

CHAPITRE 3

STRESS OXYDATIF ET ANTIOXYDANTS

3.1 Stress oxydatif

3.1.1 Historique

Les radicaux libres, les espèces réactives à l'oxygène (ROS), le stress oxydant et les antioxydants deviennent des termes de plus en plus familiers pour les professionnels de la santé et même pour le grand public. Ces notions ne sont toutes fois pas nouvelles puisqu'il faut rappeler que dans le milieu des années cinquante, R. Gerschman puis D. Hartman évoquaient déjà la toxicité de l'oxygène et la théorie dite « Free radical theory » pour expliquer le processus de vieillissement. En 1969, les Américains McCord et Fridovich isolent à partir des globules rouges humains un système enzymatique antioxydant de la SOD (Super-oxyde dismutase), démontrant ainsi pour la première fois que notre organisme produit bel et bien des ROS dont il doit se protéger. Cette découverte sera le point de départ d'une intense recherche scientifique dans le monde entier sur le stress oxydant et les antioxydants (Favier *et al.*, 2003).

3.1.2 Définition du stress oxydant

Le stress oxydant provient d'un déséquilibre entre la production des radicaux libres (RL) et les capacités antioxydantes cellulaires. Produits en excès, les RL vont altérer les macromolécules, favorisant ainsi la fragmentation de l'ADN, la peroxydation lipidique ou la carbonylation des protéines (Hokayem *et al.*, 2012).

Le stress oxydatif, dénommé également stress oxydant, résulte d'un déséquilibre de la balance « pro-oxydants – antioxydants » en faveur des oxydants, ce qui se traduit par des dommages oxydatifs de l'ensemble des constituants cellulaires : les lipides avec une perturbation des membranes cellulaires, les protéines avec l'altération des récepteurs et des enzymes, les acides nucléiques avec un risque de mutation et de cancérisation (Sergent *et al.*, 2001) (figure 3.1).

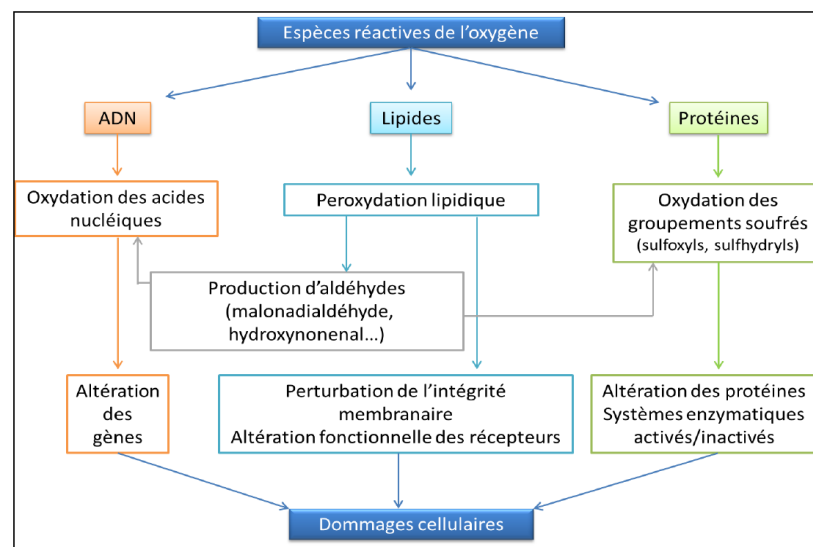


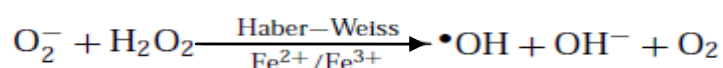
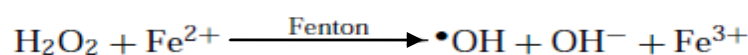
Figure 3.1 : Les différentes cibles des Espèces Réactives de l'Oxygène (Poisson, 2013)

3.1.3 Radicaux libres

Les espèces réactives oxygénées (ROS), ou radicaux libres (RL), sont des atomes ou molécules possédant un ou plusieurs électrons célibataires, ce que les rend très instables. Elles tendent, ainsi à réagir avec de nombreux composés, et notamment les macromolécules situées à proximité de leur site de génération (Hokayem et *al.*, 2012).

