

# EXPLORATIONS BIOCHIMIQUES DU STRESS OXYDATIF

3e Année de Médecine UE11- Cours de Biochimie

Dr S. ZATOUT

## Plan

1. Introduction
2. Définition
3. Les systèmes pro-oxydants et anti-oxydants
  - 3.1. Les systèmes pro-oxydants
    - 3.1.1. Différents types d'espèces réactives de l'oxygène
    - 3.1.2. Sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène
  - 3.2. Systèmes de défense antioxydants
    - 3.2.1. Systèmes antioxydants enzymatiques
    - 3.2.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques
4. Biomarqueurs du stress oxydatif
5. Stress oxydatif et diabète
6. Stress oxydatif et maladies cardiovasculaires
7. conclusion

# 1. INTRODUCTION

Le mécanisme du stress oxydatif a été décrit pour la première fois par l'Américain Denham Harman, avec sa théorie radicalaire du vieillissement. Il a aussi mis en évidence le rôle anti-oxydant des vitamines C et E et des bêta carotènes. Cette théorie selon laquelle des molécules très réactives, en réagissant et détériorant à chaque instant nos molécules les plus vitales finissent par provoquer non seulement le vieillissement mais aussi différentes pathologies. Ces molécules très réactives sont appelées radicaux libres ou espèces oxygénées réactives.

# 2. DEFINITION

Le stress oxydatif est un déséquilibre entre les oxydants, espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les capacités antioxydantes de l'organisme, résultant de l'augmentation de la production d'oxydants et / ou la réduction des antioxydants.

Le stress oxydatif est à l'origine de modifications oxydatives des macromolécules (lipides, protéines et acides nucléiques) de notre organisme.

L'accumulation de ces dommages oxydatifs nuit à la structure et la fonction des tissus entraînant l'apoptose ou la nécrose.

Le stress oxydatif joue un rôle important dans la genèse de nombreuses pathologies humaines (diabète, maladies cardio-vasculaires, cancer, maladies neurodégénératives...) ainsi que le vieillissement.

L'exploration du statut du stress oxydatif permet de comprendre les mécanismes physiopathologiques dont il est acteur, d'ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques et d'aider au diagnostic précoce des maladies.

# 3. LES SYSTEMES PRO-OXYDANTS ET ANTI-OXYDANTS

Le stress oxydant résulte d'un déséquilibre entre des systèmes producteurs d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et des systèmes anti-oxydants.

## 3.1. Les systèmes pro-oxydants

- Le rôle de l'oxygène, élément indispensable à notre survie, constitue le centre même du métabolisme énergétique des cellules en participant à la production d'ATP mitochondriale à partir des glucides, lipides et protéines.
- Plus de 95 % de l'oxygène présent dans la mitochondrie est consommé au niveau de la chaîne respiratoire par le biais de la phosphorylation oxydative.
- Ce processus de réduction de l'oxygène en eau n'est toutefois pas parfait, une fuite d'électrons au niveau du complexe I et III est à l'origine de la transformation de 2 à 3 % de l'oxygène en anion superoxyde ( $O_2^-$ ).
- L'anion  $O_2^-$  est le chef de file des ERO. En effet, cet anion va conduire au cours de véritable chaîne d'oxydoréductions à la formation de nombreuses autres ERO.
- Le rôle des ERO est très complexe car elles peuvent avoir un rôle **physiologique** ou un **effet toxique** en fonction de leur concentration.
- Dans des conditions normales, elles sont générées en faible quantité et jouent un rôle de :
  - ☐ Messagers secondaires capables de réguler le phénomène de l'apoptose ou d'activer des facteurs de transcription.
  - ☐ Le processus de fécondation, au cours duquel les spermatozoïdes sécrètent de grandes quantités d'ERO pour percer la paroi membranaire de l'ovule.
  - ☐ Le monoxyde d'azote radicalaire ou  $NO^-$  est un composé important ; il est notamment synthétisé par les cellules endothéliales, C'est une molécule labile très diffusible, dont les effets régulateurs

s'exercent sur la plupart des fonctions physiologiques de l'organisme (maintien du tonus vasculaire, neurotransmission, ...).

