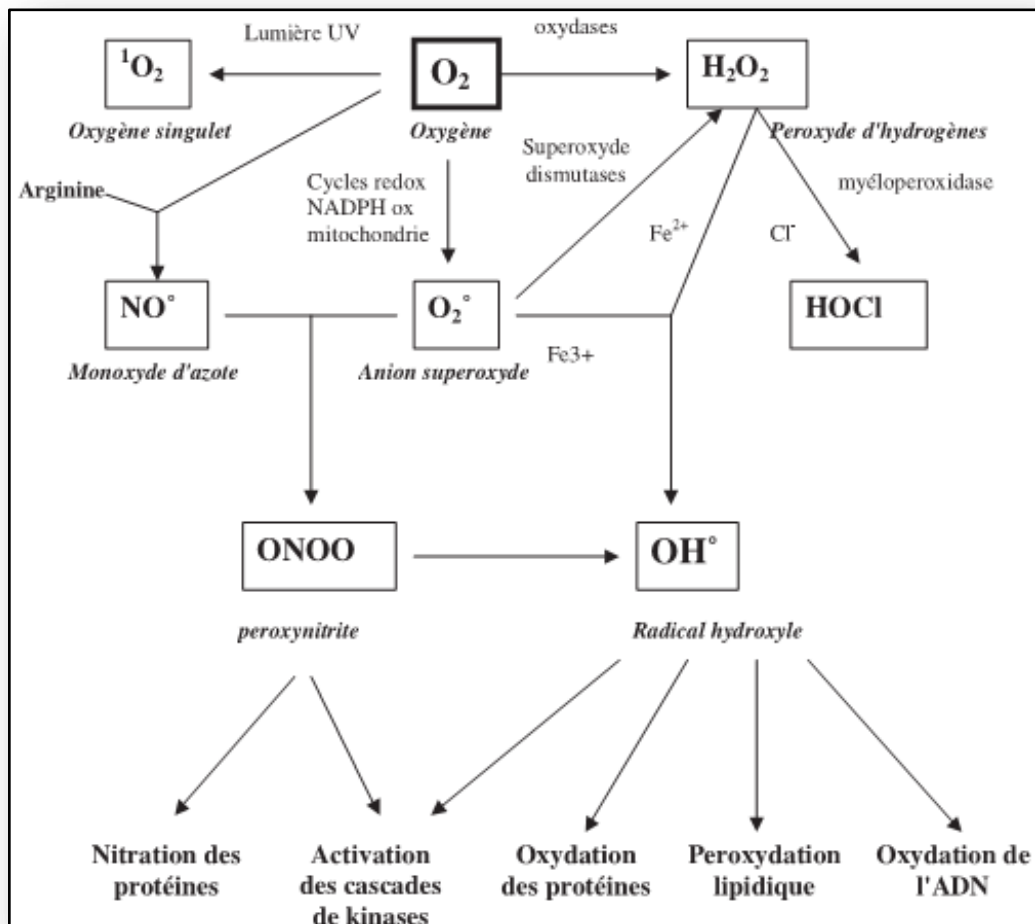
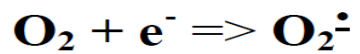


Fig.2 : Origine des différents radicaux libres(ERO) impliqués en biologie (**Favier, 2003**).

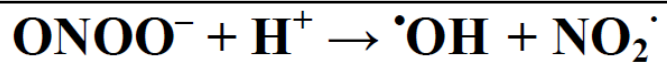
I-2-2-1. Le radical anion super oxyde $O_2^{\cdot-}$:

Est la forme réduite de l'oxygène moléculaire par la réception d'un électron, c'est le premier radical formé lors du transport des électrons au niveau de la chaîne respiratoire. La principale source est l'explosion oxydative des cellules phagocytaires entrées en contact avec des antigènes ou des immun-complexes. Les cellules phagocytaires connues pour produire le radical super oxyde sont les polynucléaires neutrophiles, les polynucléaires éosinophiles, les monocytes et les macrophages (**Harman, 2000**).



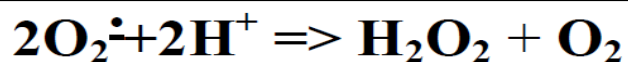
L'anion super oxyde $O_2^{\cdot-}$ joue un rôle très important dans la génération de d'autre radicaux libres tels que Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , le radical hydroxyle $\cdot OH$, et l'oxygène singulet O_2^{\cdot} (**Stief, 2003**).

L'anion super oxyde capable de réagir avec l'oxyde nitrique pour former le peroxynitrite ($ONOO^-$) qui est capable de donner par la suite des composés très toxiques comme le radical hydroxyle et le dioxyde nitrique (**Stief, 2003**).

**I-2-2-2. Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 :**

Il n'a pas d'électrons non appariés et n'est donc pas un radical. A pH physiologique, tout ion peroxyde formé va se protoner pour donner immédiatement du peroxyde d'hydrogène.

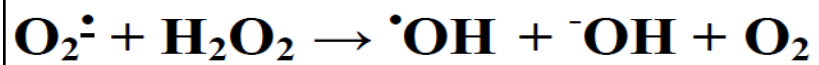
Au bilan, le peroxyde d'hydrogène est produit à partir du radical super oxyde en solution aqueuse. Cet ion provoque la dismutation de l'eau pour former du peroxyde d'hydrogène. Cet ion provoque la dismutation de l'eau pour former du peroxyde d'hydrogène et du dioxygène. Cette réaction est catalysée par le super oxyde dismutase (**Vergely et al., 2003**).



Le peroxyde d'hydrogène est un produit plus stable que les produits qui lui donnent naissance, ainsi sa réactivité est moins importante. La nature non ionique de cette molécule lui permet de traverser facilement les membranes cellulaires et ainsi de diffuser très facilement d'où une possibilité d'action à distance. Malgré une réactivité moins importante, le peroxyde d'hydrogène est un oxydant très puissant. Grâce à la myelo peroxydase des polynucléaires neutrophiles, le peroxyde d'hydrogène est couplé à un ion chlorure pour donner l'hypochlorite, un agent bactéricide (Stief, 2000; 2003).

I-2-2-3. Le radical hydroxyle $\cdot\text{OH}$:

Est le radical le plus dangereux dans l'organisme, il est formé de la réaction de l'anion super oxyde avec l'hydrogène peroxyde.



Ainsi la fission homolytique de la liaison O-O du peroxyde d'hydrogène donne deux radicaux hydroxyles. Cette fission peut être causée par la chaleur ou par des radiations ionisantes. Cependant, une solution de peroxyde d'hydrogène avec des ions ferreux suffit à fournir des radicaux hydroxyles. Cette réaction fut observée pour la première fois par Fenton en 1894 (Vergely *et al.*, 2003).



Le radical Hydroxyle réagit avec les lipides, polypeptides, protéines, et ADN, spécifiquement la thiamine et la guanosine (Ashok et Ali, 1999).

I-2-2-4. Oxyde nitrique NO :

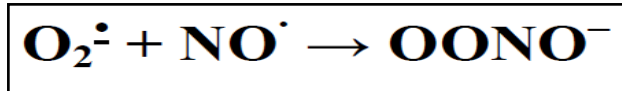
Est un radical avec un électron non apparié, il est formé par l'action du NO synthétase sur L-arginine L'oxyde nitrique lui-même moins réactif que les autres radicaux libres, mais sa surproduction dans des conditions spécifiques capable de provoquer la déplétion des principaux antioxydants au niveau du plasma, tels que l'acide ascorbique et l'acide urique et capable d'entamer le lipide peroxydation (Fang *et al.*, 2002).

I-2-2-5.Nitrique dioxyde NO₂' :

Formé à partir de la réaction du radical peroxyde avec NO. Le nitrique dioxyde est un puissant déclencheur du lipide peroxydation par sa capacité d'arracher un atome d'hydrogène d'une double liaison au niveau des acides gras polyinsaturés (Stief, 2003).

I-2-2-6.Peroxynitrite OONO⁻ :

La réaction du NO avec anion super oxyde donne naissance au peroxynitrite (Wiernsperger, 2003).



Le Peroxynitrite est un dérivés d'oxygène très toxique provoque des lésions tissulaires très graves en plus de l'oxydation des LDL. Peroxynitrite apparait comme l'espèce le plus toxique pour les tissus au niveau des sites de l'inflammation et participe dans plusieurs désordres neurodégénératif et des lésions rénales (Wiernsperger, 2003).

Le peroxynitrite (OONO⁻) est capable d'oxyder les protéines et les bases azotiques des brins d'ADN par une grande similarité de l'oxydation par le radical hydroxyle (Knight, 2001).

I-2-3.Origines des ERO :

La notion de "radicaux libres", de "stress oxydant" et d' "antioxydants" est de plus en plus souvent utilisée pour expliquer différentes atteintes pathologiques et leurs approches thérapeutiques. On appelle radical libre toute molécule qui contient un ou plusieurs électrons libres (célibataires) la rendant très réactive. A l'état naturel, l'oxygène, qui comporte naturellement deux électrons célibataires sur la couche périphérique, est très instable avec une forte tendance à oxyder tout les composants qu'il rencontre en leur arrachant un électron pour l'apparier à l'un de ses électrons célibataires (Traxer, 2003).

L'oxygène moléculaire, apparu voici 3 milliards d'années dans l'atmosphère terrestre, est le deuxième élément le plus abondant de la biosphère. Principalement formé lors de photosynthèse, c'est un carburant indispensable à la vie des cellules aérobies

L'oxygène, en tant que récepteur final d'électrons dans l'organisme, se transforme en molécule d'eau au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette réaction est importante puisqu'elle est associée à la production de 38 molécules d'adénosine

triphosphate (ATP) à haut potentiel énergétique à partir d'une molécule de glucose (contre deux seulement dans un processus anaérobie). Mais tous les organismes aérobies paient le prix de ces avantages métaboliques (Traxer, 2003).

En effet, les cellules convertissent 3 % de la quantité totale d'oxygène consommée en espèces réactives de l'oxygène (notées ERO). Les ERO sont majoritaires mais des radicaux soufrés, nitrogènes, phosphorés ou carbonés sont également formés. Ces ERO qui peuvent être radicalaires ou non radicalaires, sont aussi produites en permanence par différents systèmes enzymatiques dont les plus importants sont les NAD(P) H oxydase et les NO synthase (Fig.3) (Traxer, 2003).

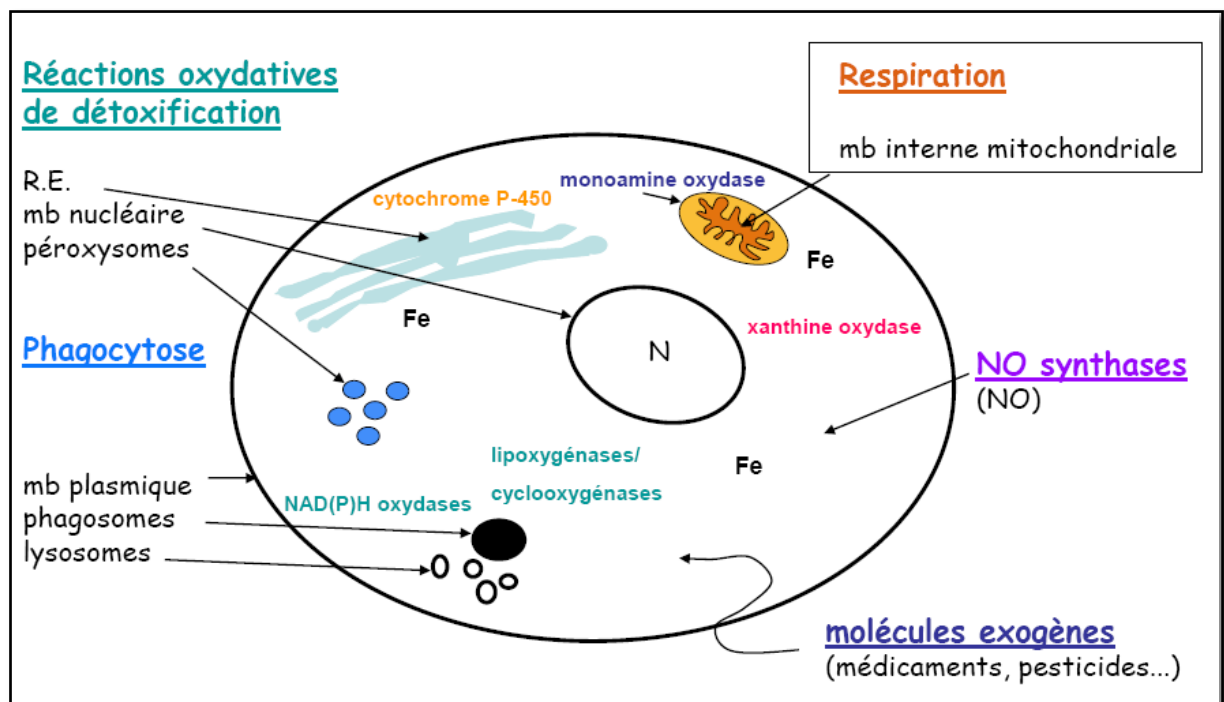


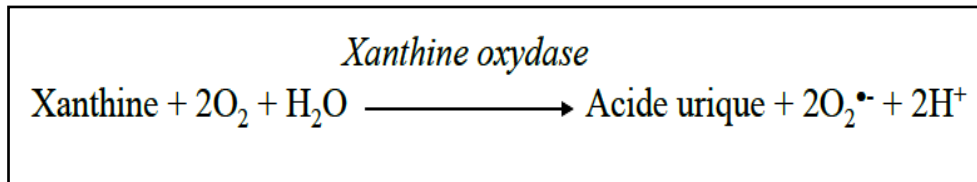
Fig.3 : Principaux sites cellulaires de productions des ERO (Traxer, 2003).

I-2-3-1. Principale source des radicaux libres : la mitochondrie

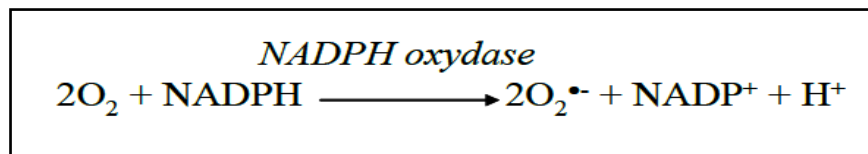
Dans l'organisme, il existe de nombreuses sources de ROS parmi lesquelles l'auto oxydation des petites molécules, la xanthine oxydase et la NADPH oxydase, le réticulum endoplasmique, les peroxyssomes.

L'auto-oxydation de molécules telles que la dopamine, l'adrénaline, les flavines et les hydroquinones est une importante source de ROS. Le produit direct de ces auto-oxydations est souvent l' $O_2^{\cdot-}$. Ainsi, l'auto-oxydation de la dopamine est en partie impliquée dans le processus apoptotique lors de pathologies neurodégénératives notamment lors de la maladie de Parkinson (Thannickal et Fanburg, 2000).

La xanthine oxydase catalyse la dégradation de l'hypo xanthine en acide urique en condition de forte demande d'ATP et de déficit en oxygène. Mais elle peut également catalyser l'oxydation de la xanthine en acide urique, notamment lors d'ischémie-reperfusion ou d'hypoxie. Dans cette réaction, l'oxygène moléculaire agit comme un accepteur d'électron produisant ainsi l' $O_2^{\bullet -}$ (Thannickal et Fanburg, 2000).



La NADPH oxydase joue un rôle fondamental dans la réponse immunitaire et plus précisément dans la lutte contre les micro-organismes. En effet, lors de la phagocytose, cette enzyme présente dans la membrane plasmique des phagocytes, catalyse la formation d' $O_2^{\bullet -}$. Il existe aussi une NADPH oxydase dans des cellules non phagocytaires dont le rôle serait de réguler la croissance cellulaire (Krause, 2004).



Le réticulum endoplasmique lisse contient des enzymes qui catalysent une série de réactions pour détoxifier les molécules liposolubles et d'autres produits métaboliques toxiques. La plus connue de ces enzymes est le cytochrome P450 qui oxyde les acides gras insaturés et les xénobiotiques, produisant ainsi des ROS. Il semble que cette production radicalaire régule certaines fonctions du réticulum (Morel *et al.*, 1999).

Les peroxysomes sont une importante source de production d' H_2O_2 cellulaire. Toutefois, l' H_2O_2 est utilisé comme substrat de la catalase peroxysomale (enzyme anti oxydante) afin de réaliser des réactions de peroxydation d'autres substrats. Ces réactions sont importantes dans le processus de détoxification présent dans le foie et le rein. Seule une faible quantité d' H_2O_2 produit au niveau du peroxysome pourrait échapper à la catalase (Morel *et al.*, 1999).

Cependant, la principale source de ROS est la mitochondrie par l'intermédiaire de sa chaîne respiratoire. Elle produirait en effet 90% des ROS cellulaires (Balaban *et al.*, 2005).

➤ **Chaîne respiratoire mitochondriale :**

Les mitochondries sont les organites responsables de la plus grande partie de la production de l'énergie (sous forme d'ATP) nécessaire au fonctionnement cellulaire. Elles possèdent deux membranes délimitant un espace inter-membranaire et un compartiment matriciel. La membrane externe, formée de 50% de protéines et 50% de lipides polaires, est perméable aux ions et aux petites molécules grâce entre autres à l'existence de porines.

La membrane interne, quant à elle, est imperméable car elle est constituée pour 80% de protéines et 20% de lipides (Mitchell, 2000).

La membrane interne est le siège de la respiration qui correspond à un transfert d'électrons à travers la chaîne respiratoire jusqu'à un accepteur final : l'oxygène. Ces électrons proviennent des équivalents réduits NADH, H^+ et FADH_2 issus du catabolisme des nutriments (lipides, glucides). A ce flux d'électrons est associé un transfert actif de protons de la matrice vers l'espace inter-membranaire générant une force, la force protomotrice (Mitchell, 2000).

La phosphorylation oxydative est le processus de couplage entre le transfert d'électrons (oxydation) et la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique P_i (phosphorylation). Ce couplage n'est pas direct mais fait intervenir un intermédiaire énergétique, la force protomotrice qui est utilisée par l'ATP synthase (Mitchell, 2000).

La chaîne respiratoire est constituée de 4 complexes dont 3 s'avèrent être des pompes à protons (Fig. 4).

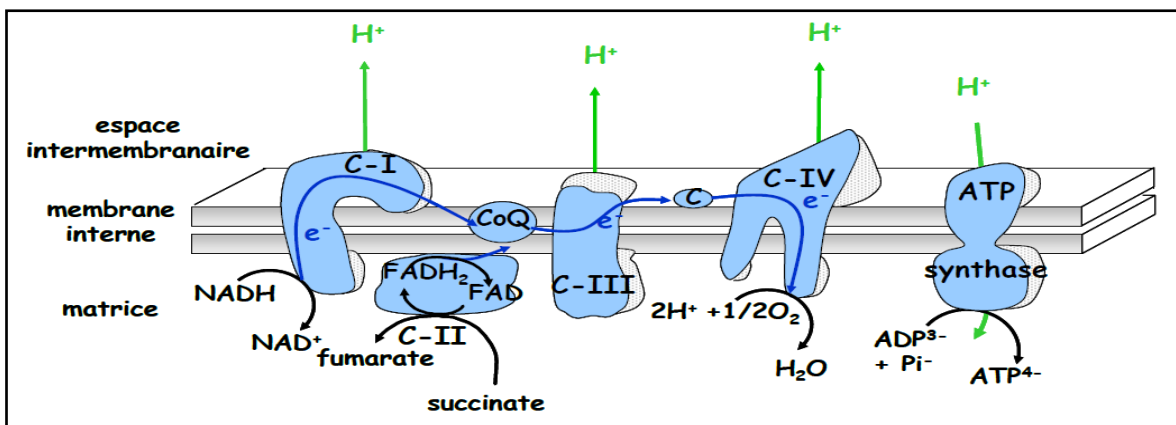


Fig.4 : la chaîne respiratoire mitochondriale (Dimaura et Schon, 2003).

- **Complexe I** : NADH ubiquinone oxydoréductase

Le complexe I est le plus gros composant protéique de la membrane interne de la mitochondrie : il possède 46 sous-unités dont 7 sont codées par l'ADN mitochondrial et 39 par l'ADN nucléaire. Sa masse moléculaire est d'environ 750 kDa.

L'oxydation du coenzyme NADH, H⁺ qui a lieu sur la face matricielle de la membrane par la NADH-déshydrogénase produit 2 électrons qui sont transférés jusqu'à l'ubiquinone (CoQ). Le complexe I est la première pompe à proton de la chaîne respiratoire (**Dimaura et Schon, 2003**).

- **Complexe II** : Succinate-deshydrogénase

Le complexe II catalyse la ré-oxydation du succinate en fumarate qui, par l'intermédiaire de l'oxydation du FADH₂ et de la réduction d'ubiquinone, permet le transfert de 2 électrons au complexe III (complexe b-c1). Ce transfert d'électrons est le seul à ne pas être couplé à un efflux de protons (**Dimaura et Schon, 2003**).