Les radicaux libres impliquant un ou des atomes d'oxygène se nomment espèces réactives de l'oxygène (ERO) (tableau 3.1). L'anion superoxyde (O_2^-) est la forme primaire des ERO et est formée par l'addition d'un électron à l'oxygène moléculaire (O_2). L'anion superoxyde peut ensuite être converti en ERO secondaires telles que le radical hydroxyle ($\cdot OH$), le radical peroxyde ($ROO\cdot$) ou le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), ce dernier n'étant toutefois pas un radical libre puisqu'il ne contient pas d'électrons non appariés. Les radicaux libres impliquant plutôt un atome d'azote se nomment espèces réactives de l'azote, le monoxyde d'azote ($NO\cdot$) et le peroxyde d'azote ($ONOO\cdot$) étant deux espèces bien connues (Tremellen, 2008).

Le radical $\cdot OH$, considéré comme un des plus réactifs (durée de vie limitée à quelques nanosecondes) est obtenu par les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss mettant en jeu l' H_2O_2 et l' O_2^- . Elles sont catalysées par le fer:



Le fer est essentiel dans les processus d'oxydation soit indirectement en catalysant les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss soit directement sous la forme d'espèces de type ferryl ou perferryl ($Fe^3+O_2^-$) (Sergent et *al.*, 2001).

Tableau 3.1 : Les espèces réactives de l'Oxygène (Migdal, 2011)

Espèces Réactives de l'Oxygène		Réaction
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot -}$	$O_2 + e^- \longrightarrow O_2^{\cdot -}$
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2	$O_2^{\cdot -} + e^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2$
Radical hydroxyle	$HO\cdot$	$H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow HO\cdot + HO\cdot + Fe^{3+}$ (1) $H_2O_2 + O_2^{\cdot -} \longrightarrow O_2 + HO\cdot + HO^-$ (2) $H_2O_2 + H_2O_2 \longrightarrow 2 H_2O + O_2$ $H_2O_2 + 2 GSH \longrightarrow 2 H_2O + GSSG$
Radical Peroxyle	$RO_2\cdot$	$R\cdot + O_2 \longrightarrow RO_2\cdot$
Hydroperoxyde	RO_2H	$RO_2\cdot + RH \longrightarrow RO_2H + R\cdot$

La réaction (1) correspond à la réaction de Fenton, et la réaction (2) à la réaction d'Haber Weiss. O_2 : oxygène ; e^- : électron ; H^+ : ion hydrogène ; Fe^{2+} : ions ferreux, Fe^{3+} : ions ferriques, GSH : glutathion réduit ; GSSG : Glutathion oxydé ; HO^- : anion hydroxyde.

3.1.4 Sources des radicaux libres

Il existe deux sources de radicaux libres, le premier est endogène et le deuxième est exogène (figure 3.2).

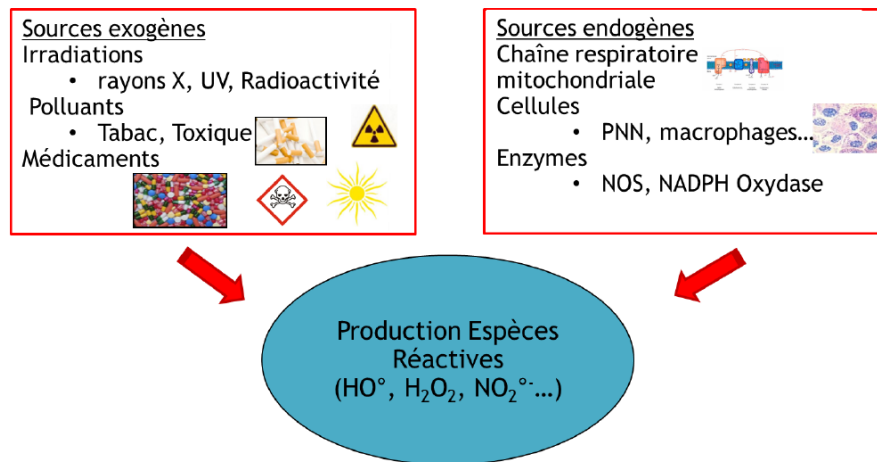


Figure 3.2 : Les origines des espèces réactives à l'oxygène (Poisson, 2013)

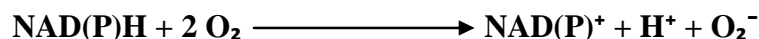
3.1.4.1 Synthèse physiologique des radicaux libres (source endogène)

La formation de ces RL survient essentiellement de la façon suivante: c'est l'activation de l'oxygène qui va amorcer la réaction soit par un gain d'énergie (rare), soit par un gain unitaire d'électron (voie de la réduction univalente de l'oxygène). Il s'agit là de formes dites activées de l'oxygène (RLO). Cette voie est la conséquence de l'auto-oxydation de nombreuses substances intracellulaires (épinéphrine, ferrédoxine, hémoglobine) ou lors de processus d'oxydoréduction le long des chaînes respiratoires des mitochondries ou des membranes des polynucléaires ou des macrophages (Amar, 2010).