- ❑ Toutefois, le  $\text{NO}^\cdot$  peut former avec l'anion superoxyde le peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ), un oxydant puissant et diffusible, capable d'endommager de nombreuses molécules organiques.
- ❑ Formés en trop grande quantité, les ERO deviennent « pathologiques » en activant l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires, en outre, leur nature instable les rend très réactifs vis-à-vis de substrats biologiques et capables d'induire des modifications oxydatives délétères potentiellement impliquées dans l'apparition de pathologies.

### 3.1.1. Différents types d'espèces réactives de l'oxygène

Les ERO sont des atomes ou des molécules qui incluent :

- ✓ **Des espèces radicalaires (radicaux libres) dérivées de l'oxygène** : anion superoxyde  $\text{O}_2^\cdot$ , radical hydroxyle  $\text{OH}^\cdot$ , radical hydroperoxyde  $\text{HO}_2^\cdot$ , radical peroxyde  $\text{RO}_2^\cdot$ , radical alcoyle  $\text{RO}^\cdot$ , contenant un ou plusieurs électrons non appariés (électrons célibataires).
- ✓ **Des espèces non radicalaires dérivées de l'oxygène** : peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$ , acide hypochloreux  $\text{HOCl}$ , peroxynitrite  $\text{ONOO}^-$ .
  - Les radicaux libres se caractérisent par une instabilité énergétique, d'où leur demi-vie très courte (de la nano- à la milliseconde) et leur grande réactivité vis-à-vis des autres molécules.
  - Ils ne sont pas tous dérivés de l'oxygène, le monoxyde d'azote  $\text{NO}$ , radical libre dérive de l'azote.

### 3.1.2. Sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène

Les ERO sont produites dans :

- ❖ Les mitochondries,
- ❖ Les peroxysomes,
- ❖ Les lysosomes,
- ❖ Le réticulum endoplasmique,
- ❖ Le plasma,
- ❖ Les membranes
- ❖ Et de nombreux sites dans le cytosol.

Cette production est sous la dépendance de :

- ✓ Nombreux systèmes enzymatiques,
- ✓ Notre environnement (médicaments, polluants, UV, radiations ionisantes...).

Les sources enzymatiques majeures des ERO sont :

- ✓ Les imperfections de la chaîne respiratoire mitochondriale
- ✓ La NAD(P)H oxydase essentiellement localisée au niveau de la membrane plasmique cellulaire
- ✓ La xanthine oxydase,
- ✓ Enzymes de la voie de l'acide arachidonique (lipoxigénases, cyclo-oxygénases)
- ✓ Enzymes des lysosomes (la myéloperoxydase)
- ✓ Du réticulum endoplasmique lisse (cytochromes P450)
- ✓ Les oxydases des peroxysomes

- ✓ Les NO synthases.
- ✓ L'auto-oxydation des monoamines (dopamine, catécholamines), des protéines héminiques (hémoglobine), en présence de traces de métaux, peut également être à l'origine de la production d'ERO.

**NAD(P)H oxydase (NOX) :** La NAD(P)H oxydase est une enzyme membranaire (cellules phagocytaires, cellules endothéliales, cellules musculaires lisses...) catalysant la réduction mono-électronique de l'oxygène en anion superoxyde. Les NOX interviennent dans la régulation de nombreux processus physiologiques fondamentaux (la croissance cellulaire, la différenciation, l'apoptose et le remodelage du cytosquelette).

**Xanthine oxydase** La xanthine oxydase est une enzyme ubiquitaire catalysant l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine au cours du métabolisme des purines. Elle est activée dans les syndromes d'ischémie-reperfusion. • Enzymes de la voie de l'acide arachidonique L'action de la phospholipase A2 sur les phospholipides membranaires libère l'acide arachidonique dont la destinée est la synthèse des leucotriènes (action des lipoxygénases) d'une part, des prostaglandines et thromboxanes (action des cyclo-oxygénases) d'autre part. Ces voies de synthèse s'accompagnent de production de ERO.