- **Complexe III** : Complexe b-c1 (ubiquinone-cytochrome c réductase)

Le pool des quinones est un transporteur libre d'électrons des complexes I et II vers le complexe III. Ce dernier permet un transfert d'électrons à un deuxième transporteur mobile situé dans l'espace inter membranaire, le cytochrome c qui relie le complexe III au complexe IV. Ce transfert d'électrons, également associé à un efflux de protons, fait du complexe III la deuxième pompe à protons de la chaîne respiratoire (**Dimaura et Schon, 2003**).

- **Complexe IV** : cytochrome c oxydase

Le complexe IV catalyse la dernière réaction d'oxydoréduction entre le cytochrome c et l'O₂ qui est réduit en H₂O par 4 électrons. Ce transfert d'électrons est irréversible, contrairement à celui qui a lieu dans les complexes I, II et III mais est aussi associé à un efflux de protons faisant de ce complexe le dernier site de couplage de la mitochondrie.

L'oxydation phosphorylante est le couplage entre la respiration mitochondriale et la production d'ATP. Ainsi, l'ATP synthase est parfois considérée comme le 5ème complexe de la chaîne respiratoire (**Dimaura et Schon, 2003**).

- **ATP synthase** :

L'ATP synthase associe la diffusion facilitée des protons à la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de Pi. Le site catalytique est appelé F1 et la sous-unité Fo est constituée d'un

canal de protons. Ce complexe enzymatique permet la conversion de la différence de potentiel électrochimique en énergie chimique (ATP) au travers d'un processus réversible (Dimauro et Schon, 2003).

➤ **Rendement de l'oxydation phosphorylante :**

Les équivalents réduits, NADH,H^+ et FADH_2 sont respectivement oxydés au niveau des complexes I et II de la chaîne respiratoire. Court-circuitant le complexe I, le nombre de protons expulsés par molécule d'oxygène durant l'oxydation du FADH_2 est plus faible que celui de l'oxydation du NADH,H^+ . Ainsi, le rendement de l'oxydation phosphorylante, qui peut être mesuré par le rapport entre les flux d'ATP et d'oxygène (JATP/JO) est plus faible avec FADH_2 qu'avec NADH,H^+ . De ce fait, la différence essentielle entre le catabolisme du glucose et celui des acides gras tient à la proportion relative des équivalents réduits fournis à la chaîne respiratoire : le rapport NADH,H^+ sur FADH_2 est respectivement de 4 lors de l'oxydation du glucose et de 2 pour celle des acides gras. Cette différence est donc à l'origine de la perte de rendement de l'oxydation phosphorylante pour les acides gras.

D'après leur étude en 1955, Chance & Williams concluent que le premier facteur du contrôle de l'oxydation phosphorylante est la concentration d'ADP extra-mitochondriale (Rolfe et Brown, 1997).

En effet, ils observent une relation hyperbolique entre le niveau de respiration mitochondriale et cette concentration en ADP. Ceci implique que l'adénine nucléotide translocase (ANT), qui permet la sortie de l'ATP et l'entrée de l'ADP dans la mitochondrie, contribue également à la régulation de la respiration. Toutefois, l'ADP extra-mitochondriale n'est pas le seul paramètre contrôlant l'oxydation phosphorylante. En effet, d'autres facteurs jouent des rôles déterminants : 1°) la concentration extra-mitochondriale en phosphate inorganique (Pi), 2°) l'approvisionnement en H^+ , fourni par les différents substrats et 3°) l'activité du cytochrome c oxydase (complexe IV) Dans les conditions de métabolisme basal, 90% de l' O_2 est consommé au niveau de la mitochondrie. De cette consommation mitochondriale, 80% sont utilisés pour la synthèse d'ATP et 20% lors de la fuite de protons (Fig.5) (Rolfe et Brown, 1997).

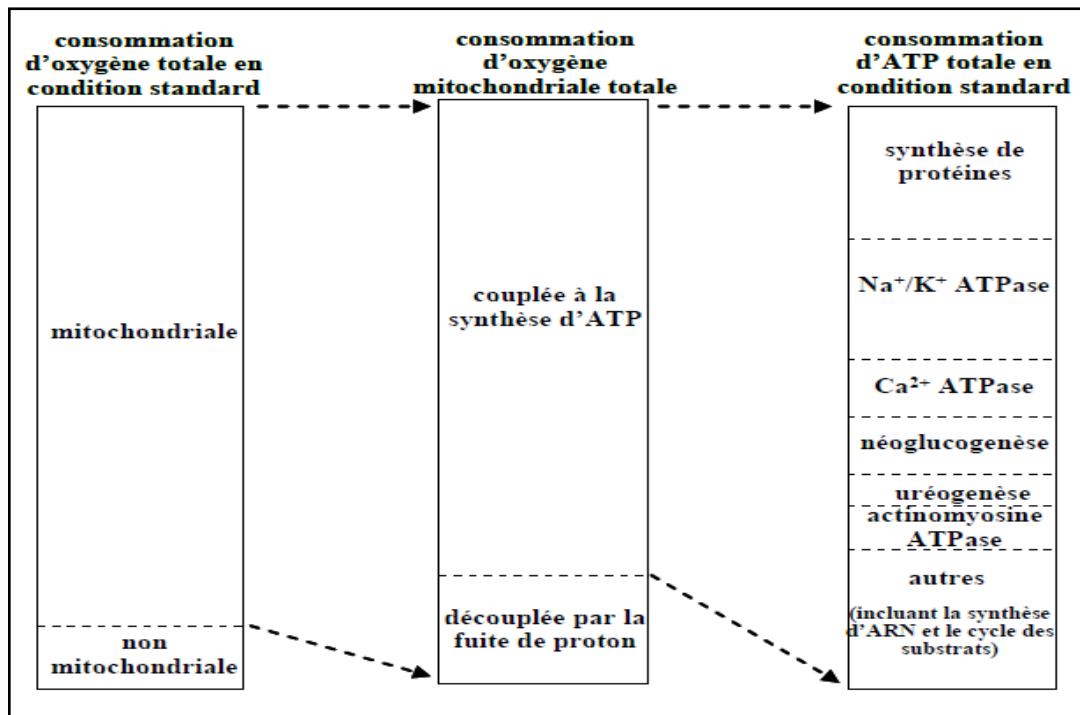


Fig.5 : Utilisation de l'énergie (O₂ et ATP) par l'organisme entier en condition De métabolisme basal. (Rolfé et Brown, 1997).

La fuite de protons est caractérisée par le retour passif de protons dans la matrice (proton leak) et ceci sans passer par l'ATP synthase donc sans générer d'ATP. Ces fuites membranaires diminuent la force protomotrice et induisent une baisse de l'efficacité de l'oxydation phosphorylante (Fig.6) (Murphy, 1999).

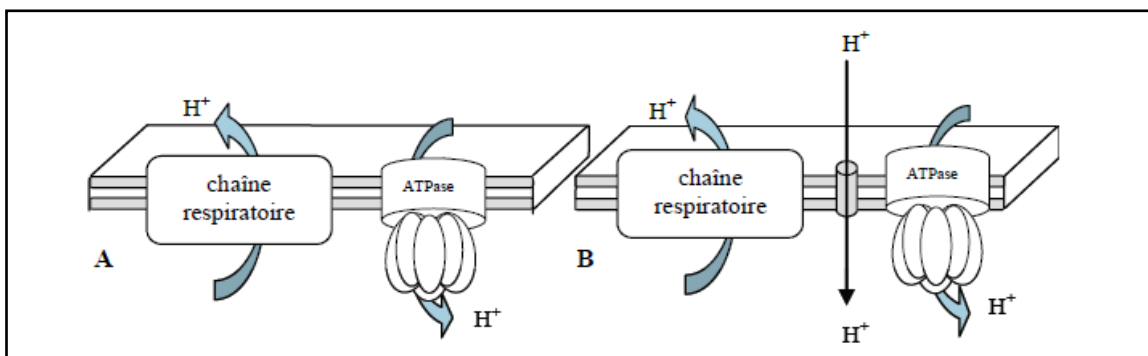


Fig.6 : Phénomène de proton leak (Murphy, 1999).

(A) La membrane est totalement imperméable aux protons, tout proton sortant est utilisé pour effectuer un travail (cas idéal).

(B) La membrane n'est pas totalement imperméable, certains protons regagnent la matrice sans générer de synthèse d'ATP.

En présence d'ADP (état 3), l'ATP produit par la mitochondrie est utilisé au cours de différents mécanismes cellulaires tels que la synthèse de protéine, le fonctionnement des

pompes Na^+/K^+ -ATPase et Ca^{2+} -ATPase, lors de la néoglucogenèse ou pour la contraction musculaire avec l'actinomyosine-ATPase, etc... (Rolfe et Brown, 1997).

En absence d'ADP (état 4), les mitochondries continuent de consommer de l'oxygène afin de maintenir un potentiel de membrane maximum de 220 mV. Dans ces conditions de métabolisme basal, la fuite de protons compte pour 25% de la consommation d'oxygène dans les hépatocytes isolés et 50% dans le muscle perfusé. Lorsque la demande en ATP augmente (état 3), la fuite de protons diminue et ne représente plus que 20% de la consommation d'oxygène dans les hépatocytes et 35% dans le muscle (Rolfe *et al.*, 1997).

Il existe également une perte d'efficacité intrinsèque aux pompes à protons due à un découplage partiel et variable des réactions chimiques (transfert d'électrons ou synthèse d'ATP) et du transport de protons, appelée slipping. Soit le transfert d'électrons n'est plus couplé à l'éjection de protons, ce qui entraîne une diminution de la stoechiométrie H^+/O au niveau de la chaîne respiratoire ; on parle alors de redox slipping (Fig.7) (Murphy, 1999).

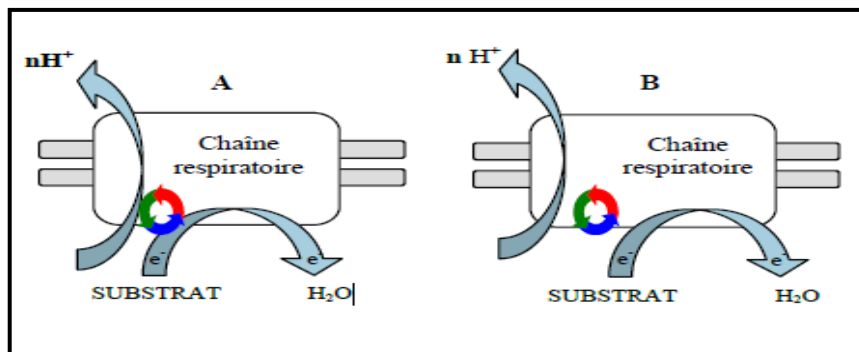


Fig.7 : Phénomène de redox slipping (Murphy, 1999).

(A) Les pompes à protons fonctionnent normalement

(B) Travers la chaîne respiratoire est couplé à 'expulsion de protons

Soit l'entrée de protons dans la matrice n'est plus couplée à la synthèse d'ATP, conduisant ainsi en une augmentation de la stoechiométrie H^+/ATP ; on parle alors de proton slipping (Fig.8) (Murphy, 1999).

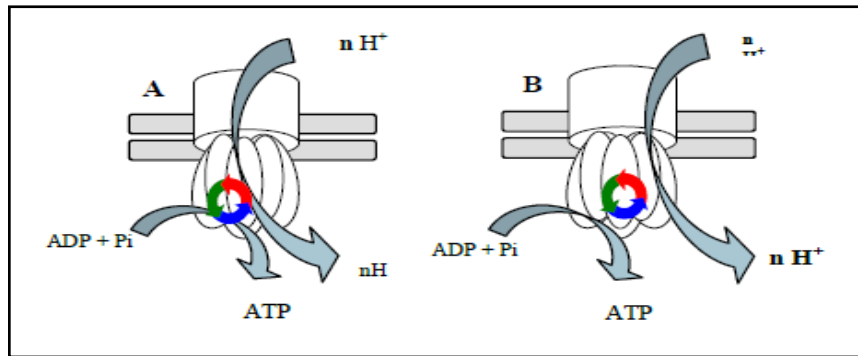


Fig.8 : Phénomène de proton slipping (Murphy, 1999).

I-2-3-4. La production de ROS :

La chaîne respiratoire est une source permanente de ROS. Selon certains auteurs, environ 1 à 3% de l'oxygène utilisés par la mitochondrie sont incomplètement réduits et produisent des ROS. Mais ces estimations sont réalisées à partir de mesure *in vitro* sur des mitochondries isolées en présence d'une pression partielle en oxygène non physiologique et de concentration saturante en substrats. Il est vraisemblable que la production mitochondriale de ROS *in vivo* soit beaucoup plus faible (0,4 à 0,8%) (Hansford *et al.*, 1997).

Il existe deux sites de production de ROS : les complexes I et III (Fig.9).

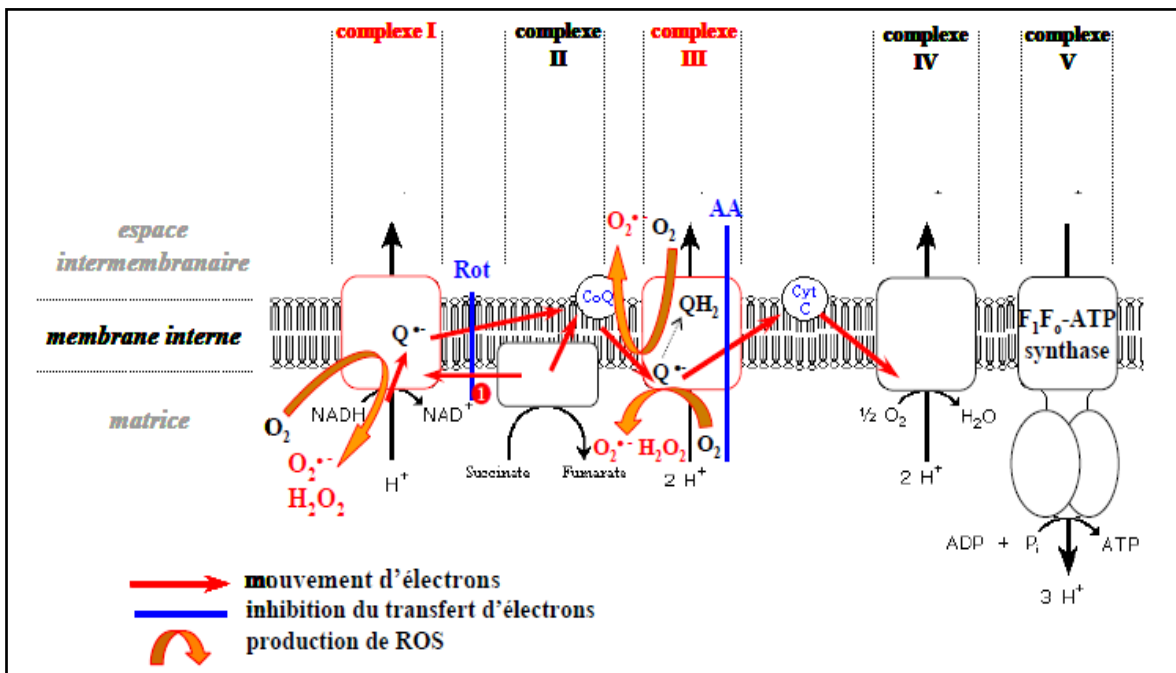


Fig.9 : Sites de production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire (Hansford *et al.*,1997).

Deux sites de production d'O₂^{•-} sont reconnus : le complexe I et le complexe III. L'utilisation de la roténone (Rot) et de l'anti mucine A (AA) a permis de localiser la production de ROS au niveau de ces complexes et de mettre en évidence le flux inverse d'électrons remontant du complexe II au complexe I.

Le complexe III a longtemps été considéré comme le plus important site de production d'O₂^{•-} et le complexe I comme un acteur secondaire. Cependant, ces premières études utilisaient comme substrat respiratoire du succinate (fournisseur de FADH₂) combiné à de la roténone (inhibiteur du complexe I). Or, en ajoutant successivement le succinate puis la roténone, de récentes mesures ont permis de mettre en évidence l'existence d'un flux inverse d'électrons. Ce flux d'électrons issus de l'oxydation du FADH₂ remonte du complexe II vers le complexe I atteignant ainsi le site de production de ROS du complexe I. Il a alors été clairement défini que la source majeure de ROS était le complexe I *via* ce flux inverse d'électron. Ce flux d'électrons entraîne également la réduction du NAD⁺ en NADH (Liu *et al.*, 2002).

Ceci implique que la production de ROS est directement dépendante des équivalents réduits fournis aux mitochondries. La quantité d'H₂O₂ produite en présence de substrat fournissant du FADH₂ au complexe II (succinate, flux inverse d'e⁻) est en effet plus importante qu'avec des substrats fournissant du NADH, H⁺ au complexe I (glutamate/malate ou pyruvate/malate, flux normal d'e⁻). Concernant la production de ROS liée au flux normal d'électrons, elle est plus élevée avec du glutamate/malate qu'avec du pyruvate/malate bien que ces deux substrats fournissent du NADH, H⁺. Cette différence pourrait s'expliquer par les propriétés anti oxydantes du pyruvate (Sanz *et al.*, 2004).

A ce jour, le site exact de la production de ROS du complexe I reste encore controversé. Trois hypothèses sont émises : cette production aurait lieu au niveau 1°) des quinones (Q), 2°) du groupe des flavines mono nucléotides (FMN) ou 3°) du groupe fer-soufre [Fe/S]. Comme ces trois structures sont très proches les unes des autres et interagissent les unes avec les autres, il est difficile de dire laquelle intervient spécifiquement dans la production de ROS. (Liu *et al.*, 2002).



La production de ROS au niveau du complexe III, quant à elle, résulte de la réduction partielle de l'ubiquinone. L'électron libre provenant du transfert à travers la chaîne respiratoire s'apparie avec l'ubiquinone (Ub) formant le radical semi-ubiquinone (UbH[•]) qui est instable. Un deuxième électron est donc nécessaire pour le stabiliser et permettre le transfert de proton grâce à l'intermédiaire ubiquinol (UbH₂) (Fig.10.A).

Toutefois, il existe une probabilité pour que le radical semi-ubiquinone rencontre une molécule d'oxygène avant d'être stabilisé par le deuxième électron. La molécule d'oxygène va alors capter l'électron libre générant ainsi un anion super oxyde (**Fig.10. B**) (**Turrens, 2003**).

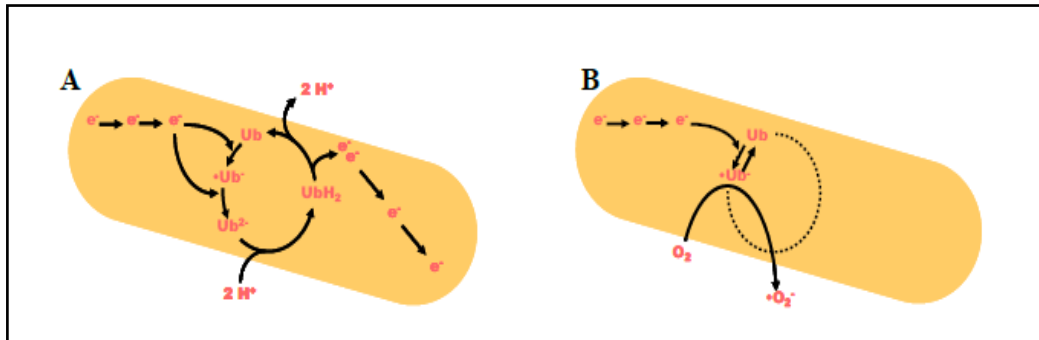


Fig.10 : boucle des quinones et production d'anion superoxyde (**Turrens, 2003**).

(A) Deux électrons sont nécessaires pour réduire l'ubiquinone (Ub) en ubiquinol (UbH₂) et permettre le transfert de proton .

(B) L'électron libre du semi-ubiquinone (UbH[•]) peut être capté par une molécule d'oxygène générant ainsi un anion super oxyde .

La production de ROS au niveau du complexe I a lieu uniquement dans la matrice alors que la production au niveau du complexe III a lieu dans l'espace matricielle ainsi que dans l'espace inter membranaire (Fig.9). L'O₂⁻ généré dans la matrice est éliminé dans ce compartiment par le super oxyde dimustase mitochondriale (Mn-SOD), l'H₂O₂ alors produit peut diffuser rapidement à travers la membrane jusqu'au cytoplasme. L'O₂⁻ produit dans l'espace intermembranaire est soit : 1°) transformé par l'enzyme anti oxydante super oxyde dismutase cytoplasmique (Cu/Zn-SOD, 2°) détoxifié par le cytochrome c, ou 3°) transféré dans le cytoplasme *via* un canal voltage dépendant (VDAC : Voltage Dépendent Anion Channels), l'O₂⁻ est alors pris en charge par la Cu/Zn-SOD (**Han et al., 2003**).