Il existe également des systèmes enzymatiques qui, dans des conditions normales ou physiopathologiques, sont capables de produire l' $O_2^{\cdot -}$ et ses dérivés (figure 3.3). Ces systèmes enzymatiques sont : la NADH/NADPH oxydase(s), la xanthine oxydase, la cycloxygénase, la lipoxygénase, la glucose oxydase et la myéloperoxydase (Wassmann et *al.*, 2004).

- **Le système NAD(P) H oxydase(s)**

La NAD(P) H oxydase est une enzyme associée aux membranes des cellules du système cardiovasculaire qui catalyse la réduction d'un électron de l'oxygène en utilisant le NADH ou le NAD(P)H comme donneur d'électron (Griendling et *al.*, 2000) selon l'équation suivante:



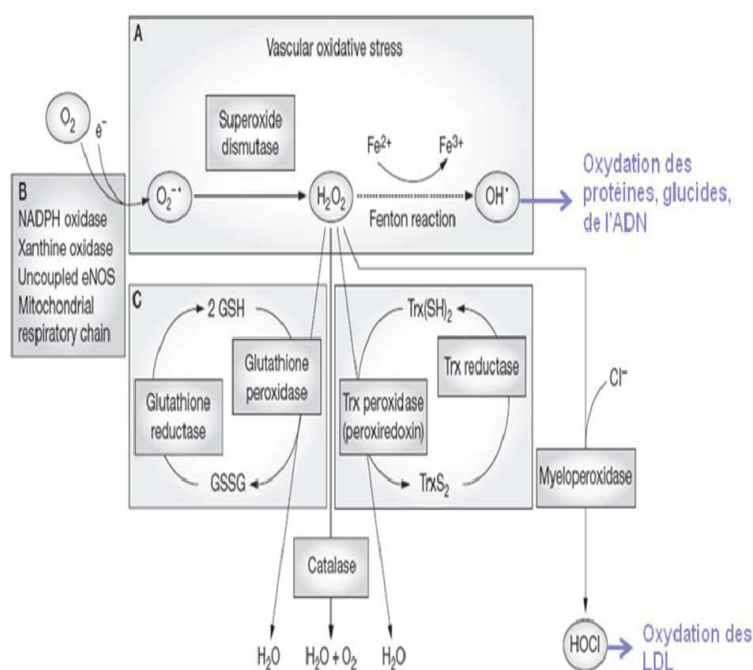
Plusieurs évidences expérimentales et cliniques ont révélé que l'enzyme NAD(P)H oxydase représente une source majeure d' $O_2^{\cdot -}$ dans les cellules endothéliales et vasculaires dans plusieurs conditions pathologiques associées à la dysfonction endothéliale, telles que l'athérosclérose, l'hypertension, le diabète mellitus et l'hypercholestérolémie (Bayraktutan, 2002).

- **La xanthine oxydase**

La xanthine oxydase est issue de l'oxydation et/ou de la conversion protéolytique de la xanthine déhydrogénase. La xanthine oxydase est exprimée dans les cellules vasculaires et elle peut circuler dans le plasma et se lier à la matrice extracellulaire des cellules endothéliales. Cette enzyme catalyse le métabolisme de la NADH, de l'oxygène moléculaire, de l'hypoxanthine et de la xanthine pour produire de l' O_2^- et du H_2O_2 (Wassmann et al., 2004).

- **L'enzyme eNOS Synthase de l'oxyde nitrique**

L'observation du fait que l'enzyme eNOS puisse, dans certaines conditions, devenir une source non négligeable de production d' O_2^- (contribuant à la dysfonction endothéliale) a été, pour le moins, très intrigante. En effet, il a été démontré, *in vitro*, que dans certaines conditions, caractérisées par une réduction des concentrations de L-arginine et/ou du cofacteur BH4 (Bayraktutan, 2002), l'enzyme eNOS présentait une activité NADPH oxydase et pouvait ainsi produire du O_2^- , un processus connu sous le nom de «NOS uncoupling reaction».