• Enzymes des organites cellulaires- La myéloperoxydase (MPO) lysosomale est une enzyme leucocytaire, présente dans les polynucléaires neutrophiles, les monocytes et certains macrophages. Cette enzyme est responsable de la formation de l'acide hypochloreux, produit par l'oxydation de l'ion Cl<sup>-</sup> par le peroxyde d'hydrogène. Elle contribue ainsi aux défenses naturelles de l'hôte.

Les cytochromes P450, enzymes du réticulum endoplasmique, assurent l'oxydation de composés endogènes et exogènes (acides gras insaturés, xénobiotiques) lipophiles et génèrent l'anion O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> et/ou le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les ERO ainsi produits semblent intervenir dans la régulation redox de certaines fonctions essentielles du réticulum endoplasmique telles que l'adressage et la sécrétion des protéines.- Les oxydases des peroxysomes sont une source catalytique de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La catalase peroxysomale utilise le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formé pour oxyder une grande variété de substrats (acides gras, détoxification de molécules toxiques) dans certains tissus (foie, rein). • NO synthases (NOS) : Les NO synthases (endothéliale, neuronale, inductible) catalysent la formation du •NO à partir de la L-arginine. Le •NO produit par les vaisseaux sanguins est responsable d'une part de leur vasodilatation et d'autre part, empêche l'agrégation et l'adhérence des plaquettes et des leucocytes à la paroi vasculaire d'autre part.

### 3.2. Systèmes de défense antioxydants

La production physiologique des espèces réactives est maîtrisée par des systèmes de défense antioxydants :

- Enzymatiques
- Non enzymatiques

Les ANTIOXYDANTS sont adaptatifs par rapport au niveau des radicaux présents et permettent de maintenir la balance antioxydants/pro-oxydants en équilibre.

Les ANTIOXYDANTS sont présents dans tous les compartiments de l'organisme :

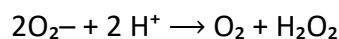
- intracellulaires
- membranaires
- extracellulaires

#### 3.2.1. Systèmes antioxydants enzymatiques

##### • Superoxyde dismutases (SOD):

Les SOD représentent une des premières lignes de défense antioxydante. Elle est présente dans presque tous les organismes

Ce sont des métalloprotéines (fer, manganèse, cuivre ou zinc) qui catalysent la dismutation mono-électronique du O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> en dioxygène et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

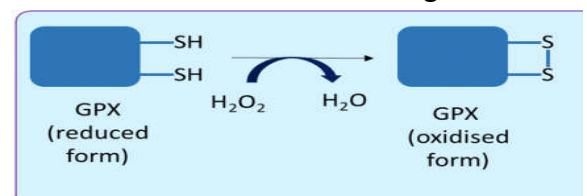
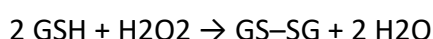


##### • Glutathion peroxydases (GPx)

Les glutathions peroxydases sont des sélénoprotéines qui constituent l'un des plus importants systèmes enzymatiques de protection.

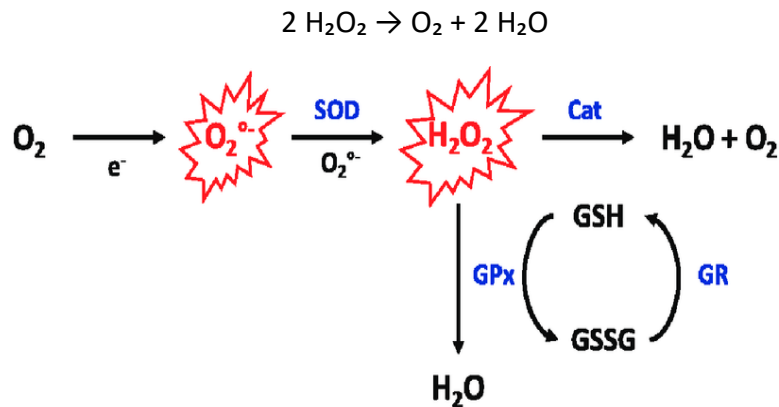
Elle est présente dans les liquides extracellulaires et dans les cellules au niveau du cytosol et des mitochondries.