Puisque la consommation basale d'oxygène (état 4) est associée à un potentiel de membrane élevé et donc à un état plus réduit des transporteurs d'électrons, la production de ROS dans ces conditions est la plus importante. Par contre, elle est drastiquement diminuée en condition d'oxydation phosphorylante (état 3, après ajout d'ADP). En effet, la présence d'ADP, stimulant la respiration, augmente l'oxydation des transporteurs d'électrons et ainsi diminue fortement le flux d'électrons s'échappant de la chaîne respiratoire pour réduire l'O₂ en O₂⁻ (**Brand et al., 2003**).

Nous avons vu que l'imperméabilité de la membrane interne n'est pas absolue ce qui permet à une faible quantité de protons de retourner dans la matrice mitochondriale (proton leak). Certains auteurs avancent une hypothèse selon laquelle cette fuite de protons régulerait la production de ROS (hypothèse d'un "découplage modéré"). La composition lipidique de la membrane est un élément capital de la perméabilité aux protons : un faible degré d'insaturation est associé à une faible fuite de protons, et inversement. Mais en plus de cette perméabilité intrinsèque, il existe une perméabilité inductible par des protéines découplantes enchâssées dans la membrane mitochondriale (**Brand et al., 2003**).

Ces protéines (uncoupling protein, UCP) permettent, par leur fonction de transporteurs de protons, la dissipation de l'énergie liée au potentiel électrochimique. Si l'UCP1, protéine découplante du tissu adipeux brun, participe aux processus de thermogénèse, ses homologues (UCP2, UCP3) semblent, quant à eux, jouer un rôle dans le contrôle de la production de ROS. En effet, observent dans les tissus exprimant fortement UCP2 (rate, thymus) une faible production d'H₂O₂. De plus, l'inhibition d'UCP2 dans ces tissus entraîne une augmentation de la quantité d'H₂O₂ produite. Enfin, l'invalidation des gènes UCP2 et UCP3 dans des modèles de souris transgéniques confirment qu'un défaut d'expression de ces protéines découplantes s'accompagne d'une augmentation de la production de ROS (**Vidal et al., 2000**).

I-2-4. Rôles des espèces réactives dans des situations physiologiques :

Du fait de l'importance de l'oxygène dans les systèmes biologiques, en situation physiologique, les espèces réactives sont créées en continu dans l'organisme. Ainsi, les radicaux libres générés de façon permanente par le métabolisme normal de l'oxygène, ne sont pas seulement des produits agressifs mais aussi des modulateurs de voies de transduction du signal et de l'expression de gènes qui participent à l'homéostasie vasculaire. Ils jouent le rôle de messenger pour la cellule, dans l'apoptose et dans la défense contre les infections (**Human et Aging, 2002**). L'anion super oxyde O₂⁻, produit dans la chaîne respiratoire des mitochondries ou durant la phagocytose, est nécessaire à la performance de la réponse immunitaire ; par exemple, un déficit de sa production peut déterminer la survenue de la granulomatose septique chronique caractérisée par l'incapacité de l'organisme à lutter contre l'agression d'agents microbiens pyogènes.

L'oxyde nitrique (NO) joue un rôle important en établissant le tonus vasculaire et en modulant la réponse inflammatoire (**Fig.11**) (**Lehucher et al., 2001**).

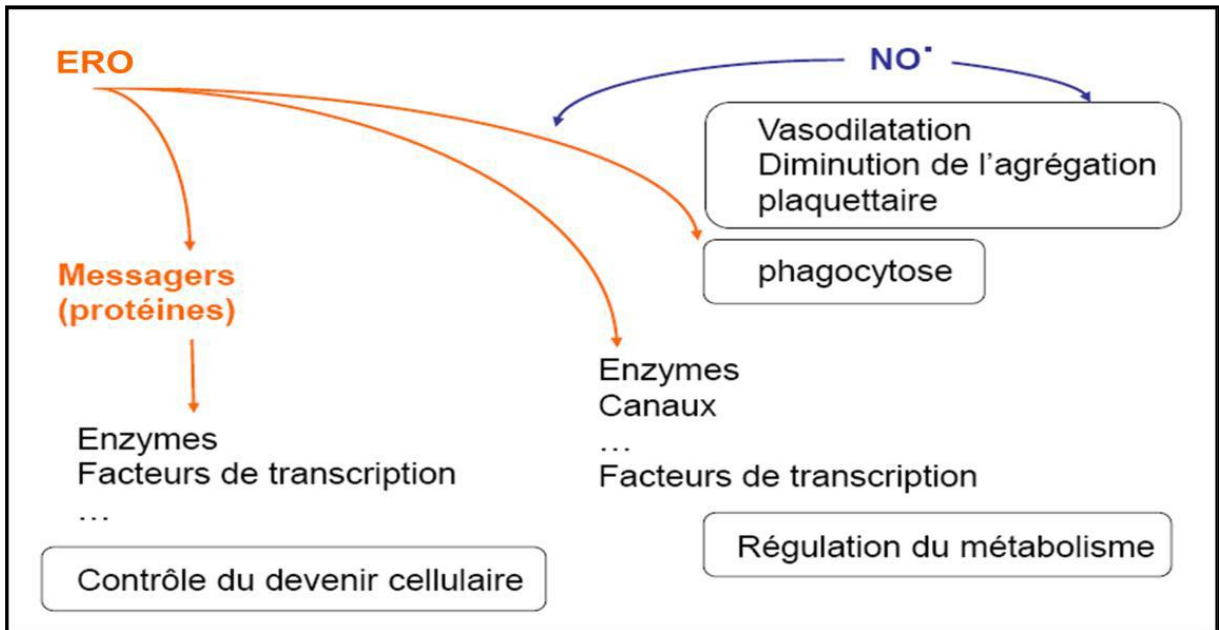


Fig.11 : Rôles physiologiques des espèces réactives (Beaudeau *et al.*, 2006).

I-3. Système anti oxydant :

Les radicaux libres sont produits spontanément et de manière continue au sein de notre organisme (Fig.12).

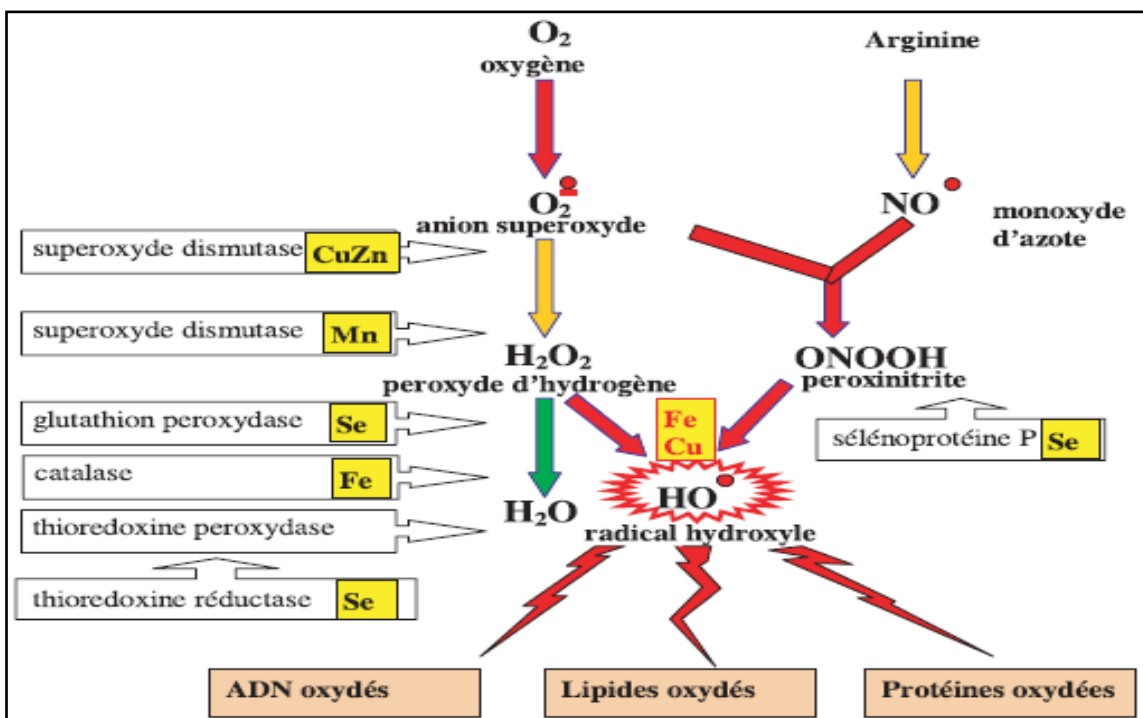


Fig.12 : Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants (Favier, 2003).

Le maintien d'un niveau non cytotoxique de ROS est assuré par des systèmes antioxydants. Un déficit ou un dysfonctionnement de ces systèmes engendre une

augmentation des dommages tissulaires. Les antioxydants sont des systèmes enzymatiques ou non-enzymatiques (Dröge, 2002).

I-3-1. Systèmes antioxydants enzymatiques :

Les antioxydants enzymatiques (la super oxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase et la glutathion réductase) sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les ROS (Fig.13) (Huang *et al.*, 2001).

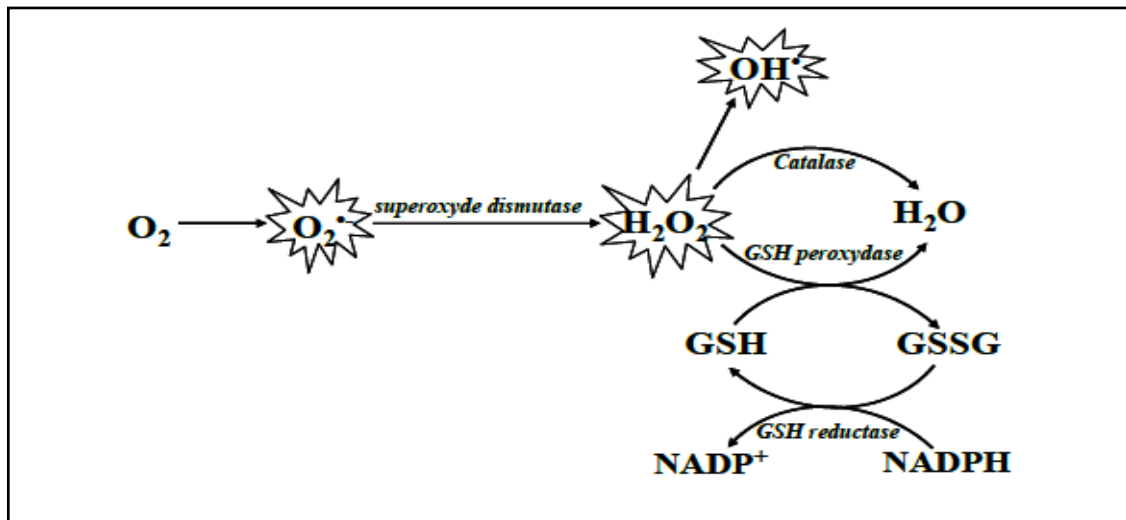


Fig.13 : Défenses anti oxydantes enzymatiques (Huang *et al.*, 2001).

➤ Super oxyde dismutase (SOD) :

Cette enzyme catalyse la dismutation de l' $O_2^{\bullet -}$ en H_2O_2 .

La SOD existe sous trois iso formes qui se différencient par leur localisation cellulaire et par leur cofacteur métallique : une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD), une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD) et une forme extracellulaire (EC-SOD). Il a été récemment montré que la Cu/Zn-SOD était également présente dans l'espace inter membranaire (Okado et Fridovich, 2001). La distribution de ces différentes isoformes varie selon le tissu. Dans le muscle, environ 65 à 85% de l'activité de la SOD se trouvent dans le cytosol tandis que les 15 à 35% restants sont localisés dans les mitochondries. Cependant, la Mn-SOD semble indispensable à la vie puisque sa mutation est non viable ; l'espérance de vie maximale pour des souris Mn-SOD^{-/-} n'est que de 22 jours pour certains types de mutations. Ceci n'est pas le cas pour la forme cytosolique bien que l'espérance de vie chez des souris transgéniques Cu/Zn-SOD^{-/-} soit plus faible que celle de souris Cu/Zn-SOD^{+/+} (130 semaines vs 180 semaines) (Sentman *et al.*, 2006).

➤ **Glutathion peroxydase (GPx) et reductase (GR) :**

La glutathion peroxydase (GPx) agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du H_2O_2 en H_2O et $\text{O}_2^{\cdot-}$. Lors de cette réaction deux molécules de glutathion réduit (GSH) sont oxydées en glutathion-disulfure (GSSG). Il existe également une glutathion peroxydase associée à la membrane mitochondriale, la phospholipide-hydroperoxyde glutathion peroxydase (PHGPx) qui est spécifiquement impliquée dans la diminution de la peroxydation lipidique (Mates *et al.*, 1999).

La glutathion réductase, quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG grâce au NADPH qui est utilisé comme donneur d'électrons. En effet, la concentration cellulaire en glutathion étant limitée, il est nécessaire de le réduire constamment pour que la GPx maintienne sa fonction (Nomura *et al.*, 2000).

Ces deux enzymes sont présentes dans le cytosol et dans les mitochondries.

➤ **Catalase :**

La catalase est également responsable de l'élimination d' H_2O_2 par une transformation en H_2O et $\text{O}_2^{\cdot-}$. Contrairement à la GPx, l'affinité de la catalase pour l' H_2O_2 est élevée seulement lorsque les teneurs en peroxyde d'hydrogène sont accrues. Cette enzyme est abondante dans le foie et les globules rouges. Elle se retrouve préférentiellement dans les peroxysomes et en plus faible quantité dans le cytosol (Mates *et al.*, 1999).

I-3-2. Systèmes antioxydants non enzymatiques :

➤ **Oligoéléments :**

Le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le sélénium (Se) et le fer (Fe) sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Toutes les enzymes antioxydantes requièrent un cofacteur pour maintenir leur activité catalytique. Ainsi, la SOD mitochondriale a besoin de manganèse, la SOD cytosolique de cuivre et de zinc, la catalase de fer et la GPx de sélénium. Cependant, certains oligoéléments, notamment le fer, lorsqu'ils sont en excès dans l'organisme et sous leur forme réduite, peuvent avoir une action pro oxydante (réaction de Fenton, d'Haber-Weiss) (Ji *et al.*, 1999).

➤ **Glutathion :**

Le glutathion réduit (GSH), réduit le peroxyde d'hydrogène et/ou les peroxydes organiques grâce à la réaction catalysée par la glutathion peroxydase (GPx). Il peut aussi réduire les radicaux formés par l'oxydation de la vitamine E et C, baissant ainsi les niveaux de peroxydation lipidique. Le rapport glutathion réduit/glutathion oxydé (GSH/GSSG) est souvent utilisé comme un marqueur du stress oxydant car plus le flux d' H_2O_2 est important, plus le glutathion réduit est consommé et le glutathion oxydé augmenté (**Power et Lennon, 1999**).

➤ **Ubiquinones et cytochrome c :**

Il a été décrit précédemment que les ubiquinones, sous leur forme semi-radicalaire, jouaient un rôle fondamental dans la production de ROS. Inversement, il a pu être défini que la forme "ubiquinol" agissait comme antioxydant. L'ubiquinol protège les membranes de la peroxydation lipidique par une diminution de la formation et de la propagation de radicaux peroxy. L'ubiquinone est également impliquée dans la régénération de la vitamine E ce qui amplifie son rôle protecteur contre les ROS (**Power et Lennon, 1999**).

Le cytochrome c présent dans l'espace inter membranaire a un rôle de détoxification en captant l'électron libre d' $O_2^{\cdot -}$ produit au niveau de la chaîne respiratoire. Ainsi réduit, il cède cet électron au complexe IV formant du cytochrome c oxydé et de l' H_2O (**Power et Lennon, 1999**).

➤ **Vitamine E et vitamine C :**

La vitamine E (α -tocophérol) et C (acide ascorbique) semblent être des plus importants dans la lutte contre le stress oxydant. La vitamine E étant liposoluble, elle se fixe aux membranes et peut ainsi séquestrer les radicaux libres empêchant la propagation des réactions de peroxydation lipidique. La vitamine C, hydrosoluble, se trouve dans le cytosol et dans le fluide extracellulaire ; elle peut capter directement l' $O_2^{\cdot -}$ et l' OH^{\cdot} . Elle peut aussi réduire le radical α -tocophérol et ainsi permettre une meilleure efficacité de la vitamine E (**Fig.14**) (**Evans, 2000**).

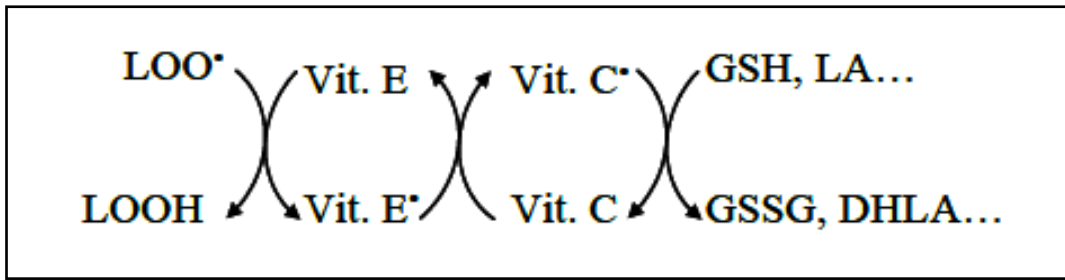


Fig.14 : Réactions d'élimination des radicaux lipidiques par les vitamines E et C (Evans, 2000).

I-4. Les dégâts cellulaires:

Les dommages induits par les ERO sont : une peroxydation des lipides, une oxydation des protéines, des mutations de l'ADN (Fig.15). Ces altérations peuvent conduire à des pertes de fonction et d'intégrité, voire à la mort cellulaire notamment par l'intermédiaire de l'apoptose . Les ROS initient également l'apoptose en activant l'ouverture du pore de transition de perméabilité (kohen et Nyska, 2002).

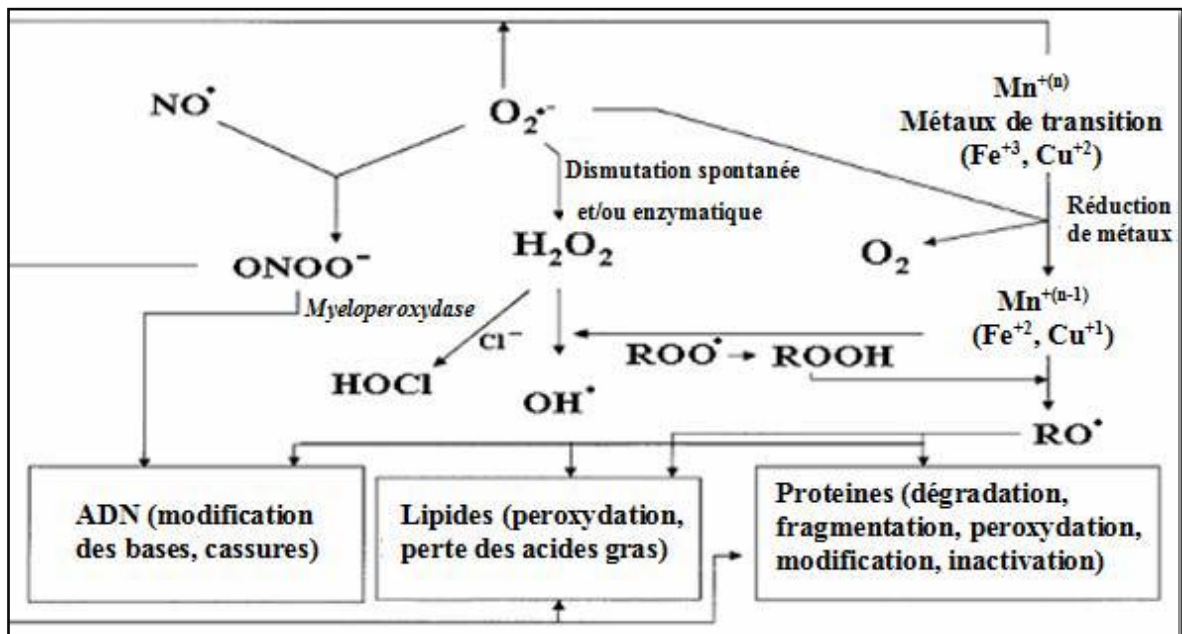


Fig.15 : Cibles biologiques et endommagement oxydatifs induits par les ROS (Kohen et Nyska, 2002).

I-4-1. Peroxydation lipidique :

Les premières cibles des ROS sont les lipides, notamment ceux présents dans les membranes cellulaires et subcellulaires. Les membranes riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré élevé d'insaturation

(Echtay *et al.*, 2003). L'oxydation des lipides génère des peroxydes lipidiques qui sont eux-mêmes très réactifs. La peroxydation de lipides induit une modification de la fluidité, de la perméabilité et de l'excitabilité des membranes (Fig.16).