O_2^- : anion superoxyde ; H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène ; $\bullet OH$: radical hydroxyle ; GSH : glutathion réduit ; GSSG : glutathion oxyde ; HOCl : acide hypochloreux ; Trx : thioredoxine.

Figure 3.3 : Enzymes impliquées dans la génération et l'inactivation des ROS (Forstermann, 2008).

3.1.4.2 Source exogène

Les facteurs exogènes associés à une production accrue et/ou à une diminution de l'élimination de radicaux libres sont également très variés. Parmi ces facteurs, on retrouve (Bentes et al., 2004 ; Hu et al., 2006 ; Moller et al., 1996 ; Valko et al., 2005):

- L'alimentation (antibiotiques, alcool, aliments riches en protéines et/ou en lipides et/ou à indice glycémique élevé, faible consommation d'antioxydants) ;
- Le CO_2 atmosphérique ;

- Les polluants (fumée de cigarette, pollution atmosphérique (SO₂, NO₂, O₃, hydrocarbures), métaux occupationnels (métaux de transition tels le mercure, le fer, le cadmium et le nickel, arsenic, amiante) ;
- Les métaux lourds ayant une grande affinité avec les groupements sulfhydryles (-SH), ils inactivent facilement les antioxydants contenant du soufre ;
- Les médicaments (traitements contre le cancer, psoralène) ;
- Les radiations (ionisantes, ultraviolets, micro-ondes) ;
- L'absorption dermique (insecticides, médicaments).

3.1.5 Marqueurs biologiques du stress oxydant

Les ROS réagissent avec toute une série de substrats biologiques comme les protéines, les lipides et l'ADN (tableau 3.2). La mise en évidence des dérivés de l'oxydation de ces différents substrats seront donc des marqueurs de la présence d'un stress oxydant (Cano, 2007).

Tableau 3.2 : Exemples de produits dosés couramment pour la mise en évidence de l'oxydation d'une cible moléculaire donnée (Cano, 2007).

Cible	Produits	Exemples
Protéines	Protéines oxydées	Groupes carbonyle, tyrosine, hydroxylée
ADN	ADN oxydés	8-hydroxy-2'-déoxyguanosine
Lipides	Lipides peroxydés	Malondialdéhyde (MDA), isoprostanes

3.2 Antioxydants

L'organisme produit les radicaux libres, mais il s'en protège aussi avec le plus grand soin grâce à des molécules appelées antioxydants. Les antioxydants ont deux origines. Le corps sait en fabriquer certains comme l'acide urique ou la mélatonine. Mais une grande partie est apportée par l'alimentation grâce notamment aux fruits et légumes. Pour chaque radical libre produit par l'organisme il existe un antioxydant capable de le neutraliser. En offrant un électron, les antioxydants stabilisent les radicaux libres et les empêchent de poursuivre leur œuvre de destruction. Il s'agit donc à tout moment de maintenir l'équilibre entre les antioxydants et les radicaux libres (Céline cause, 2005).

3.2.1 Définition

Un antioxydant est une molécule qui diminue ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques. Il est défini par Halliwell comme « toute substance qui, en faible concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé, prévient ou ralentit l'oxydation de ce substrat » (Halliwell, 1999). C'est une molécule qui est capable de neutraliser les formes actives de l'oxygène et permet de maintenir au niveau de la cellule et de l'organisme des niveaux non cytotoxiques de radicaux libres (Perrin, 1992).

3.2.2 Principaux antioxydants

Les antioxydants sont des composés puissants qui peuvent neutraliser les radicaux libres impliqués dans la dégradation cellulaire, et nous aident ainsi à garder une vie active et saine. Quelques antioxydants sont fabriqués par le corps humain, d'autres tels les vitamines et polyphénols, doivent être apportés par notre alimentation (Pincemail et Defraigne, 2004) (figure 3.5). Ainsi, les antioxydants servent à contrôler le niveau des ROS pour minimiser le dommage oxydatif (Tang et Halliwell, 2010).