Les peroxydases catalysent la réduction du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et en H<sub>2</sub>O en une réaction utilisant le glutathion (glutamyl-cystéinyglycine) réduit (GSH) comme co-substrat.



- **Catalase :**

La catalase est une enzyme héminique essentiellement présente dans les peroxysomes, dans les globules rouges et les hépatocytes. Elle catalyse la dismutation du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en oxygène moléculaire et une molécule d'eau.



### 3.2.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques

- **EXOGENES** : la vitamine E, la vitamine C, les caroténoïdes, et les oligoéléments (sélénium, zinc, manganèse).
- **ENDOGENES** : le glutathion, les protéines à groupements thiols, la bilirubine, l'acide urique.
- ✓ **SOLUBLES DANS L'EAU** : vont agir dans la fraction soluble de la cellule ou dans le plasma
- ✓ **LIPOSOLUBLES** : agissent au sein des membranes
  - Glutathion (GSH) : Son rôle est majeur dans la détoxification des xénobiotiques et des ERO. C'est aussi le cofacteur des enzymes telles que la glutathion peroxydase.
  - Vitamines (Vitamine E, Vitamine C, Vitamine A) : un excellent piègeur des EOA, empêchent essentiellement la peroxydation des lipides en piégeant les radicaux peroxydes.
  - Oligoéléments : (sélénium, zinc, manganèse) cofacteurs de nombreux systèmes enzymatiques de régulation du stress oxydatif.

## 4. Biomarqueurs du stress oxydatif

La mise en évidence d'un stress oxydatif accru permet de développer des stratégies diagnostiques, thérapeutiques et préventives vu son implication dans la survenue et les complications de nombreuses pathologies chez l'homme.

Ces marqueurs doivent être d'exécution analytique aisée.

Dosage doit faire appel à des méthodes non invasives, applicables au plasma ou sérum, aux éléments figurés du sang et à l'urine.

Ces marqueurs se répartissent selon quatre axes :

- 1) La détermination des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques ;
- 2) Le dosage des oligo-éléments ;
- 3) La mesure des dommages oxydatifs au niveau des lipides, de l'ADN et des protéines ;
- 4) L'identification de sources génératrices de stress oxydant (inflammation, hyperglycémie, hyperhomocystéinémie).

antioxydants	Mode d'action et intérêt du dosage	Valeurs de référence
vitamine C	piégeur de radicaux libres marqueur de la consommation de fruits valeur plasmatiche basse associée avec l'apparition de diverses pathologies	H : 8,6 à 18,83 µg / ml F : 6,21 à 15,18 µg / ml
vitamine A	inhibiteur de la peroxydation lipidique action de synergie avec la vitamine C (rapport idéal de concentration)	8 à 15 mg / l
glutathion réduit glutathion oxydé rapport GSH/GSSG	marqueur de la présence d'un stress oxydant action de synergie avec la vitamine C et l'α-tocophérol	717 à 1110 µMol/litre 1,17 à 5,32 µMol/litre 156 à 705
acide urique	antioxydant possédant la plus forte réactivité avec les radicaux libres	H < 70 mg / litre F < 60 mg / litre
superoxyde dismutase (SOD)	élimination de l'anion superoxyde	785 à 1570 UI / g Hb
glutathion peroxydase (GPx)	élimination du peroxyde d'hydrogène et des peroxydes lipidiques reflet d'une adaptation au stress oxydant facteur de risque cardiovasculaire	H : 20-56 UI / g Hb F : 26-58 UI / g Hb