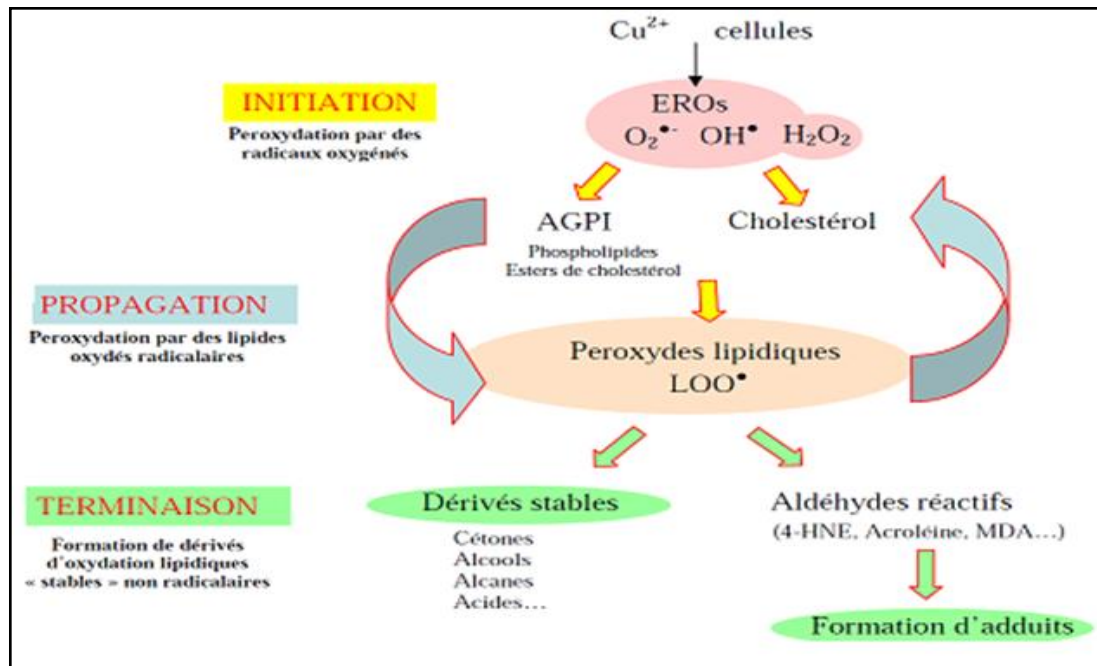


Fig.16: Représentation simplifiée de la peroxydation lipidique (Favier, 2003).

Elle fournit également une grande variété de produits qui peuvent réagir avec les protéines et l'ADN. Parmi les produits formés lors de la peroxydation lipidique, l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA), le acides thiobarbiturique (TBARS) et le 4-hydroxynonanal (4-HNE) sont étudiés comme marqueurs de la peroxydation lipidique. Cependant, le 4-HNE peut activer directement le découplage mitochondrial par action directe sur les UCP et pourrait ainsi réduire la production mitochondriale de ROS. Ce mécanisme pourrait être un moyen de réguler la production de ROS (Echtay *et al.*, 2003).

I-4-2. Oxydation des protéines :

De façon comparable à l'oxydation des lipides, les protéines sont aussi susceptibles d'être oxydées par les ROS. Cette oxydation provoque l'introduction d'un groupe carbonyle dans la protéine (Levine, 2002). Ces réactions d'oxydation, fréquemment influencées par les cations métalliques comme le Cu_2^+ et le Fe_2^+ , peuvent être classées en deux catégories : 1°) celles qui cassent les liaisons peptidiques et modifient la chaîne protéique, 2°) les modifications des peptides par l'addition de produits issus de la peroxydation lipidique. Ces changements sont tels qu'ils conduisent à une modification structurale des protéines dont les conséquences sont majeures. L'oxydation des protéines peut être un signal pour les

"protéines de stress" (Heat Shock Protein, HSP) connus pour leur rôle cytoprotecteur. Ainsi, les membres de la famille de HSP70 ont un rôle de protéines chaperonnes. Elles prennent en charge les protéines dénaturées mais aussi les protéines en cours de maturation (participation à leur synthèse, à leur importation vers le réticulum endoplasmique et la mitochondrie). La synthèse des HSP pourrait ainsi compléter les capacités de défenses antioxydantes lorsque les protéines intracellulaires sont endommagées par les ROS (Levine, 2002).

I-4-3.Dommage de l'ADN :

Les bases puriques, pyrimidiques et le désoxyribose sont la cible privilégiée des EOR, ils sont alors transformés en produits de fragmentations et en bases oxydées. Les EOR ont une grande affinité de réaction avec certaines bases constitutives de l'ADN. La guanine est ainsi facilement transformée en 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OH-dG) qui est normalement éliminée par des enzymes de réparation de l'ADN qui peuvent, elles aussi, être victimes de l'action des radicaux libres (Fig.17). Si ces systèmes de protection sont débordés ou défectueux, les altérations du matériel génétique s'accumuleront au sein de l'ADN représentant ainsi la première étape impliquée dans la mutagenèse, la carcinogenèse et le vieillissement (Favier, 2003).

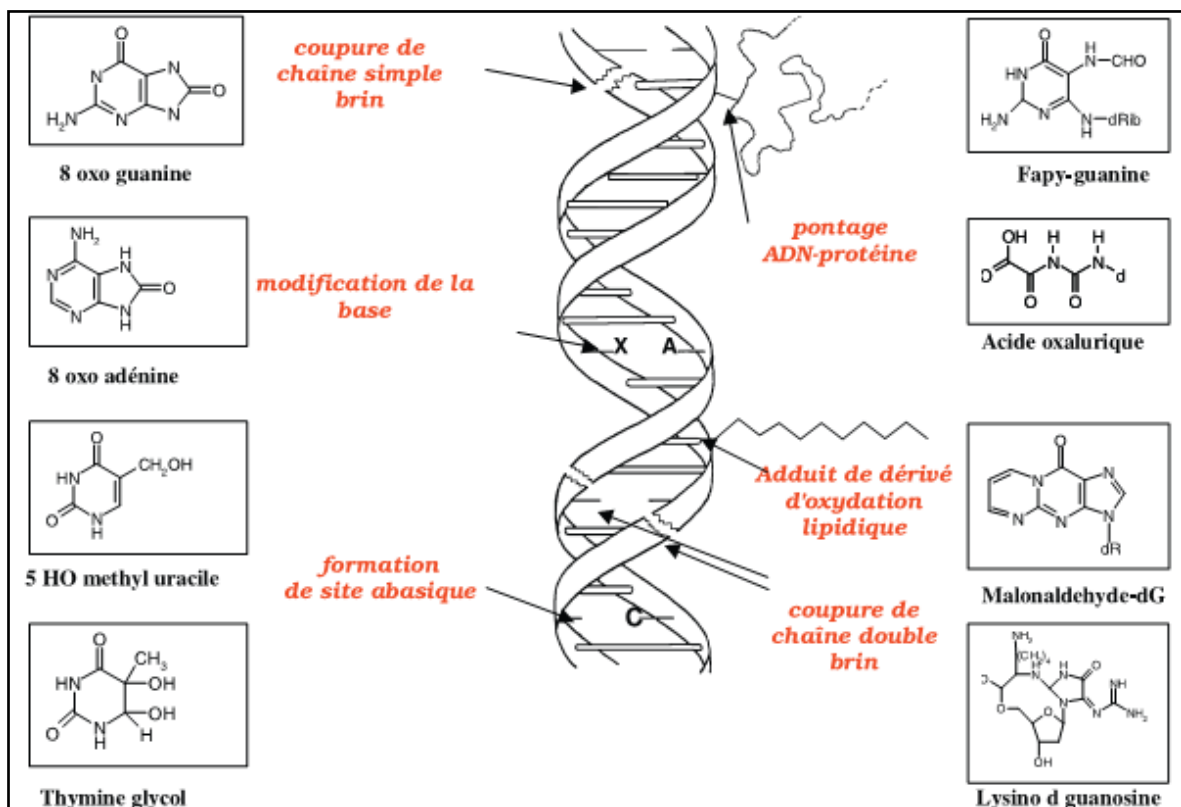


Fig.17 : Types de lésions de l'ADN provoqués par les attaques radicalaires(Favier, 2003).

I-4-4. Activation du pore de transition de perméabilité :

Bien que la nature moléculaire du pore de transition de perméabilité (PTP) reste encore à ce jour inconnue, il apparaît que le PTP est un complexe multi protéique avec de nombreuses protéines candidates dont le VDAC : Voltage Dependent Anion Channel), l'ANT (Adenine Nucleotide Translocator), la cyclophiline D, le complexe I. La ciclosporine A, inhibiteur de référence du PTP, retarde le processus d'apoptose confirmant le rôle clé du PTP dans la mort cellulaire (**Kowaltowski *et al.*, 2001**).

Succinctement, l'ouverture du PTP provoque un gonflement mitochondrial résultant de l'entrée dans la matrice de composés osmotiquement actifs. Suite à ce gonflement, la membrane externe peut se rompre et entraîner la sortie de molécules pro-apoptotiques (cytochrome c, AIF (Apoptose Inducing Factor)). Le cytochrome c alors relargué interagit avec Apaf-1 (Apoptosis Activating Factor-1) et la pro-caspase 9, ce qui a pour conséquence l'activation de la cascade des caspases déclenchant l'apoptose.

L'ouverture du PTP est très finement régulée. Le calcium matriciel apparaît comme étant son inducteur le plus puissant, nécessaire et suffisant (**Kowaltowski *et al.*, 2001**).

Les ROS agissent directement sur l'ouverture du PTP, pore qui intervient dans le processus d'apoptose (**Fig.18**). Selon l'équipe de Vercesi, l'ouverture du PTP induit par les ROS serait consécutive à l'oxydation d'un groupement thiol constituant ce pore (**Kowaltowski *et al.*, 2001**).

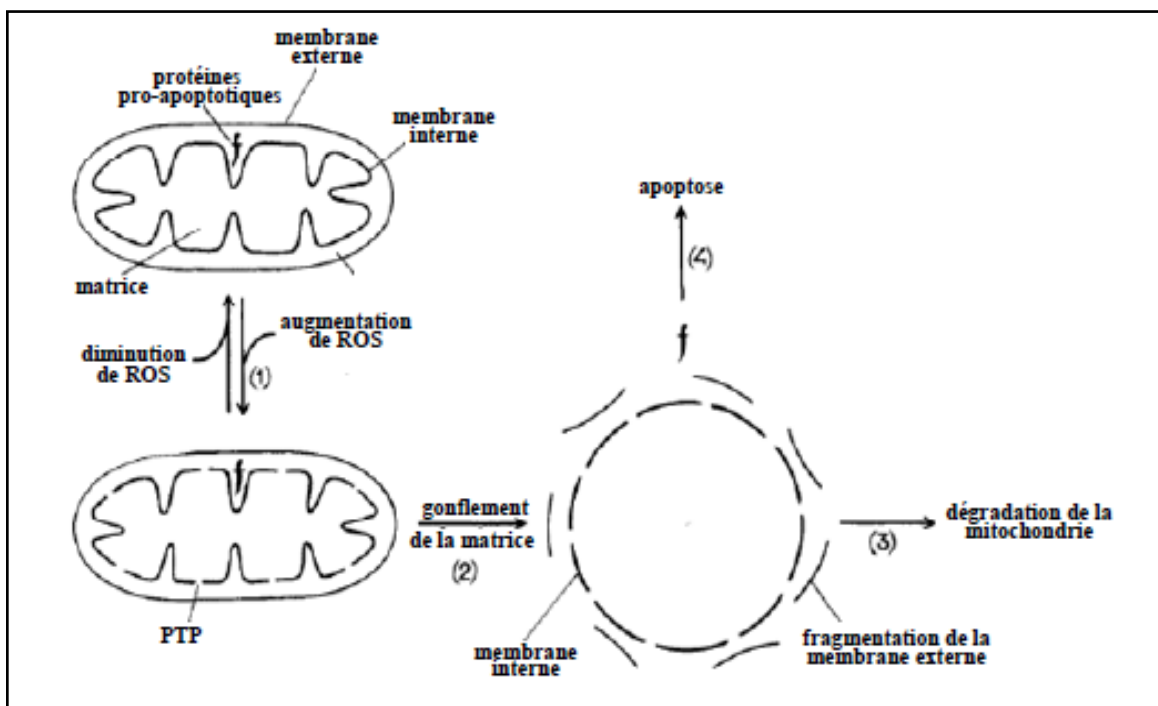


Fig18: Production de ROS, ouverture du PTP et apoptose (**Kowaltowski *et al.*, 2001**).

Chapitre II

Stress oxydant et le Système immunitaire

II-1. L'effet des antioxydants sur la réponse immunitaire :

Les mécanismes grâce auxquels les antioxydants agiraient sur le système immunitaire sont mal compris et beaucoup restent encore non élucidés. Nous allons présenter les différentes hypothèses qui ont été proposées (**Kim et al., 2000**).

➤ Hypothèse I :

Une des hypothèses est que les antioxydants participeraient au maintien de l'intégrité structurale et fonctionnelle des cellules. Les radicaux libres sont des produits physiologiques de la réponse immunitaire. Lors d'infection, ils sont produits par certaines cellules de l'immunité comme les neutrophiles par exemple, pour tuer des bactéries pendant la phagocytose. Ces ROS peuvent alors avoir aussi des effets délétères sur les cellules.

En particulier, ils peuvent peroxyder les lipides membranaires, induisant une modification de la fluidité membranaire (**Kim et al., 2000**).

Par conséquent, la division et la prolifération cellulaire à la suite d'une stimulation antigénique est compromise, ainsi que les procédés de transduction membranaire de signaux (grâce auxquels les cellules communiquent). L'intégrité de la cellule est alors mise en jeu.

De plus, l'expression des récepteurs membranaires pourrait aussi être altérée. Sous l'action des radicaux libres, l'ADN et les enzymes cellulaires pourraient aussi être endommagés (**Kim et al., 2000**).

Les ROS affecteraient, enfin, la cascade de transduction du message cellulaire et l'expression des gènes. Tout cela conduirait à des dysfonctionnements, à des défauts dans la communication intra- et intercellulaire et, le plus souvent, à la mort de la cellule. Un faisceau d'arguments va dans le sens de cette hypothèse.

Tout d'abord, les cellules du système immunitaire sont plus riches en vitamine E que les autres cellules. Est-ce parce qu'elles en ont des besoins supérieurs aux autres cellules pour lutter contre la production de radicaux libres ?

De plus, leurs membranes sont très riches en acides gras polyinsaturés, ce qui les rend particulièrement sensibles au stress oxydatif (**Chew et al., 2000**).

➤ **Hypothèse II :**

En dehors de ce rôle dans la prévention du stress oxydatif, les antioxydants pourraient être considérés comme des « immunonutriments » (Fig.19).

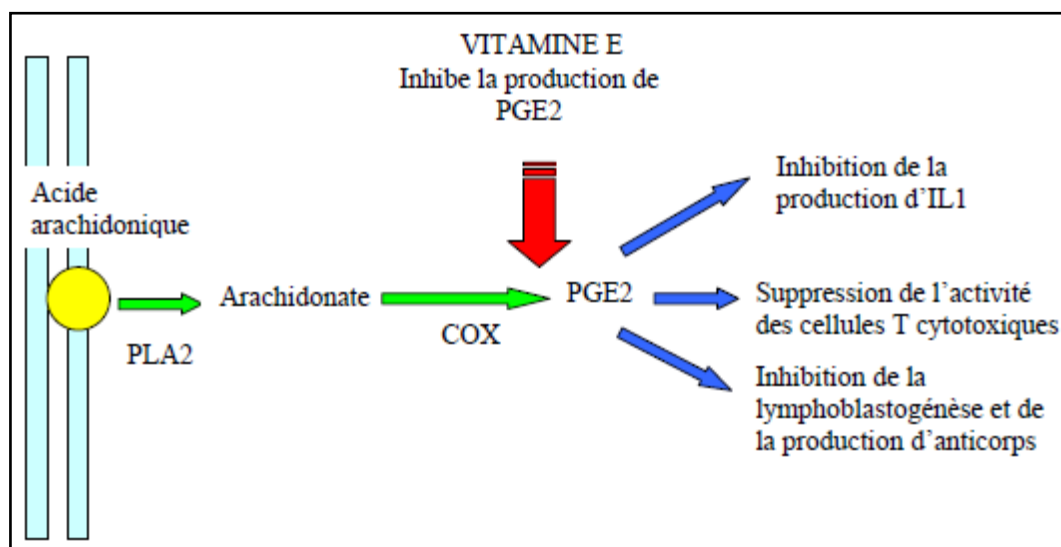


Fig.19 : Rôle immunomodulateur de la vitamine E (Hayek *et al.*, 2000).

Ils agiraient sur la production des cytokines ou sur celles des prostaglandines 2. C'est grâce à l'étude suivante que des chercheurs ont émis cette dernière hypothèse. (Hayek *et al.*, 2000), des chats supplémentés à 500 UI de vitamine E par kg de nourriture ont une production de PGE2 au bout de deux mois, significativement moindre que des chats non supplémentés. Or, la PGE2 est connue pour ses rôles immunomodulateurs. La vitamine E agirait-elle sur la production de cet éicosanoïde ? Ce mécanisme suffit-il à expliquer son influence sur la fonction immunitaire (Harper, 2001).

➤ **Hypothèse III :**

Les molécules les plus utilisées pour renforcer la résistance de l'organisme sont la vitamine E et les caroténoïdes. La plupart des études se sont surtout intéressées aux propriétés immunomodulatrices de ces dernières et en particulier du β -carotène.

Cependant, le rôle de molécules comme la lutéine, le lycopène, l'astaxanthine et la cantxanthine est de plus en plus étudié car ces molécules semblent pouvoir aussi influencer la fonction immunitaire. Elles pourraient jouer un rôle dans la présentation de l'antigène. Par exemple, l'astaxanthine a une structure particulière. Elle possède des groupes polaires terminaux qui modifieraient la fluidité membranaire en augmentant sa rigidité, ce qui influence sur la présentation de l'antigène et donc la réaction immunitaire. La lutéine possède le même type de structure et pourrait agir de la même façon (Heaton *et al.*, 2002).

En ce qui concerne les mécanismes, beaucoup d'hypothèses existent mais peu de preuves expliquent le rôle des antioxydants sur la fonction immunitaire. Beaucoup de travaux sont encore nécessaires car, d'une meilleure compréhension de l'action de ces molécules, découlera une utilisation plus raisonnée et des effets mieux maîtrisés (Harper *et al.*, 2001).

II-2. Les radicaux libres et la phagocytose microbienne :

Les microbes phagocytés restent à l'intérieur du phagosome dans le cytoplasme. Une fois internalisés, ces phagosomes fusionnent avec des lysosomes préformés qui contiennent plusieurs protéases (comme l'élastase).

De plus, l'activation des phagocytes (par l'intermédiaire de signaux en provenance des TLR) entraîne l'assemblage des sous-unités multiples de la machine de la NADPH-oxydase dans la membrane du phagosome, et dans la membrane plasmatique. Ce complexe enzymatique catalyse la réduction de l'oxygène diatomique (O_2) en radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). Le $O_2^{\cdot-}$ est ensuite changé en peroxyde d'hydrogène, un oxydant puissant partiellement responsable de la destruction microbienne.

Cependant, la myéloperoxydase dans les phagosomes utilise l'ion peroxyde afin de produire un antibactérien encore plus puissant, l'acide hypochlorique (HOCl). Ce processus de production rapide d'oxydants puissants suite à l'activation et à la phagocytose par les neutrophiles et les macrophages utilise des quantités importantes d'oxygène disponible et est dénommé explosion oxydative (Fig. 20) (DeLeo *et al.*, 1999).

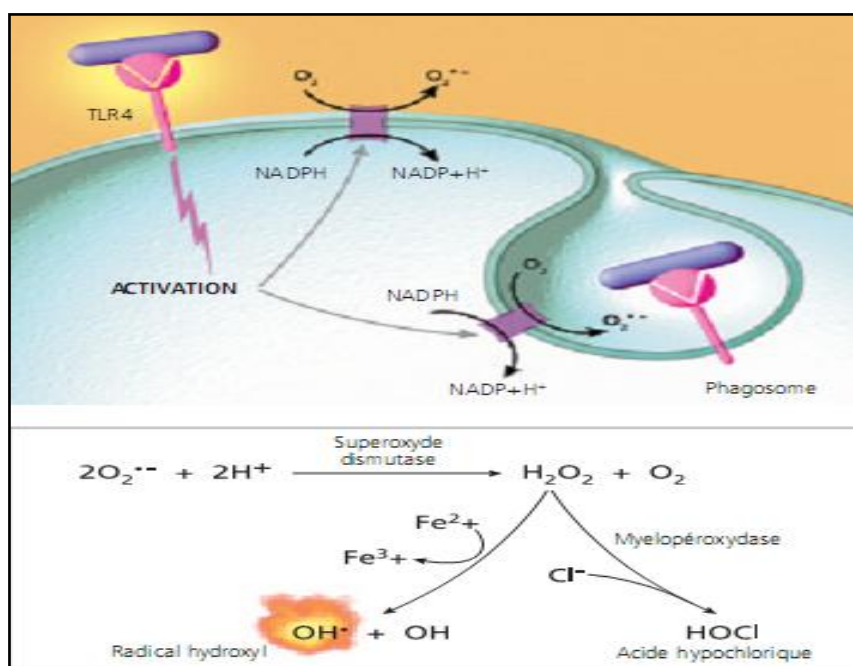


Fig 20: Explosion oxydative et production d'HOCl (DeLeo *et al.*, 1999).