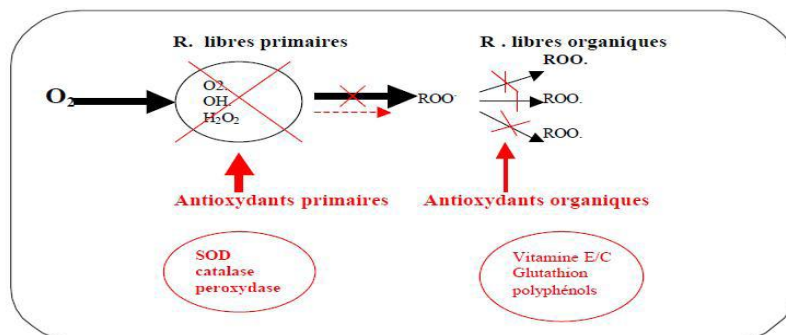


Figure 3.4 : Les systèmes de défense contre les radicaux libres (Binov, 2001).

3.2.2.1 Antioxydants endogènes

Les défenses antioxydantes de notre organisme peuvent se diviser : en un système de défense primaire composé d'enzymes et de substances antioxydantes (le superoxyde dismutase (SOD), la catalase, la glutathion peroxydase (GPx), l'acide urique, les protéines à groupement thiols et en un système de défense secondaire composé d'enzymes protéolytiques, des phospholipases, des ADN endonucléases et ligase et des macroxyprotéinases (Pincemail, 1998).

3.2.2.2 Les antioxydants naturels

Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène, l'acide ascorbique, le tocophérol ainsi que les oligo-éléments (Cu, Zn, Se, Mn, Cr) et les composés phénoliques. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures (Hadj Salem, 2009 ; Popovici et *al.*, 2009).

3.2.3 Mécanismes d'action des antioxydants phénoliques

Les polyphénols sont des antioxydants bien connus avec des effets protecteurs contre les maladies cardiovasculaires, le cancer, les maladies neurologiques et d'autres maladies dégénératives liées à l'inflammation (Parkar et *al.*, 2008 ; Silva et *al.*, 2007 ; Wang et *al.*, 2008).

Les mécanismes antioxydants des polyphénols sont basés sur leur pouvoir donneur d'hydrogène et chélateur d'ions métalliques. Ils peuvent former des complexes avec les métaux et inhibent l'oxydation lipidique initiée par un métal (figure 3.6) (Beauhaire et *al.*, 2005).

Les composés phénoliques participent à la lutte contre les RL car ils ont la propriété de pouvoir piéger de nombreuses espèces radicalaires, incluant les radicaux hydroxyles, pyroxyles et superoxydes. Les tanins condensés ont des propriétés antioxydantes puissantes qui combattent l'inflammation et pourraient faciliter la prévention de la progression d'ulcère de la colite (Clinton, 2009).

Les niveaux diététiques totaux des polyphénols sont approximativement 1g/j, le niveau le plus haut de tous les autres antioxydants diététiques connus, il est presque 10 fois plus que la vitamine C et 100 fois plus que la vitamine E et les caroténoïdes (Scalbert, 2005).

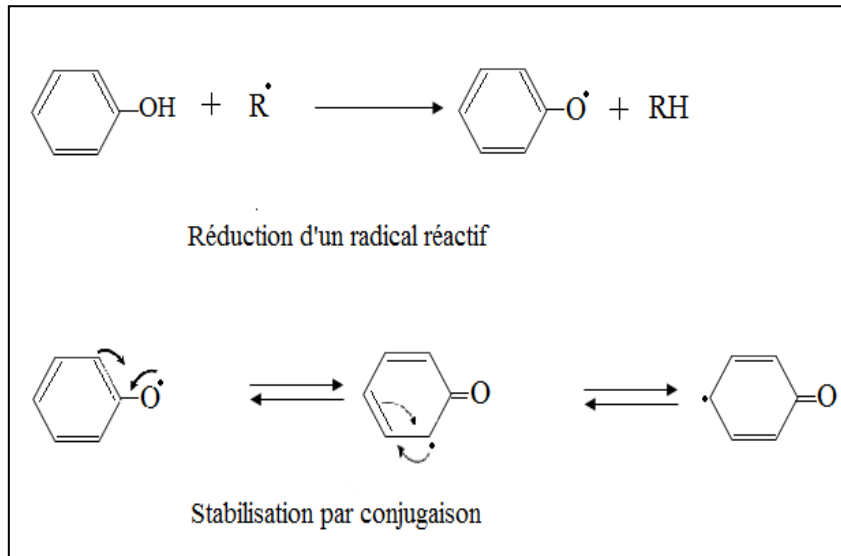


Figure 3.5 : Pouvoir antioxydant des polyphénols (Rolland, 2004).