Oligoelement	Mode d'action et intérêt du dosage	Valeurs de référence
sélénium	co - facteur des différentes GPx rôle dans l'immunité	94-130 µg / litre
cuivre	Co - facteur de la SOD facteur prooxydant à forte concentration	H : 0,7-1,40 F : 0,8-1,55 mg / litre
zinc	co - facteur de la SOD inhibe les réactions d'oxydation induites par le cuivre-rôle dans l'immunité	0,7-1,20 mg / litre

Marqueurs d'oxydation	Mode d'action et intérêt du dosage	Valeurs de référence
<b>peroxydes lipidiques:</b>	L'oxydation des lipides, en particulier les acides gras polyinsaturés, mais aussi du cholestérol par les ERO	
LDL oxydées	facteur de risque cardiovasculaire (LDL petites et denses plus susceptibles à l'oxydation)	< 500 ng / ml
anticorps contre les LDL oxydées	réponse de l'organisme à la production de LDL oxydées facteur de risque cardiovasculaire	200-600 UI / litre
Isoprostanes	sont des produits d'oxydation de l'acide arachidonique	en développement

Marqueurs d'oxydation	Mode d'action et intérêt du dosage	Valeurs de référence
8 hydroxy - déoxyguanosine	La guanine étant la base la plus sensible à l'oxydation son dosage urinaire correspond à une évaluation globale des dommages oxydatifs du DNA et de développement du cancer	0-16 µg / litre
Protéines carbonylées	Les dérivés carbonylés des protéines sont des dérivés ubiquitaires résultant de l'oxydation des chaînes latérales de certains acides aminés (lysine, arginine,...) Des taux plasmatiques et tissulaires élevés sont rencontrés dans de nombreuses pathologies telles que les maladies neurodégénératives et le diabète.	
Produits de glycation avancés Advanced Glycated Endproducts (AGE)	une glycation par un ose des produits de glycation avancés(AGE) dont certains sont obtenus par voie oxydative. marqueur de la glycolisation des protéines dans le diabète, l'athérosclérose, les maladies rénales et l'arthrite rhumatoïde	

Sources d'oxydation	Mode d'action et intérêt du dosage	Valeurs de référence
fer libre	fer toxique conduisant à une augmentation accrue de radicaux libres	0
fer sérique ferritine	surcharge en fer	H 8-33, F 6-31 µMol/litre H 30-400, F 15-150 ng/ml
homocystéine	facteur de risque cardiovasculaire indépendant du cholestérol contribue à l'oxydation des LDL	< 60 ans : 5-15 µMol / litre > 60 ans : 5-20 µMol / litre
myéloperoxydase	marqueur de l'inflammation (source de production de radicaux libres) facteur de risque cardiovasculaire	10 à 75 ng / ml

## 5. Stress oxydatif et diabète

Le stress oxydatif est un acteur indéniable dans la survenue du diabète, il intervient aussi bien dans le déclin de l'insulinosécrétion et l'installation de l'insulinorésistance, que dans la survenue des complications qui grèvent l'évolution de cette pathologie métabolique.

Les ERO altèrent l'insulinosécrétion par la diminution des facteurs de transcription PDX-1 et MafA indispensables à la différenciation des cellules β et à l'expression du gène de l'insuline respectivement.



L'hyperglycémie est considérée comme l'élément initiateur des dommages tissulaires à l'origine des complications du diabète dont le mécanisme sous-jacent est le stress oxydatif. Un niveau élevé de glucose intracellulaire a pour conséquence immédiate la surproduction de d'anions superoxydes dont l'accumulation inactive une enzyme de la glycolyse la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH). C'est ainsi que le flux de glucose est dévié vers la voie des AGEs. Ces dernières déclenchent une multitude de voies de signalisation provoquant les différentes lésions vasculaires liées à l'hyperglycémie.