Suite à l'activation des phagocytes, la forme inductible de l'oxyde nitrique synthétase (iNOS) est également synthétisée, conduisant à la production des radicaux libres de monoxyde d'azote (NO^\bullet), qui réagissent avec le superoxyde pour former le métabolite toxique peroxy-nitrite. Ces divers oxydants existent non seulement dans le phagocyte, mais sont aussi libérés dans le milieu extracellulaire où ils contribuent à la destruction microbienne de proximité. Inévitablement, ceci entraîne des lésions oxydatives des tissus environnants (DeLeo *et al.*, 1999).

Afin de se protéger eux-mêmes contre l'oxydation, les phagocytes ont besoin de concentrations élevées en antioxydants cytosoliques (aqueux) et membranaires (lipophiles) car ceux-ci sont dégradés et doivent se renouveler rapidement au cours du stress oxydatif.

Les antioxydants cellulaires les plus importants sont le glutathion, l'acide ascorbique, le tocophérol et la taurine. Les neutrophiles félines contiennent des concentrations intracellulaires élevées de taurine : elle constitue 76 % du pool d'acides aminés cytosoliques, comparé à 44 % dans les lymphocytes. L'élimination de HOCl par la conversion de la taurine en taurine chloramine protège la cellule contre les oxydants auto-formés (DeLeo *et al.*, 1999).

La taurine chloramine pourrait également agir comme molécule de signal intracellulaire limitant la production de $\text{O}_2^{\bullet-}$ et NO^\bullet . Chez les chats recevant un aliment carencé en taurine, la phagocytose et l'explosion oxydative sont supprimées, ce qui confirme le rôle antioxydant majeur de la taurine (DeLeo *et al.*, 1999).

II-3 .Les antioxydants alimentaires et le système immunitaire:

D'une manière générale, remplissent deux rôles dans la réponse immunitaire.

Ils protègent les leucocytes contre une attaque par les radicaux libres endogènes et ils protègent l'hôte contre les dégâts par les mêmes radicaux libres (Fig.21).

La nécessité d'augmenter la capacité anti oxydative intracellulaire des neutrophiles et des macrophages a déjà été discutée précédemment. Cette fonction est remplie par la taurine, le glutathion, l'acide ascorbique et le tocophérol. Le glutathion joue un rôle antioxydant majeur, à la fois en interagissant directement avec les radicaux libres, et également en tant que substrat pour la régénération de l'acide ascorbique (Chew et Park, 2004).

La disponibilité de la glutamine peut limiter la production du glutathion tandis que la supplémentation en glutamine peut augmenter la production de superoxydes par les neutrophiles (Chew et Park, 2004).

Plusieurs autres antioxydants, d'origine alimentaire, ont un effet sur l'immunité. Les caroténoïdes sont à noter en priorité. Le b-carotène et la lutéine sont incorporés dans les lymphocytes et les neutrophiles du chat et du chien, tout particulièrement dans les membranes mitochondriales dans lesquelles ils exercent probablement un rôle de protection des membranes lipidiques contre les radicaux libres endogènes (Chew et Park, 2004).

Les antioxydants extracellulaires (plasmatiques) sont également importants pour protéger les tissus et l'endothélium vasculaire au cours de la réponse immunitaire. La taurine, l'acide ascorbique, le tocophérol, le glutathion et les caroténoïdes contribuent tous à la défense des organes contre les radicaux libres produits par les phagocytes activés. (Chew et Park, 2004).

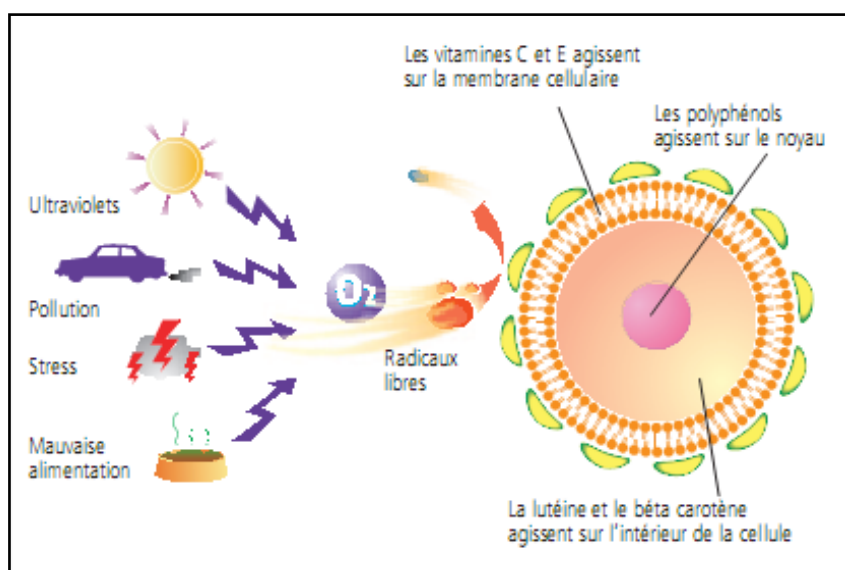


Fig.21 : Mode d'action d'antioxydants (Chew et Park, 2004).

II-4. Conséquences de la malnutrition sur l'immunité :

II-4-1. Sous-alimentation :

Une simple privation de nourriture, conduit à l'atrophie des organes lymphoïdes, à une diminution du nombre et de la fonction des leucocytes circulants et à des altérations physiques et fonctionnelles des barrières épithéliales. Il en résulte une augmentation de la sensibilité aux infections à partir des germes commensaux endogènes comme ceux de la peau ou de l'intestin, et exogènes comme les organismes nosocomiaux (Chandler et Gunn, 2004).

Chez le chien, la privation de nourriture se traduit par une diminution du nombre des lymphocytes circulants, une diminution de la prolifération lymphocytaire en réponse à la stimulation et une capacité altérée à produire une réponse lymphocytaire T ou B spécifique d'antigène suite à l'administration d'antigènes exogènes. Le chimiotactisme des neutrophiles

et la production hépatique des protéines de la phase aiguë sont réduites (**Chandler et Gunn, 2004**).

Des déficits nutritionnels spécifiques peuvent produire diverses anomalies : ainsi la carence en vitamine E réduit la prolifération lymphocytaire chez le chien, mais cet effet est partiellement réversible grâce à la supplémentation en d'autres antioxydants (**Chandler et Gunn, 2004**). Bien que les effets de la malnutrition sur l'immunité ne soient pas évalués de manière spécifique chez le chat, il est probable qu'ils ne soient pas très différents dans cette espèce. La concentration sérique en albumine est fortement corrélée à la condition corporelle des chats présentés dans les cliniques vétérinaires et il est probable qu'il en aille de même pour la fonction immunitaire (**Chandler et Gunn, 2004**).

II-4-2. Obésité :

Aucune étude n'a jusqu'ici évalué la fonction immunitaire chez le chat obèse. Il est vraisemblable que l'obésité chez le chat entraîne des modifications de l'immunocompétence similaires à celles constatées chez l'homme et dans de nombreuses études sur des rongeurs.

Dans les espèces étudiées, l'obésité entraîne une réduction de la réponse lymphocytaire à la stimulation; la normalisation de la réponse est observée suite à une perte de poids. Une réduction de la fonction des cellules NK, une modification du rapport lymphocytaire CD8 : CD4 et une réduction de l'explosion oxydative sont décrites chez l'homme et chez les rongeurs obèses (**Tilg et Moschen, 2006**).

L'obésité est de plus en plus reconnue comme un état associé à une inflammation chronique. Elle est en effet caractérisée par une augmentation des concentrations en cytokines inflammatoires circulantes et une augmentation de la production des protéines de la phase aiguë. Les cytokines inflammatoires sont produites par les macrophages activés dans le tissu adipeux en excès, mais également par les adipocytes eux mêmes. Le stade d'inflammation subclinique contribue à l'insulinorésistance périphérique chez l'homme et peut-être également chez le chat (**Tilg et Moschen, 2006**).

II-4-3. Caroténoïdes :

Les chats sont capables d'absorber des caroténoïdes alimentaires comme le b-carotène et la lutéine. Des quantités significatives de ces deux composés sont incorporées dans les membranes des organites cellulaires, particulièrement celles des mitochondries, ou des lymphocytes. Leur efficacité à absorber et stabiliser les radicaux libres (**Fig.22**), ainsi que leur capacité à se localiser dans les mitochondries, en font des antioxydants cellulaires de choix contre les oxydants endogènes (**Chew et al., 2000; Chew et Park, 2004**).

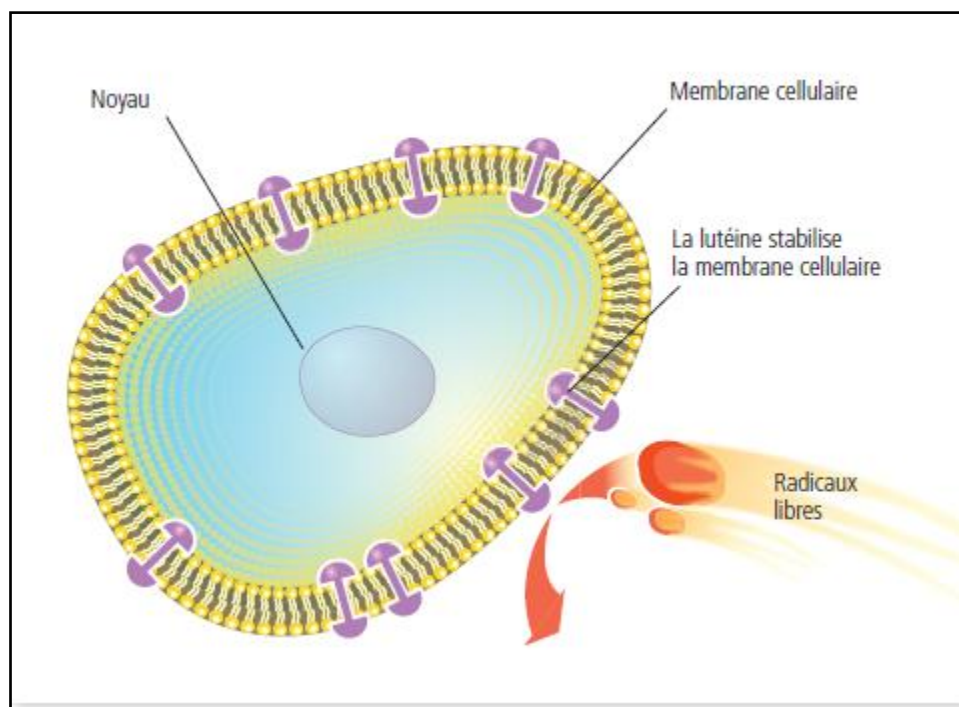


Fig.22 : Sites d'action de la lutéine (Chew *et al.*, 2000).

Leur localisation dans les membranes des organites les rend particulièrement aptes à protéger les protéines mitochondriales, les lipides membranaires et l'ADN.

De plus, puisque le NF- κ B peut être activé dans les leucocytes en réponse à un stress oxydatif, les antioxydants qui se concentrent dans les leucocytes pourraient réduire l'activation du NF- κ B. Il faut alors se demander si de tels effets pourraient être d'ordre anti-inflammatoire, voire même immunosuppresseur, ou si la simple protection antioxydante de la cellule renforce l'immunité (Chew et Park, 2004).

Dans la plupart des études réalisées jusqu'ici, la supplémentation d'un aliment avec des caroténoïdes avec ou sans activité vitaminique A (b-carotène *versus* lutéine) produit des réponses immunitaires augmentées dans plusieurs tests différents (Chew et Park, 2004).

L'incorporation de lutéine dans l'alimentation des chats affecte significativement les réponses immunitaires. L'hypersensibilité retardée à un vaccin administré par voie intradermique est augmentée, tout comme la prolifération lymphocytaire *in vitro* qui suit l'activation. Enfin, la production d'IgG totales après vaccination est augmentée suite à un traitement par la lutéine. Globalement, les caroténoïdes semblent renforcer l'immunité indépendamment de leur activité vitaminique A, sans que l'on sache si cet effet est isolé, ou partiellement lié à leur pouvoir antioxydant (Kim *et al.*, 2000).

II-4-4. Arginine :

L'arginine est un acide aminé indispensable pour les chats car ils sont incapables d'en synthétiser des quantités suffisantes. Cependant, au-delà de son rôle essentiel dans le cycle de l'ornithine, l'arginine est connue depuis longtemps pour renforcer certains aspects de l'immunité.

La L-arginine est oxydée en L-citrulline + NO (monoxyde d'azote) par la NO synthétase (NOS) (Fig.23)(Kim *et al.*, 2000).

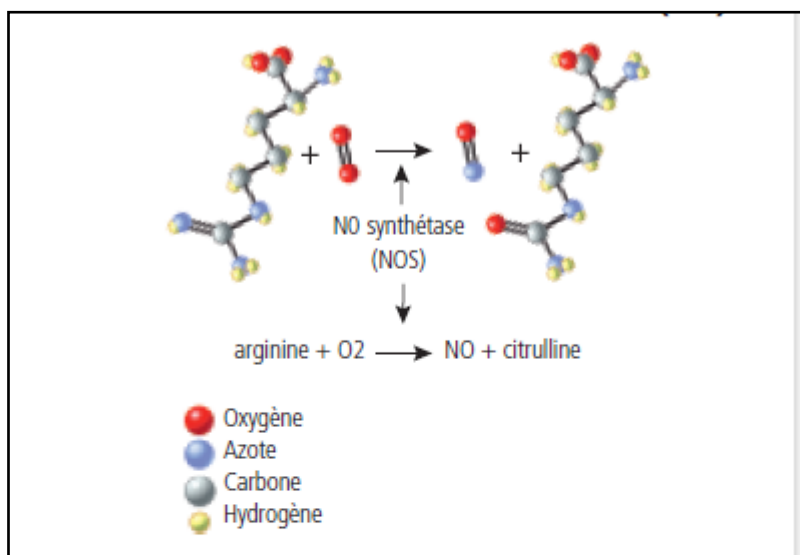


Fig.23: Origine de monoxyde d'azote (NO)(Kim *et al.*, 2000).

La forme inducible dans les leucocytes (iNOS) produit des quantités beaucoup plus importantes de NO[•] que les formes constitutives endothéliales (eNOS) et nerveuses (nNOS). La production de NO[•] après induction de iNOS dans un phagocyte activé est surtout limitée par la disponibilité en arginine libre. Toute augmentation de l'arginine disponible augmente donc le NO[•] produit par n'importe quel stimulus inflammatoire(Kim *et al.*, 2000).

Le monoxyde d'azote est un radical libre. Cependant, comparé à d'autres, la molécule est relativement stable dans les conditions physiologiques, ne réagissant qu'avec l'oxygène et ses dérivés, les métaux de transition, et d'autres radicaux libres. Cette faible réactivité, combinée à sa lipophilie, permet à la molécule de diffuser hors de son lieu de synthèse et d'agir en tant que signal intracellulaire, intercellulaire et peut-être même systémique.

Le monoxyde d'azote est nécessaire à la maturation de l'épithélium intestinal. Il est peut-être le principal neurotransmetteur inhibant la motilité intestinale et il est essentiel au maintien d'un flux sanguin muqueux normal (Kim *et al.*, 2000).

De plus, NO inhibe l'expression des molécules d'adhésion cellulaire, limitant l'entrée inutile des leucocytes dans les tissus muqueux principalement. Le monoxyde d'azote inhibe la prolifération des cellules T, diminue l'activation du NF- κ B et induit une réponse locale tournée vers le type Th₂. Cependant, contrastant avec le fait que le NO inhibe le NF- κ B, facteur clé de la transcription pro-inflammatoire, quelques études suggèrent que l'inhibition par le iNOS peut augmenter la production de cytokines pro-inflammatoires (**Viraget *al.*, 2003**).

Comme précédemment mentionné, le NO réagit relativement peu avec d'autres molécules. Cependant, il peut interagir avec l'ion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$) pour former le peroxy-nitrite (ONOO^-) mais dont la diffusion est limitée. Oxydant puissant, le peroxy-nitrite n'est pas un radical libre; il est responsable d'une large gamme d'effets toxiques allant de la peroxydation lipidique, jusqu'à l'inactivation des enzymes et des canaux ioniques, en passant par l'oxydation et la méthylation des protéines, la lésion de l'ADN et l'inhibition de l'oxydation mitochondriale (**Viraget *al.*, 2003**).

L'effet oxydant d' ONOO^- sur les cellules dépend de sa concentration : l'effet toxique d'une faible concentration est masqué par le renouvellement des protéines et des lipides et la réparation de l'ADN, alors qu'une forte concentration en ONOO^- conduit à l'apoptose, voire à la nécrose cellulaire. Puisque le NO et l' $\text{O}_2^{\bullet-}$ sont tous deux produits aux sites d'inflammation, il est raisonnable de penser que ONOO^- est impliqué dans de nombreux mécanismes pathogènes.

Les effets conjugués de $\text{O}_2^{\bullet-}$ et de NO devrait conduire à des effets pathogènes lorsque les deux molécules coexistent dans la même cellule. Dans ce contexte, le fait que iNOS soit capable de générer $\text{O}_2^{\bullet-}$ lorsque l'arginine n'est pas disponible est à considérer. Ceci est observé dans les macrophages : quand l'arginine est peu disponible, des quantités significatives de $\text{O}_2^{\bullet-}$ et de NO sont produites simultanément, suivie immédiatement de la formation intracellulaire de ONOO^- (**Viraget *al.*, 2003**).

Le nombre important d'études contradictoires évaluant le rôle de NO dans les maladies inflammatoires a entraîné une bipolarisation des opinions entre ceux qui soutiennent que le NO est un protecteur et ceux qui lui confèrent un rôle pathogène. Les deux approches sont pourtant probablement correctes.

Le devenir d'une molécule de NO est déterminé par de multiples variables qui orientent son rôle ultérieur :

- le site de production.
- le moment où la molécule est produite au cours de la maladie.

- la quantité de NO produite.
- le statut oxydo-réducteur de l'environnement.
- la chronicité de la maladie.

Globalement, il apparaît qu'une supplémentation en arginine, par voie parentérale ou orale, renforce la réponse immunitaire des individus ayant subi des traumatismes, une intervention chirurgicale, la malnutrition ou une infection. Cette action serait liée à sa capacité d'augmenter la production de NO par iNOS dans les neutrophiles et les macrophages.

Cependant, dans les cas de septicémie sévère (comme une infection accompagnée d'une réponse inflammatoire générale) l'augmentation de la production de NO peut être nuisible à cause de son effet ino- et chrono trope négatif, sa capacité à inhiber la coagulation et sa puissante action vasodilatatrice sur les veines et les artères (**Stechmilleret al., 2004**).

La plupart des préparations entérales félines contiennent 1,5 à 2 fois la quantité d'arginine nécessaire à la croissance. Cependant, lors de soins intensifs, la supplémentation des régimes en arginine est fréquemment recommandée et très pratiquée en médecine humaine pour renforcer le système immunitaire. Bien que des améliorations cliniques soient rapportées dans certaines études, il arrive que l'état de certains patients en stade critique souffrant d'inflammation systémique, de septicémie ou d'insuffisance organique se détériore lors de supplémentation en arginine. L'enrichissement des protéines alimentaires en arginine peut donc s'avérer soit bénéfique, soit néfaste (**Stechmilleret al., 2004**).

Chapitre III

*Les Pathologies
liées aux stress
oxydant*

III-1. Les pathologies liées aux stress oxydant :

Le stress oxydant est potentiellement impliqué dans de nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications lors de leur évolution. Ces pathologies peuvent découler d'intoxications chimiques et médicamenteuses, d'exposition à des rayonnements, d'un syndrome d'hyperoxygénation, de phénomènes inflammatoires, de situations d'ischémie-reperfusion et de désordres dégénératifs. La multiplicité des conséquences médicales de ce stress oxydant vient du fait que de nombreux organes ou tissus peuvent devenir la cible d'un stress oxydant (**Fig.24**). Le stress oxydant a été décrit comme impliqué dans le développement de maladies comme le cancer, les maladies neurodégénératives (sclérose latérale amyotrophique) et le vieillissement accéléré. Il est également admis que le stress oxydant est un facteur potentialisant l'apparition de maladies multifactorielles comme les maladies cardiovasculaires, le diabète, et la maladie d'Alzheimer (**Delattre et al., 2005**). Si le stress oxydant est réellement un facteur déclenchant ou participant au déclenchement de ces pathologies, il est logique de penser que la prise d'anti oxydants peut retarder, voir prévenir, l'apparition de telles maladies. De même, des études ont montré que le vieillissement s'accompagne d'une diminution des défenses anti-oxydantes, d'une augmentation de la production mitochondriale d'ERO, et d'une efficacité diminuée des systèmes de réparation et de dégradation des constituants oxydés. Ainsi, le vieillissement expose à un stress oxydant susceptible de déclencher ou de favoriser de nombreuses pathologies (**Delattre et al., 2005**).