## 6. Stress oxydatif et maladies cardiovasculaires

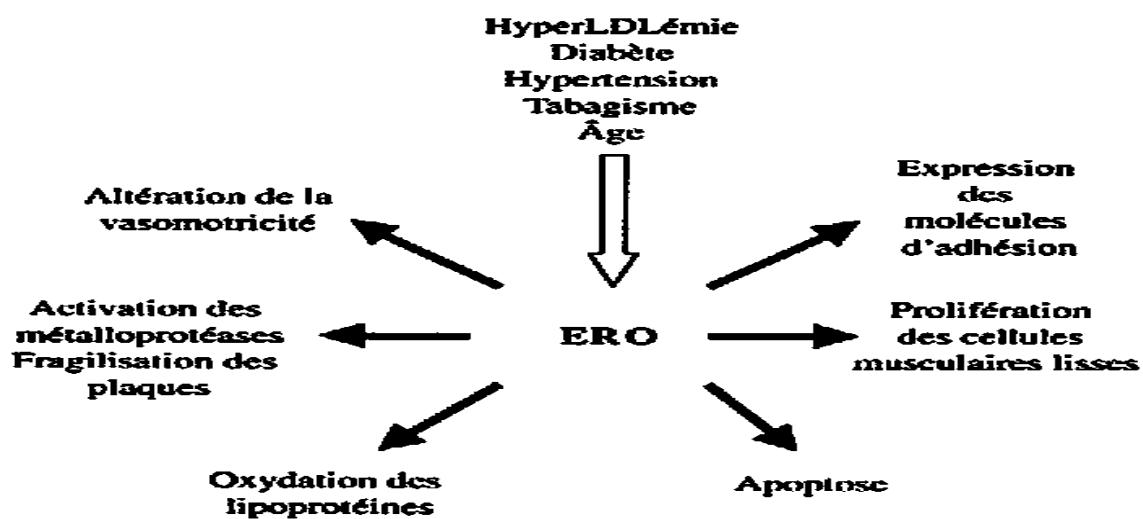
L'athérosclérose principale cause des maladies cardiovasculaires, représente aujourd'hui une cause majeure de morbidité dans le monde. Cette pathologie inflammatoire chronique des grosses et moyennes artères associe un dysfonctionnement endothélial à une réaction fibroproliférative.

Le stress oxydatif joue un rôle essentiel dans la physiopathologie de cette lésion vasculaire.

Les cellules de la paroi vasculaire présentent un état redox physiologique qui peut être rompu dans de nombreuses circonstances physiopathologiques à l'origine d'un stress oxydatif délétère pour les cellules concernées et leurs fonctions vasculaires. Parmi les causes de ce déséquilibre, les facteurs de risque cardiovasculaire : l'hypertension artérielle, l'hyperLDLémie, le diabète, le tabagisme, l'âge...

Ces facteurs de risque sont à l'origine de stimuli responsables d'une production anormale d'ERO, notamment par activation des NAD(P)H oxydases et de la chaîne respiratoire mitochondriale, à une diminution de la biodisponibilité du monoxyde d'azote.

Le déséquilibre pro-oxydant/antioxydants entraîne la formation de LDL oxydées et de multiples dysfonctionnements cellulaires : libération de facteurs pro-inflammatoires et de facteurs favorisant la prolifération cellulaire, processus d'apoptose et/ou de nécrose. L'ensemble des dysfonctionnements finalement concourt à la progression des lésions athérosclérotiques et à leur évolution ultime qu'est la rupture de plaque.



## 7. Conclusion

Radicaux libres, stress oxydant, espèces oxygénées activées, antioxydants sont devenus des termes de plus en plus familiers pour les professionnels de la santé et même le grand public.

Les ERO sont constamment produites et leurs effets sont modulés par la synthèse d'antioxydants. Cet équilibre permet à certaines ERO de remplir leurs fonctions utiles (signalisation cellulaire, régulation du tonus vasculaire, immunité...) tout en minimisant les dommages oxydatifs.

Le milieu médical prend conscience qu'une augmentation de stress oxydant chez un individu est potentiellement une cause d'apparition de diverses pathologies comme les maladies cardio-vasculaires, le cancer ou le diabète sucré.

La mise en évidence d'un état de stress oxydatif nécessite l'utilisation d'un ensemble de marqueurs couvrant à la fois les dégâts moléculaires et les capacités antioxydantes.