Au cours de ces dernières années, de très nombreuses études épidémiologiques ont montré très clairement que la consommation régulière de fruits et légumes riches en anti oxydants permet de diminuer l'incidence de l'apparition des maladies cardiovasculaires et du cancer (**Favier ,1997**).

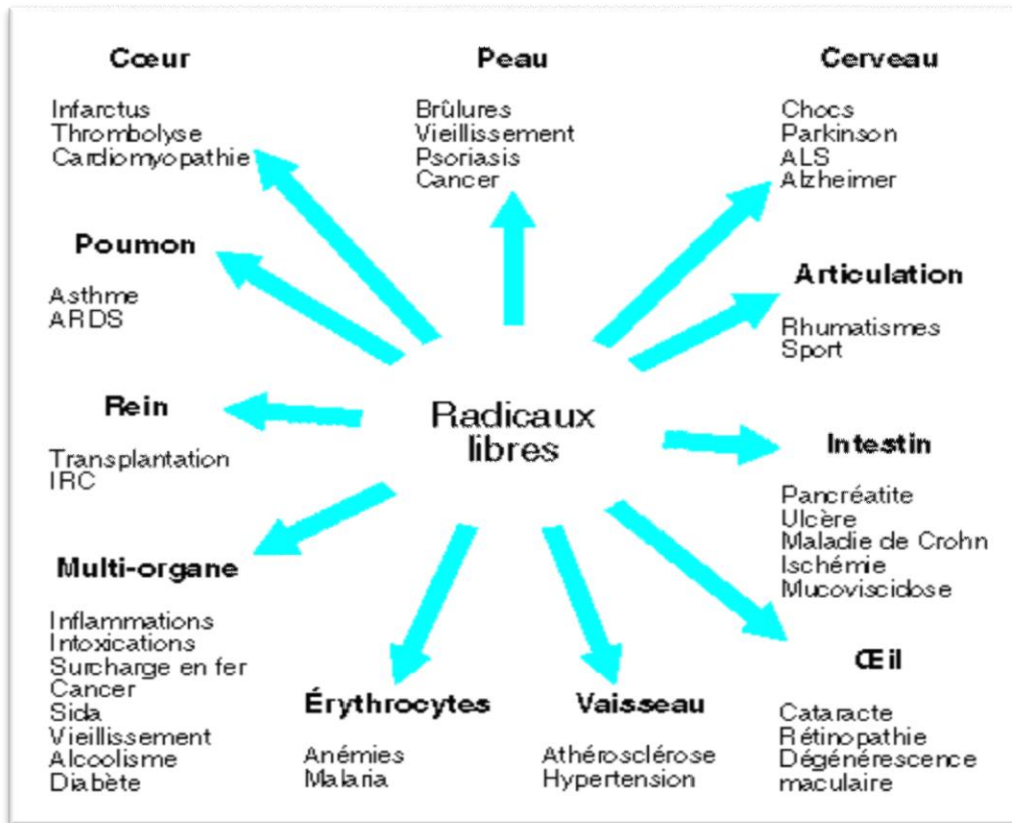


Fig.24 : Principales circonstances pathologiques s'accompagnant d'un stress oxydant primitif ou secondaire (Favier, 1997).

Il est admis que le stress oxydant résulte d'un déséquilibre entre la génération des ROS et le potentiel antioxydant de l'organisme. Différentes études ont montré que le diabète sucré est associé à une augmentation de la production des radicaux libres d'une part, et d'une diminution du potentiel antioxydant d'une autre part, ce qui conduit à des dommages affectant les composants cellulaires tels que les protéines, les lipides, les acides nucléiques ...etc (Werstuck, 2006).

III-1-1. Diabète et le stress oxydatif :

Le stress oxydant est augmenté dans les différents tissus à la fois dans le cas de diabète expérimentale ou pour les patients diabétiques, l'hyperglycémie induit une production prolongée des espèces réactives de l'oxygène intracellulaire et ceux-ci prolongent le gradient électrochimique des protons générés dans la chaîne mitochondriale menant à une surproduction d'anion superoxyde, qui est l'une des espèces réactives de l'oxygène qui peut endommager les cellules dans de nombreuses voies à travers le stress oxydatif, en l'absence d'une compensation appropriée de la réponse des réseaux antioxydants endogènes des cellules, le système est débordé, entraînant un déséquilibre d'oxydo-réduction, ce qui aggrave encore la situation (Werstuck, 2006).

Les espèces réactives de l'oxygène générés lors de l'hyperglycémie causent principalement des dommages de l'ADN, des protéines et des lipides. en plus il est évident que dans le diabète de type 2, l'activation des voies de stress sensible par l'élévation du glucose et des acides gras conduit à deux niveaux de résistance à l'insuline et une diminution de la sécrétion d'insuline et la dysfonction des cellules B sécrétrice de l'insuline (Evans *et al*,2003).

III-1-1-1. Glycation (glycosylation) :

La glycation des peptides et des protéines est une réaction chimique lente des sucres réduits en modifiant les groupements aminés. La première de ces intermédiaires non enzymatique de glycosylation sont les produits Amadori (Andrejvet *al.*,2005).

La dégradation des produits Amadori génère des produits cétoniques tels que le 1 et 3 desoxyglucosone avec la production des radicaux libres et de peroxyde d'hydrogène (Andrejvet *al.*, 2005).

De nombreuses preuves suggèrent que les radicaux libres et le peroxydes d'hydrogène, produit par l'auto-oxydation du glucose en présence de métaux de transition, sont une cause importante des dommages de la structure des protéines au cours de l'exposition au glucose in vitro (Fig.25) (Andrejvet *al.*, 2005).

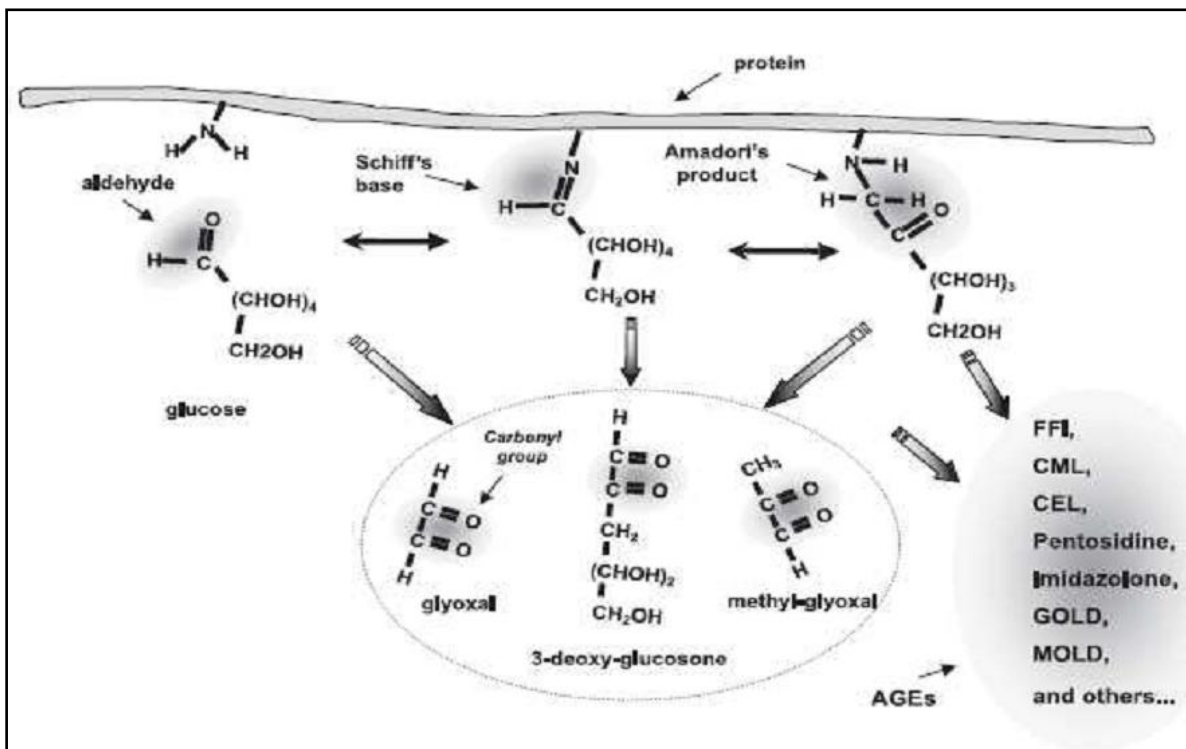


Fig .25:Les principales étapes de formation des AGE (Giuseppina *et al.*, 2004) .

Le résultat type de la glycation des protéines au cours de l'hyperglycémie est la formation de l'hémoglobine glyquée, largement utilisé, comme indice de contrôle de la glycémie à long terme, et le taux des AGE intracellulaires et extracellulaires. (Giuseppina *et al.*, 2004)

III-1-1-2. Les AGE-RAGE :

La formation des produits finaux de glycation (AGE) est due à l'augmentation de la glycation enzymatique des protéines, des lipides et des acides nucléiques. Une fois formés, l'AGE peut influencer la fonction cellulaire en se liant à plusieurs sites membranaires, y compris le récepteur de l'AGE (RAGE) (Uribarri, 2006).

L'interaction des AGE au RAGE conduit à la génération intracellulaire de radicaux libres de l'oxygène et parallèlement l'épuisement des antioxydants (Uribarri, 2006).

L'élévation du stress oxydatif cellulaire finalement conduit à l'activation du facteur de transcription NF- κ B, sensible à la balance redox cellulaire qui joue un rôle très important dans la régulation de nombreux gènes comme les cytokines (TNF, IL6, IL8); les molécules d'adhésion (VCAM-1, VCAM-2), le facteur tissulaire pro-coagulant, l'endothéline-1, iNO synthase; et la cyclo-oxygénase, hème oxygénase de type-1, et la 5-lipoxygénase (Fig.26) (Uribarri, 2006).

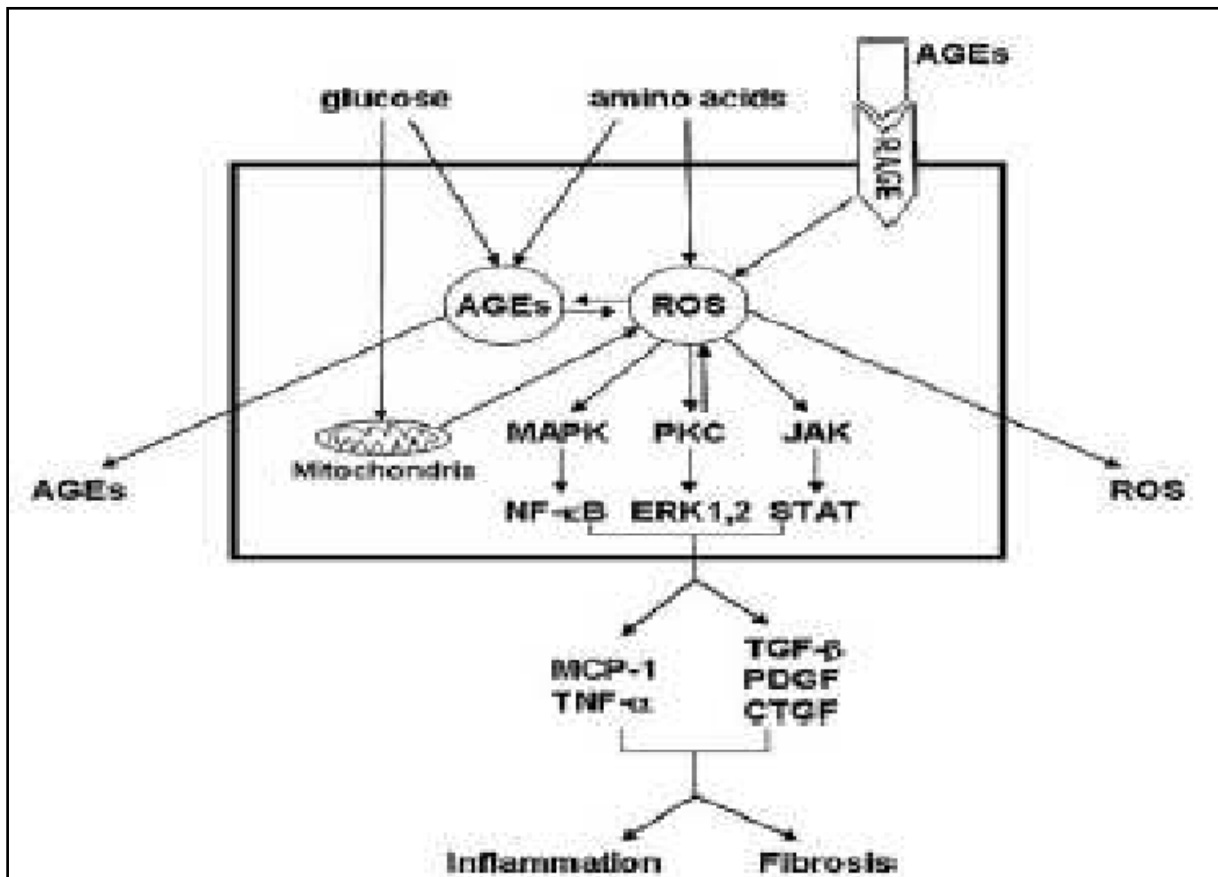


Fig.26 : Interactions des AGES avec les RAGEs et la production des ROS (Uribarri, 2006).

III-1-1-3. Augmentation de la voie de polyol :

Les nerfs périphériques, cellules de Shwan, glomérule rénal et éventuellement, la rétine contiennent deux enzymes qui constituent la voie de polyol.

Le premier enzyme est l'aldose réductase (Ec, 1, 1, 1,21) est une enzyme nécessitant le NADPH comme un cofacteur, il réduit le glucose en sorbitol, la deuxième enzyme est la Sorbitol déshydrogénase NAD-nécessitant transforme le sorbitol en fructose (Uribarri, 2006).

Aussi, l'activation de la voie de polyol contribue à la formation du triose phosphate et de son auto-oxydation, se traduit par la formation d'une espèce réactive qui est l'alpha oxo-aldéhyde (Uribarri, 2006).

En outre, l'épuisement de NADPH cellulaire rétablit par l'aldose réductase conduit au mal fonctionnement même une inhibition de l'enzyme clé dans la physiologie de la cellule comme le monoxyde d'azote synthase et le glutathion réductase.

Le Sorbitol déshydrogénase, la deuxième enzyme de la voie de polyol qui converti le Sorbitol en fructose, contribue au stress oxydatif très probablement, par l'épuisement du cofacteur NAD (Fig. 27) (Ketan *et al.*, 2007).

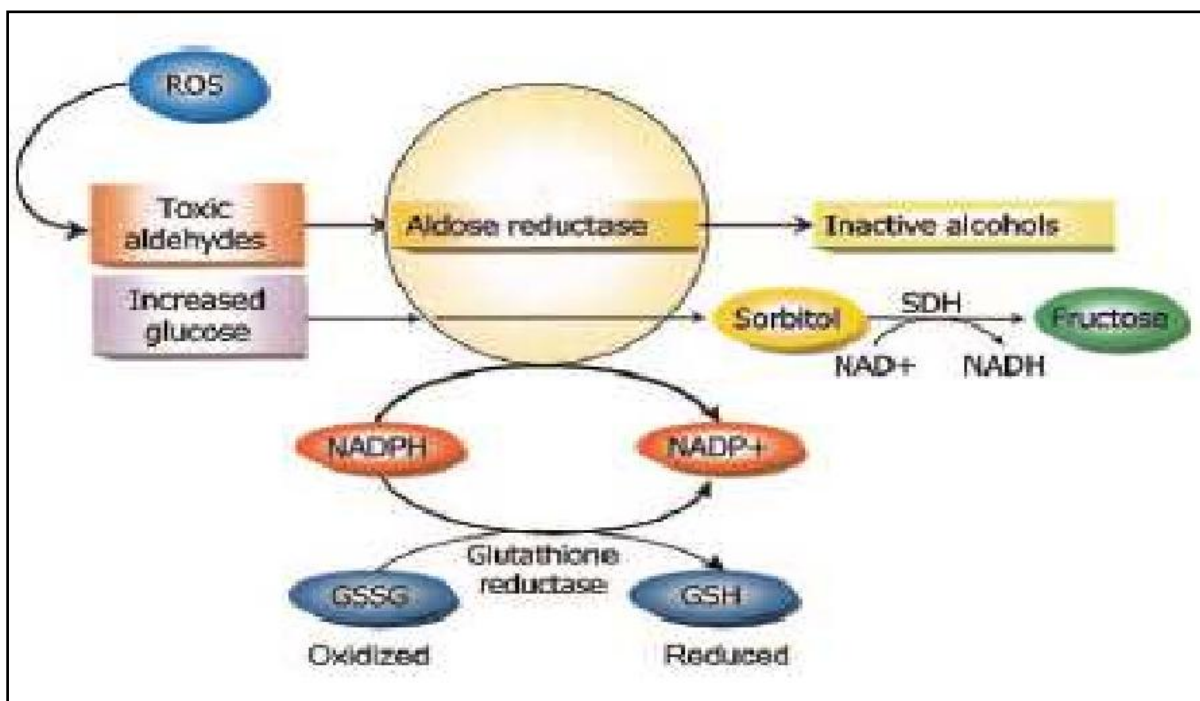


Fig.27: Activation de la voie des polyols comme conséquence de l'hyperglycémie (Ketan *et al.*, 2007).

III-1-1-4.L'épuisement des antioxydants sérique et cellulaire:

La concentration de l'acide ascorbique au niveau du sang et les globules blancs diminué d'une façon significative chez les patients diabétiques alors que son produit d'oxydation est trouvé avec des concentrations très élevés (Ketan *et al.*, 2007).

Il a été observé que l'acide urique, qui présente 30-65 % de la défense contre le radical peroxy est trouvé avec des concentrations réduites chez les diabétiques de type 1, ainsi les patients diabétiques présentent une faible concentration en Q10 par rapport aux seins (Ketan *et al.*, 2007).

L'élévation de la concentration des métaux de transition comme celle du cuivre ou de fer joue un rôle dans le stress oxydatif lié au diabète car ils catalysent la réaction de formation des radicaux libres. D'autre part, il y a une carence en zinc chez le diabétique, cet élément joue un rôle principal dans l'activité de la SOD (Janet *et al.*, 2005).

III-1-1-5.Oxydation de l'ADN et le dysfonctionnement mitochondrial au cours du diabète :

Le stress oxydant induit des lésions de l'ADN dans les cellules mononucléées de type 1 et 2, il a été noté que chez les patients diabétiques, des niveaux élevés de base purine oxydée, 8-hydroxy-deoxy-guanosine, un oxydant reconnu comme bio marqueur des lésions de l'ADN (Brownlee, 2005).

La forte concentration intracellulaire du glucose due à l'hyperglycémie provoque une production accrue des donneurs des électrons (NADH₂, FADH₂) à partir du cycle de Krebs. Ce phénomène induit un grand gradient de potentiel intermembranaire et par conséquent le transfert des électrons au niveau du complexe III (Fig.28), à ce point le superoxyde d'anion se produit avec des quantités où la SOD ne soit jamais capable de les neutraliser (Brownlee, 2005).

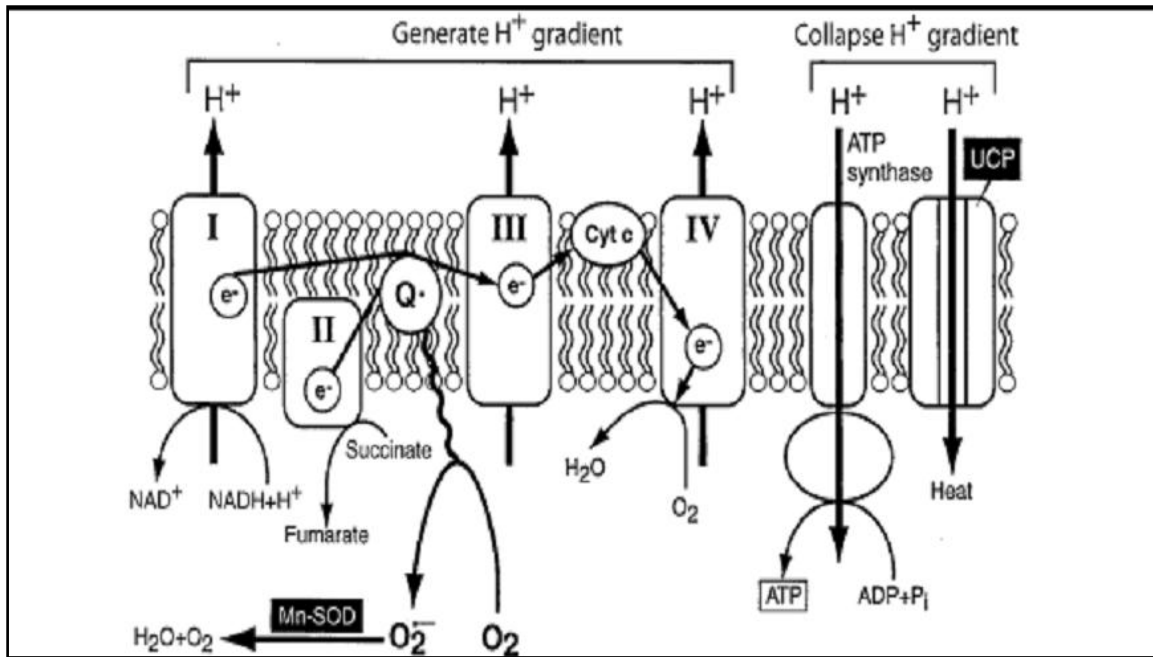


Fig.28: Production de l'anion superoxyde par la mitochondrie suite à l'hyperglycémie (Brownlee, 2005).

III-1-2.laviellissement et le stress oxydant:

Le vieillissement est un processus qui continue à fasciner les biologistes de tous horizons, qu'ils s'intéressent à l'évolution, à la génétique, à la signalisation ou à la toxicité de l'environnement (Robert, 2006).

De nombreuses théories, parfois contradictoires, sont proposées pour rendre compte des mécanismes du vieillissement, perçus par certains comme le résultat d'un programme inéluctable, par d'autres comme le fruit d'une suite d'agressions qui pourraient être évitées ou réparées (Robert, 2006).

L'hypothèse « radicalaire » du vieillissement met au premier plan l'accumulation d'agressions oxydantes provoquées par les radicaux libres provenant principalement du métabolisme de l'oxygène et de l'azote. Cette hypothèse, proposée il y a une cinquantaine d'années, demeure l'une des plus populaires chez les spécialistes, même si certaines de ses prédictions n'ont pas été vérifiées de manière satisfaisante. Cet article présente les fondements de cette hypothèse, ses relations avec les autres théories, mitochondriales, métaboliques et génétiques, et la confronte à la réalité têtue des observations expérimentales pour proposer une vision plus intégrée des relations entre vieillissement et stress cellulaire (Robert, 2006).

III-1-2-1.La théorie radicalaire du vieillissement :

Le vieillissement s'accompagne d'une altération globale d'un ensemble de fonctions physiologiques ainsi que d'une susceptibilité plus élevée face à différentes maladies. La

théorie radicalaire explique ces altérations par l'accumulation de molécules oxydées et par les conséquences de cette oxydation comme l'apparition de mutations, la carbonylation des protéines, leur dénaturation et leur agrégation, l'oxydation des lipides et l'augmentation des AGE(Fig29)(Lane, 2003).

La mise en évidence de la superoxyde dismutase dont le substrat unique est le radical superoxyde, a contribué à établir la réalité biologique des radicaux libres et leurs rôles possibles physiologiques ou physiopathologiques (Lane, 2003).

Plusieurs arguments militent en faveur de l'implication des radicaux libres dans les mécanismes du vieillissement. Une élévation des marqueurs biologiques du stress oxydant comme la 8-oxo-guanine, le dialdéhyde malonique (MDA) et les isoprostanes a été observée au cours du vieillissement de nombreuses espèces(Lane, 2003).

Par ailleurs, des études récentes de la variation du transcriptome au cours du vieillissement, y compris chez le singe, ont révélé l'induction de plusieurs gènes codant des enzymes anti oxydantes et la répression de gènes de la chaîne respiratoire, révélatrices d'une adaptation au long cours à un état cellulaire pro-oxydant (Kayoet al., 2001).

La détérioration des macromolécules cellulaires est compatible avec une élévation de la pression oxydante avec l'âge puisque l'on note une augmentation des mutations et des délétions, en particulier de l'ADN mitochondrial, une carbonylation des protéines et leur dénaturation, une élévation des produits de glycation avancée (AGE) révélatrice d'un état prédiabétique ou diabétique(Balabanet al., 2005).

Enfin, l'efficacité des mécanismes de réparation cellulaire comme le protéasome, les protéines chaperons, plusieurs enzymes réductrices et les systèmes de réparation de l'ADN diminuent avec l'âge, ce qui contribue à la fixation et à l'accumulation des anomalies(Sohalet al., 2002).

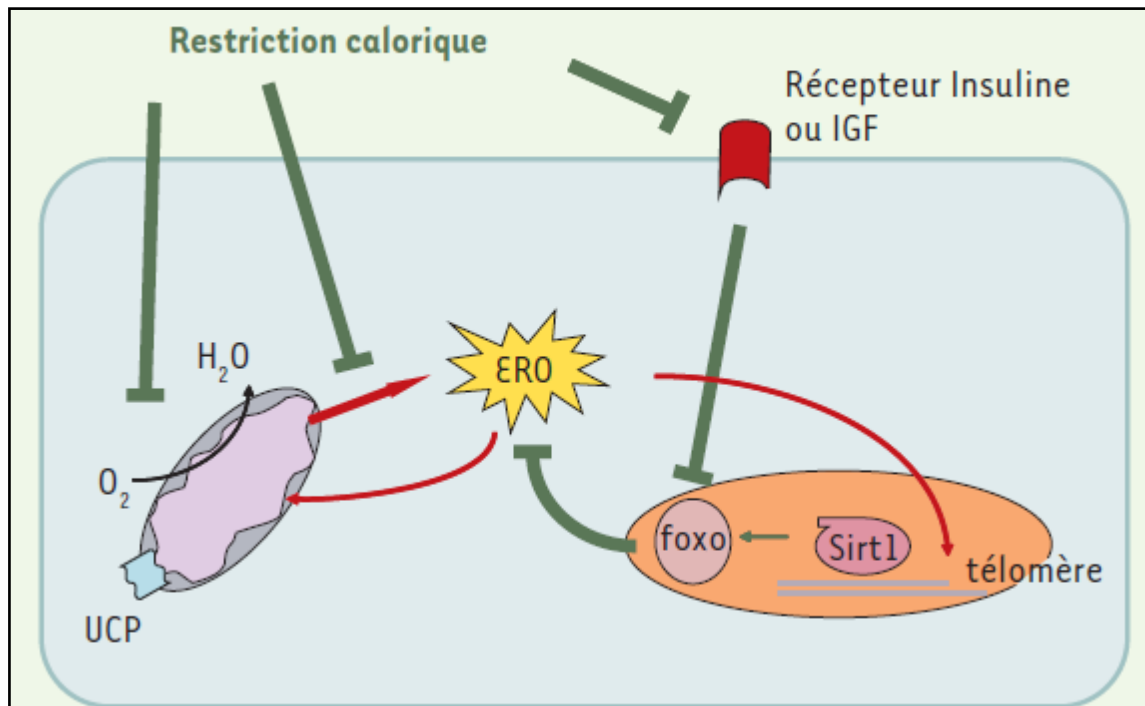


Fig.29 :Théorie radicalaire et autres théories du vieillissement(Sohalet *et al.*, 2005).

III-1-2-2.Production d'ERO au cours du vieillissement :

Les mitochondries sont le siège d'une importante production physiologique d'ERO ; en effet, au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale, environ 2% de l'oxygène est transformé en radicaux superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). Des expériences chez l'animal (rongeurs, mouche domestique) ont montré que cette production d'ERO augmente avec l'âge et s'accompagne d'une moindre fonctionnalité des mitochondries, avec diminution de la production d'ATP. Cette production accrue d'ERO au niveau mitochondrial pourrait par ailleurs être à l'origine de mutations dans l'ADN mitochondrial, contribuant elles-mêmes au processus de vieillissement(Kirkwood, 2005).

III-1-2-3.ERO entre pléiotropie et compromis :

L'implication du stress oxydant dans le vieillissement s'intègre bien dans un concept plus général qu'on peut appeler « pléiotropie antagoniste » qui considère que les altérations associées au vieillissement sont les conséquences de l'activité de gènes essentiels pour le développement et la fertilité des organismes(Kirkwood, 2005).

L'exemple le plus cité est celui de la protéine p53 dont les fonctions protectrices sont reconnues, mais qui est impliquée dans les phénomènes de sénescence. De nombreux autres facteurs peuvent sans doute relever de cette catégorie. Il y aurait donc un compromis permettant de sélectionner ces gènes pour leurs effets bénéfiques au début de la vie tout en tolérant leur toxicité possible apparaissant avec l'âge(Kayoet *et al.*, 2001).

On peut proposer que la toxicité des oxydants et des radicaux libres qui s'accumulent avec l'âge est le prix à payer pour leurs effets bénéfiques, par exemple dans la signalisation et les défenses de l'organisme, ou tout simplement parce qu'ils sont générés de manière difficile à éviter au cours de processus essentiels comme la respiration et le métabolisme (Fig.30) (Kirkwood, 2005).

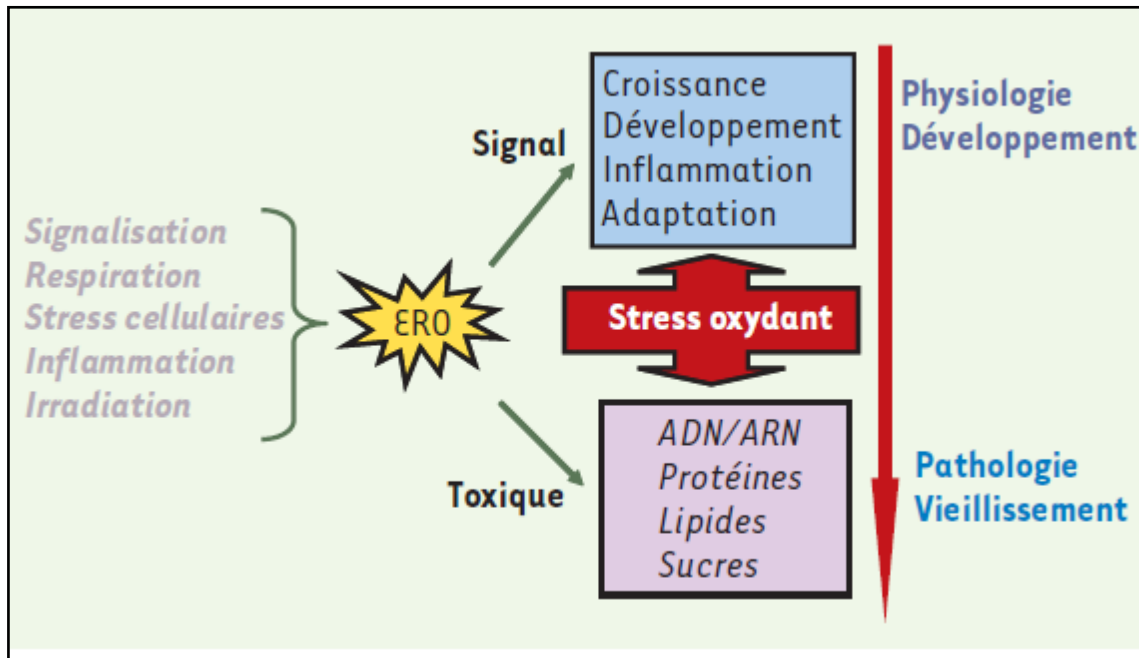


Fig .30:La double vie des ERO (pléiotropie contradictoire et compromis

(Kirkwood, 2005).

III-1-2-4. Le systèmes antioxydants au cours du vieillissement :

De nombreuses études ont été menées dans le but de mettre en évidence un éventuel déficit des systèmes enzymatiques antioxydants au cours du vieillissement, en particulier au niveau des érythrocytes puisqu'ils renferment notamment la Cu, Zn-superoxyde dismutase (Cu,Zn-SOD), la glutathion peroxydase (GPx) et la glutathion- S-transférase (GST)

(Delattreet *al.*, 2005).

Toutefois, les résultats de ces études présentent des divergences. Une récente étude de Junqueira *et al.* menée chez 503 sujets sains (48% hommes, 52% femmes) montre cependant une augmentation significative de l'activité de la GPx chez les sujets de plus de 70 ans comparativement à toutes les autres tranches d'âge comprises entre 20 et 70 ans (Junqueira *et al.*, 2004).

En revanche, en ce qui concerne les antioxydants non enzymatiques (vitamine E, vitamine C, caroténoïdes, glutathion...) et les oligoéléments (sélénium, zinc), des carences ont pu

être observées, en particulier en vitamine C dans des unités de long séjour et en sélénium (Junqueira *et al.*, 2004).

L'étude de Junqueira *et al.* montre en outre une diminution de la concentration de la vitamine E et du β -carotène circulants, deux antioxydants lipophiles, chez les sujets de plus de 70 ans, même lorsque ces concentrations sont ramenées à celle des lipides circulants (cholesterol-LDL) (Junqueira *et al.*, 2004).

Une très récente étude menée par Ray *et al.* Chez 1002 femmes de 70 à 79 ans, incluses dans la Women's Health and Aging Study (WHAS) et suivies pendant 5 ans, a par ailleurs permis d'observer que les concentrations sériques les plus élevées en sélénium et caroténoïdes semblaient associées au plus faible risque de mortalité (Ray *et al.*, 2006).

Un autre moyen d'évaluation des capacités antioxydantes de l'organisme est d'apprécier le pouvoir antioxydant total plasmatique, qui mesure un ensemble de substances antioxydantes dans le plasma (protéines à groupements thiols, acide urique, bilirubine, glutathion réduit, vitamines antioxydantes, ...).

L'avantage est que certaines techniques de détermination de ce pouvoir antioxydant total ont été commercialisées sous forme de kits et sont donc d'utilisation aisée. Il faut cependant rester conscient que les substances contribuant à ce pouvoir antioxydant total sont à la fois des antioxydants bien caractérisés mais aussi des substances comme l'albumine, l'acide urique, la bilirubine, et même des substances non encore identifiées ce jour (Bonfontet *et al.*, 2001).

Enfin, au cours du vieillissement, on constate un déplacement de l'équilibre de la forme réduite vers la forme oxydée du glutathion, qui constitue le thiol majoritaire au niveau cellulaire ; ceci pourrait être impliqué dans le dysfonctionnement cellulaire observé avec l'âge (Drog, 2002).

Une appréciation du capital oxydoréducteur de la cellule peut être obtenue par le dosage du glutathion réduit et oxydé grâce à des techniques de chromatographie liquide haute performance (CLHP) (Drog, 2002).

III-1-2-5. Oxydation des constituants cellulaires au cours du vieillissement :

De nombreux composés oxydés s'accumulent au cours du vieillissement, l'un des plus connus est la lipofuschine, pigment brun fluorescent dont l'analyse révèle la présence de constituants lipidiques et protéiques difficilement dégradables (Brunk et Terman, 2002).

Les produits de glycation avancée (AGE pour «advanced glycation end products») tels que la pentosidine ou la carboxyméthyllysine sont également retrouvés liés à des protéines à longue durée de vie telles que le collagène, la laminine, les protéines du cristallin ; des réactions

d'oxydation interviennent dans la formation des AGE, c'est pourquoi l'on parle de glyco-oxydation ; la liaison des AGE a leurs récepteurs (RAGE) conduit à l'activation de MAP kinases et de facteurs de transcription « redox sensibles » (tels que NFκB), stimulant en retour la production d'ERO. La concentration de ces AGE augmente avec l'âge en dehors de toute pathologie diabétique (**Bennefont, 2003**).

De nombreuses acides amines (soufres, aromatiques...) sont sensibles aux processus d'oxydation.

Parmi les acides amines soufres, la méthionine est oxydée en sulfoxyde de méthionine dont la concentration tissulaire augmente avec l'âge, en particulier au niveau du collagène. Heureusement, l'organisme dispose d'un moyen de régénérer la méthionine à partir de son produit d'oxydation : c'est le système méthionine sulfoxyde reductase (Msr) qui fait intervenir la thioredoxine et nécessite du NADPH, H⁺ (**Bennefont, 2003**).

Ce système a montré une efficacité diminuée avec l'âge chez l'animal, ce qui pourrait contribuer à l'augmentation de la concentration du sulfoxyde de méthionine.

Les protéines carbonylées constituent le marqueur le plus utilisé pour mettre en évidence l'oxydation des protéines au cours du vieillissement ; elles s'accumulent notamment au niveau des fibroblastes, mais aussi d'autres types cellulaires, de façon exponentielle avec l'âge (**Moskovitz et al., 2002**).

Leur mise en évidence repose sur la réactivité des groupements carbonyles avec la dinitrophenylhydrazine (DNPH), conduisant à une di-nitro-phenyl-hydrazone. Des dosages ELISA ont été commercialisés, ce qui améliore la praticabilité de ces tests.

Cette augmentation des protéines carbonylées serait due non seulement à une accumulation d'agressions radicalaires, mais aussi à une diminution d'activité du protéasome, système permettant la dégradation des protéines modifiées, en particulier oxydées (**Moskovitz et al., 2002**).

Le dosage des produits d'oxydation de l'ADN nécessite quant à lui de grandes précautions au niveau de l'extraction et de l'hydrolyse de l'ADN, afin de ne pas avoir d'oxydation artificielle au cours de ces étapes préliminaires (**Cadet et al., 2005**).

Les techniques les plus fiables de dosage des bases oxydées reposent sur la CLHP avec détection électrochimique.

Toutefois, certains kits ELISA ont été commercialisés, en particulier pour le dosage de la 8-hydroxy-desoxy-guanosine (8OHdG).

Celle-ci peut être dosée dans l'urine, ou sa concentration diminue avec l'âge, et reflète alors à la fois l'oxydation de l'ADN et l'activité des enzymes de réparation (**Cadet et al., 2005**).

Parmi les produits de peroxydation lipidique, les substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBARS ou «thiobarbituricacid-reactive substances») ont été le premier marqueur utilisé apportant un argument à la théorie radicalaire du vieillissement. Ainsi, Poubelle *et al* Observèrent une corrélation positive significative entre les TBARS plasmatiques et l'âge de sujets présumés sains (entre 19 et 90 ans)(Cadet *et al.*, 2005).

Cette augmentation significative des TBARS plasmatiques avec l'âge a été observée par d'autres auteurs, en particulier Junquiera *et al.* qui avaient étudié en parallèle les systèmes antioxydants de sujets âgés de 20 à plus de 70 ans.

Depuis, ce marqueur a été soumis à de nombreuses critiques : le dosage des TBARS est en effet un dosage permettant une évaluation globale de la peroxydation lipidique, par un dosage non spécifique (dosage d'un ensemble de produits aldéhydiques) ; les conditions du dosage (condensation à chaud avec l'acide thiobarbiturique) peuvent occasionner une production artificielle de TBARS ; certaines améliorations de la spécificité et la sensibilité peuvent cependant être apportées, comme la séparation par CLHP et la détection fluorimétrique (Cadet *et al.*, 2005). Malgré ces critiques, la relativement bonne faisabilité du dosage peut éventuellement être un argument pour son utilisation lors d'un suivi longitudinal de sujets.

Un marqueur beaucoup plus récent de la peroxydation des lipides est représenté par les isoprostanes, dont la structure est très proche de celle des prostaglandines ; ils résultent de l'attaque radicalaire de l'acide arachidonique et constituent des marqueurs terminaux stables de la peroxydation des lipides. Ils se forment au sein des membranes et des lipoprotéines et en sont libérés par une phospholipase, puis sont éliminés dans l'urine ou il est donc possible de les doser. Il a ainsi été observé une relation hautement significative entre l'excrétion urinaire d'un isoprostane, le 8-isoPGF₂ α , et l'âge chez des sujets entre 10 et 80 ans ($r=0,81$; $p<0,001$), bien qu'une autre étude n'ait pas permis de retrouver des résultats comparables (Wang *et al.*, 2005).

Le dosage au niveau plasmatique requiert des étapes assez lourdes de purification avant de pratiquer le test ELISA commercialisé ; le dosage dans l'urine est une alternative plus simple puisqu'il est alors possible de s'affranchir de ces étapes préliminaires (Wang *et al.*, 2005).

III-1-2-6. Intérêt de la détermination du stress oxydant chez le sujet âgé :

La question peut être posée de l'intérêt d'évaluer l'état de stress oxydant chez le sujet âgé et par quels moyens. Nous avons vu que le stress oxydant résulte d'un excès de production

d'ERO et/ou d'un déficit de substances antioxydantes. Il est particulièrement important de pouvoir dépister certaines de ces déficiences, en particulier en vitamine C et en sélénium, et ceci requiert alors des techniques de dosage spécifiques. En revanche, une première approche peut être apportée par l'utilisation de méthodes plus globales et d'utilisation aisée, telles que l'évaluation du pouvoir antioxydant total (**Bonnefont, 2007**).

Une fois la déficience en un ou plusieurs antioxydants dépistée, une supplémentation peut être envisagée, en sachant qu'il faut toujours maintenir au maximum un équilibre entre les différents constituants de la défense antioxydante, puisqu'ils agissent de façon concertée (l'exemple classique est celui de la vitamine E, régénérée par la vitamine C).

Le suivi de l'état de stress oxydant va alors trouver un autre intérêt, celui du suivi de la supplémentation.

En pratique, étant donné la multitude de facteurs entrant en jeu dans le bilan du stress oxydant, il faudra pouvoir apprécier également le versant oxyde, c'est-à-dire doser certains produits d'oxydation. En ce qui concerne la peroxydation lipidique, le dosage des TBARS, non spécifique, ne permet qu'une appréciation globale et ne peut être considéré que pour un suivi longitudinal des patients, chaque sujet étant ainsi son propre témoin.

De nouveaux marqueurs plus spécifiques peuvent trouver leur intérêt : c'est le cas des isoprostanes, pour lesquels la commercialisation de kits de dosage facilite la détermination en pratique courante, surtout si l'on fait appel au dosage urinaire qui ne requiert pas d'étapes de purification préalables.

La détermination du stress oxydant chez le sujet âgé peut alors être considérée comme un complément d'analyses biologiques permettant la surveillance de l'état des défenses antioxydantes participant au maintien d'un niveau contrôlé de stress oxydant (**Bonnefont, 2007**).

Conclusion

Conclusion :

Les radicaux libres sont des composés chimiques réactifs produits quotidiennement par l'organisme suite au métabolisme aérobie (nécessitant de l'oxygène) et au fonctionnement normal du système immunitaire. La production de ces composés est donc non seulement normale, mais la conséquence nécessaire de la respiration. Cependant, si l'accumulation des radicaux libres n'est pas contrôlée, ceux-ci peuvent endommager les cellules saines. Les membranes entourant les cellules du corps sont les cibles privilégiées des radicaux libres.

Les cellules immunitaires sont particulièrement susceptibles d'être endommagées par les radicaux libres : leur membrane est constituée de grandes quantités d'acides gras polyinsaturés, relativement fragiles.

Le corps dispose de plusieurs moyens pour combattre les radicaux libres, et notamment des enzymes anti oxydantes et divers facteurs endogènes.

Ces antioxydants internes peuvent être remplacés par des antioxydants issus de l'alimentation, comme la vitamine E, le bêta-carotène et la lutéine.

Les cellules immunitaires disposent d'une plus grande quantité de vitamine E que les autres cellules. Il se trouve que ces cellules, comme nous l'avons déjà dit, sont composées d'importantes quantités d'acides gras polyinsaturés qui les rendent plus sensibles à l'oxydation.

La vitamine E est donc peut-être un moyen pour les cellules immunitaires de se protéger des dommages causés par les radicaux libres.

A ce jour notre thème n'est pas encore élucidé c'est pour ça on a choisies pour bien comprendre signifie quoi le stress oxydant et leur effet sur le système immunitaire.

Références Bibliographiques

- Andrejv F., David S. & Ralf H. (2005)** . Site-specific synthesis of Amadorimodified peptides on solid phase . *Journal of Peptide Science*, 12: 389 – 395.
- Angelos MG., KutalaVK., Torres CA., Hegstoner JD., Mohammed M. & Oerannan,K. (2005)**. Hypoxic reperfusion of the ischemic heart andv oxygen radiacal generation. *.Am J. Physiol Heart Circ Physiol*, 290: 341- 347.
- Arsenijevic D., Onuma H., Pecqueur C., Raimbault S., Manning BS, Miroux B., Couplan E., Alves-Guerra MC., Gubern M., Surwit R., Bouillaud F., Richard D., Collins S. & Ricquier D. (2000)**. Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Genet*, 26: 435- 439.
- Ashok B. & Ali R. (1999)**. The aging paradox: free radical theory of aging. *Exp Gerontol*, 34:293–303.
- Balaban RS, Nemoto S. & Finkel T. (2005)**. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, 120: 483-495.
- Beaudeau J., Delattre P., Therond D., Bonnefont-Rousselot A. & Legrand J. (2006)**. Peynet ; Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose. *Oxidative stress in the antherosclerotic process. Immuno-analyse & Biologie spécialisée*, 21:144-150.
- Blandine G. (2006)**. Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODiN. Université Joseph Fourier - Grenoble 1 sciences-technologie-sante. P 159.
- Bonnefont-Rousselot D., THEROND P., Beaudeau JL., Peynet J., Legrand A. & Delattre J. (2001)**. Vieillissement et stress oxydant. Quels marqueurs potentiels ? *Ann Biol Clin*; 59:453-459.
- Bonnefont-Rousselot D. (2003)**. Produits de glycation avancée. Production et signification physiopathologique. *Cah Nutr Diét*, 38 : 122- 129.
- Bonnefont-Rousselot D. (2007)**. Stress Oxydant et vieillissement. *Spectra Biologie*. N157.
- Brand DM., Turner N., Ocloo A., Else PL. & Hulbert AJ. (2003)**. Proton conductance and fatty acyl composition of liver mitochondria correlates with body mass in birds. *J. Biochem*, 376:741-748.
- Brownlee M. (2005)**. The Pathobiology of Diabetic Complications. A Unifying Mechanism. *Diabetes*, 54:1615-1625.
- Brrunk UT. & TermanA. (2002)**. Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radical Biol Med*, 33: 611-619.

- Chandler ML. & Gunn-Moore DA. (2004).** Nutritional status of canine and feline patients admitted to a referral veterinary internal medicine service. *J. Nutr*, 134 : 2050S-2052S.
- Cadet J., Douki T., Gasparutto D. & Ravanat JL. (2005) ;** Reactions d'oxydation et cibles biologiques : acides nucleiques. In : Radicaux libres et stress oxydants. Aspects biologiques et pathologiques, 7: 169-243.
- Chew BP., Park JS., Weng BC., Wong TS., Hayek MG. & Reinhart GA. (2000).** Dietary β -carotene is taken by blood plasma and leukocytes in dogs. *J. Nutr*,c, 130: 1788-1791.
- Chew BP., Park JS., Weng BC., Wong TS., Hayek MG. & Reinhart GA. (2004).** Dietary β -carotene is taken by blood plasma and leukocytes in dogs. *J. Nutr*,c, 130: 1788-1791.
- Defraigne JO., Pincemail J. (2007).** Stressoxydant et antioxydants: mythes et réalités .*Rev Med Liege*, 62 : 4.
- Delattre J., Therond P. & Bonnefont-Rousselot D. (2005).** Especies reactivas l'oxygene, antioxydants et vieillissement. In : Radicaux libres et stress oxydants. Aspects biologiques et pathologiques. chap, 10 : 281-309.
- DeLeo FR., Allen LA., Apicella M. &. (1999).** NADPH oxidase activation and assembly during phagocytosis. *J. Immunol*, 163 : 6732-6740.
- Di mauro S. & Schon EA. (2003).** Mitochondrial respiratory - Chain diseases. *The New England Journal Medecine*, 348: 2656-2668.
- Droge W. (2002).** Aging related changes in the thiol/disulfi de redox state: implications for the use of thiol antioxydants. *Exp. Gerontol*, 37: 1333- 1345.
- Droge W. (2002).** Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 82: 47-95.
- Ducros V., Ferry M., Faure P., Belin N., Renversez JC., Ruffieux D. & Favier A. (2000).** Distribution of selenium in plasma of French women relative to age and selenium status. *Clin Chem*, 46: 732-733.
- Durackova, Z., Djrolo F., Hougbe, H., Avode G., Attoulou, V., Addra, B., Eiserich JP., Patel RP. & O'Donnell VB. (2008).** Pathophysiology of nitric oxide and related species free radical reactions and modification of biomolecules. *Mol Aspects Med*, 19: 221-357.

- Echtay KS., Esteves TC., Pakay JL., Jekabsons MB., Lambert AJ., Portero-Otin MP., Amplona R., Vidal-Puig AJ., Wang S., Roebuck SJ. & rand MD. (2003).** Asignalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. *J. Embo*, 22; 4103-4110.
- Evans L., Goldfine I D., Maddux B. & Grodsky G M. (2003).** Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance adysfunction? *Diabetes*, 52:1-8.
- Evans WJ. (2000).** Vitamin E, vitamin C, and exercise. *Am J. Clin Nutr* 72: 647S-65.
- Fang YZ. , Yang S. & Wu G. (2002).** Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18:872- 879.
- Favier A. (2003).** Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 5: 108-115.
- Favier A. (1997).** Le stress oxydant: intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. *Ann Biol Clin*, 55(1): 9-16.
- Han D., Antunes F., Canali R., Rettori D. & Cadenas E. (2003).** Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J. Biol Chem*, 278:5557-5563.
- Giuseppina B., Ann MS. & Raffaele DeC. (2004).** Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovascular Research*, 63: 582- 592.
- Hansford RG., Hogue BA. & Mildaziene V. (1997).** Dependence of H₂O₂ formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *J. Bioenerg Biomembr*, 29: 89-95.
- Harman D. (2000).** Aging: overview. *Ann N Y Acad Sci*, 928:1-21.
- Harper EJ., Devlin P., Heaton P. & Koelsh S. (2001).** Feline immunocompetence and the role of antioxidants. *North American Veterinary Conference Proceedings*, 249-251.
- Hayek MG., Massimino SP., Burr JR. & Kearns RJ. (2000).** Dietary vitamin E improves immune function in cats. In: Reinhart GA, Carey D, editors. *Recent advances in canine and feline nutrition*. Ohio. 582p.
- Heaton PR., Ransley R., Charlton CJ., Mann SJ., Stevenson J, Smith BHE., Rawlings J. & Harper EJ. (2002).** Application of single-cell gel electrophoresis (Comet) assay for assessing levels of DNA damage in canine and feline leukocytes. *J. Nutr*, 132: 1598S-1603S.

Hoshi T. & Heinemann S. (2001). Regulation of cell function by methionine oxidation and reduction. *J. Physiol*, 53 : 1-11

Huang TT., Carlson EJ., Kozy HM., Mantha S., Goodman SI., Ursell PC. & Epstein CJ. (2001). Genetic modification of prenatal lethality and dilated cardiomyopathy in Mn superoxide dismutase mutant mice. *Free Radic Biol Med*, 31: 1101-1110.

Human D. (2002). Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *Sci. Aging Knowl. Environ*, 37 ; 14.

Janet Y., UriuAdamsa T., Robert B., Ruckera JF. & Commissoa CLK. (2005). Diabetes and dietary copper alter ⁶⁷Cu metabolism and oxidant defense in the rat. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16: 312– 320.

Ji LL Fu R. & Mitchell EW. (1999). Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity. *J. Appl Physiol*, 73:1854-1859.

Junqueira VBC., Barros SBM., Chan SS., Rodrigues L., GiavArotti L., Abud RL. & Deucher GP. (2004). Aging and oxidative stress. *Mol Aspects Med*, 25: 5-16.

Kayo T., Allison DB., Weindruch R & Prolla TA. (2001). Influences of aging and caloric restriction on the transcriptional profile of skeletal muscle from rhesus monkeys. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98 : 5093-8.

Ketan PM., Santosh LV., Ramesh K G. & Parloop AB. (2007). Effects of Coenzyme Q10 On Lipid Levels And Antioxidant Defenses In Rats With Fructose Induced Hyperlipidemia And Hyperinsulinaemia. *The Internet Journal of Pharmacogy*, 5: 1531-2976.

Kim HW., Chew BP. & Wong TS. (2000). Modulation of humoral and cell-mediated immune responses by dietary lutein in cats. *Vet Immunol Immunopathol*, 73 : 331-341.

Kirkwood TB. (2005). Understanding the odd science of aging. *Cell*, 120 : 437-47.

Knight TR., Kurtz A., Bajt ML.,Hinson JA. & Jaeschke H. (2001). Vascular and hepatocellular peroxynitrite formation during acetaminophen-induced liver injury:role of mitochondrial oxidant stress. *Toxicol Sci*, 62:212–220.

Kohen., R. & Nyska A. (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, 30: 620-650.

Kowaltowski AJ., Castilho RF. & Vercesi AE. (2001). Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett*; 495: 12-15.

- Krause KH. (2004).** Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases. *J. pn J Infect Dis*, 57: S28-29.
- Lane N. (2003).** Oxygen, the molecule that made the world. New York : Oxford University Press. 366 p.
- Lee AY. & Chung SS. (1999).** Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *Faseb Journal*, 13: 23–30.
- Lehucher-Michel JF., Lesgards O., Delubac P., Stocker P. & Durand M. (2001).** Prost ; Stress oxydant et pathologies humaines. *Press Med*, 30 :1076-1081.
- Lehucher-Michel MP., Lesgards JF., Delubac O., Stocker P., Durand P. & Prost M. (2001).** Stress oxydant et pathologies humaines. *La Presse médicale*, 30: 1076-1081.
- Levine RL. (2002).** Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med*, 32: 790-796.
- Liu Y., Fiskum G. & Schubert D. (2002).** Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J. Neurochem.*, 80:780-787.
- Mates JM., Perez-Gomez C. & Nunez de Castro I. (1999).** Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem*, 32: 595-603.
- Mitchell P. (2000).** Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, 191: 144-148.
- Morel Y., Mermoud N. & Barouki R (1999).** An autoregulatory loop controlling CYP1A1 gene expression: role of H₂O₂ and NFI. *Mol Cell Biol*, 19: 6825-6832.
- Moskovitz J., Yim MB., Chock PB. (2002).** Free radicals and disease. *Arch Biochem. Biophys*, 397: 354-359.
- Murphy MP. (1999).** Slip and leak in mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta*, 977:123- 141.
- Nomura K., Imai H., Koumura T., Kobayashi T. & Nakagawa Y. (2000).** Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia-induced apoptosis. *J. Biochem*, 351: 183-193.
- Okado-Matsumoto A. & Fridovich I. (2001).** Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J. Biol Chem*, 276: 38388- 38393.
- Powers SK and. & Lennon SL. (1999).** Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc*, 58: 1025-1033.

- Ray AL., Sembra RD., Walston J., Ferrucci L., Cappola AR., Ricks MO., Xue QL. & Fried L. (2006).** Low serum selenium and total carotenoids predict mortality among women living in the community: the women's health and aging studies. *J. Nutr*, 136: 172-176.
- Robert B. (2006).** Stress Oxydantet vieillissement. *Medecine/Sciences*, 22 : 266-72.
- Rolfe DF. & Brown GC. (1997).** Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev*, 77: 731-758.
- Sanz A., Caro P. & Barja G. (2004).** Protein restriction without strong caloric restriction decreases mitochondrial oxygen radical production and oxidative DNA damage in rat liver. *J. Bioenerg Biomembr*, 36: 545-552.
- Sentman ML., Granstrom M., Jakobson H., Reaume A., Basu S. and Marklund S.L. (2006).** Phenotypes of mice lacking extracellular superoxide dismutase and copper- and zinc- containing superoxide dismutase. *J Biol Chem* , 281: 6904-6909.
- Stechmiller JK., Childress B. & Porter T. (2004).** Arginine immunonutrition in critically ill patients : a clinical dilemma. *Am J Crit Care*, 13: 17-23.
- Stief TW. (2000).** The blood fibrinolysis/deep-sea analogy: a hypothesis on the cell signals singlet oxygen/photons as natural atithrombotics. *Thromb Res*,99:1–20.
- Stief TW. (2003).**The physiology and pharmacology of singlet oxygen. *Med Hypoth*, 60:567–572.
- Suchner U., Heyland DK. & Peter K. (2002).** Immunomodulatory actions of arginine in the critically ill. *Br J.Nutr*; 87 Suppl, 1 : S121-132. Tankersley RV. Amino acid requirements of herpes.
- Sohal RS, Mockett RJ. & Orr WC. (2002).** Mechanisms of aging : an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radic Biol Med*, 33 : 575-86.
- Thannickal VJ . & Fanburg BL. (2000).** Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J. Physiol Lung Cell Mol Physio*,l 279: L1005-1028.
- Tilg H. & Moschen AR. (2006).** Adipocytokines : mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*, 6 : 772-783.
- Traxer B., Huet., J. Poindexter, C. Pak, M. Pearle. (2003).** Effect of ascorbic acid consumption on urinary stones risk factors. *J. Urol*, 17: 397-401.
- Turrens JF. (2003).** Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol*, 552 :335-344.

- Uribarri J. & Tuttle K.R. (2006).** Advanced Glycation End Products and Nephrotoxicity of High-Protein Diets. *Clin J. Am Soc Nephrol*, 1: 1293–1299.
- Vergely C., Goirand F., Ecartot-Laubriet A., Renard C., Moreau JC. & Wiernsperger NF. (2003).** Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy. *Diabetes Metab*, 29:579-85.
- Vidal-Puig A J., Grujic D, Zhang CY., Hagen T., Boss O., Ido Y., Szczepanik A., Wade J., Mootha V., Cortright R., Muoio DM. & Lowell BB. (2000).** Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. *J. Biol Chem*, 275: 16258-16266.
- Virag L., Szabo E. & Gergely P. (2003).** Peroxynitrite-induced cytotoxicity : mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol Lett*; 140-141 : 113-124. beta- carotene absorption by blood plasma and leukocytes in domestic cats. *J. Nutr*, 130 : 2322-2325.
- Wang Z., Ciabattoni G., CRreminon C., Lawson J., Fitzgerald GA., Patrono C. & Maclouf J. (1995).** Immunological characterization of urinary 8- epi-prostaglandin F₂ α excretion in man. *J. Pharmacol. Exp. Ther*, 275: 94-100.
- Werstuck GH. (2006).** Molecular and cellular mechanisms by which diabetes Mellitus promotes the development of atherosclerosis. *Biochemistry of atherosclerosis* ed:S.K choma. Springer. Newyork, 284-297.
- Wiernsperger NF. (2003).** Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy. *Diabetes Metab*, 29:579-85.

Résumés

Résumé :

Dysfonctionnements du métabolisme de l'oxygène génèrent un excès d'espèces chimiques très réactives appelées «espèces réactives de l'oxygène» (ROS), parmi eux sont des radicaux libres (comme $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2\cdot^-$, $\text{RO}_2\cdot$), et des produits non-radicaux (comme H_2O_2 , RO_2H). Ces espèces, et en particulier les espèces radicalaires, créent les dommages oxydatifs sur les macromolécules biologiques (ADN, lipides, protéines), qui peuvent considérablement perturber la machinerie cellulaire.

Ainsi les radicaux libres ont des effets sur le système immunitaire, particulièrement dans la défense microbienne mais jusqu'à présent restent encore non élucidés.

Le stress oxydatif est impliqué dans de nombreuses pathologies (athérosclérose, diabète, maladies neurodégénératives, cancers ...) et dans le processus de vieillissement. Les antioxydants visent à dommages oxydatifs inhibant plus ou moins générés par les ROS. Afin de mieux comprendre les réactions induites oxy radical, radiolyse est une méthode très efficace.

Mots-clés : Radicaux Libres oxygénés, Dommages oxydatifs, antioxydants.

Abstract:

Dysfunctions of oxygen metabolism generate an excess of very reactive chemical species known as « reactive oxygen species » (ROS), among them are free radicals (like $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2\cdot^-$, $\text{RO}_2\cdot$), and non-radical products (like H_2O_2 , RO_2H). These species, and particularly the radical species, create oxidative damages on biological macromolecules (DNA, lipids, proteins), which can considerably disturb the cell machinery.

Oxidative stress is involved in numerous pathologies (atherosclerosis, diabetes, neurodegenerative diseases, cancer...) and in the aging process. Antioxidants aimed at more or less inhibiting oxidative damages generated by ROS. In order to better understand the oxy radical-induced reactions, radiolysis is a very efficient method.

Mots-clés Radicaux libres oxygénés, dommages oxydatifs, antioxydants, radiolyse.

Key-words: Oxygenated free radicals, oxidative damages, antioxidants.

ملخص :

الخلل في هدم الأوكسجين يولد فائض في الأنواع الكيميائية شديدة التفاعل تسمى "أنواع الأوكسجين التفاعلية ومن بين هذه الجذور الحرة ($\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, RO_2^{\cdot}) والمنتجات غير المتطرفة (H_2O_2 , RO_2H) .

ولا سيما الأنواع المتطرفة, تخلق ضرر تأكسدي على الجزيئات البيولوجية (ADN , الدهون، والبروتينات)، والجذور الحرة لها تأثيرات على الجهاز المناعي، خاصة في الدفاع ضد الميكروب ولكن حتى الآن لا تزال دون حل.

كما يشارك الاجهاد التاكسدي في العديد من الأمراض (تصلب الشرايين، والسكري، والأمراض العصبية والسرطان...) وعملية الشيخوخة . المواد المضادة للأكسدة تعمل على منع الضرر التأكسدي الناتج عن العناصر الاكسجينية النشطة .

الكلمات الرئيسية: الجذور الحرة الأوكسجينية ، الضرر التأكسدي ومضادات الأكسدة .