

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	1
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	6
LISTE DES ABRÉVIATIONS	7
INTRODUCTION	9
I. QUAND L'OXYGÈNE DEVIENT TOXIQUE : LE STRESS OXYDANT	11
1. L'OXYGÈNE ET SES PROPRIÉTÉS OXYDANTES.....	11
1.1 <i>Notions de chimie radicalaire : Appariement des électrons.....</i>	<i>11</i>
1.2 <i>Interactions entre l'oxygène et la matière organique</i>	<i>12</i>
a. Présentation des interdictions quantiques	12
b. Conséquences des interdictions quantiques sur l'oxygène.....	12
2. DÉFINITION DU STRESS OXYDANT À L'ÉCHELLE D'UN ORGANISME.....	13
3. LES ESPÈCES RÉACTIVES DE L'OXYGÈNE	13
4. LA TOXICITÉ DE L'OXYGÈNE	14
5. LES SITUATIONS DE STRESS OXYDANT	17
6. LE CHIEN EST UN BON MODÈLE D'ÉTUDE POUR LE STRESS OXYDANT	17
II. LE STRESS OXYDANT : AMI OU ENNEMI ?	19
1. L'ANION SUPEROXYDE EST À LA BASE DU PROCESSUS DE STRESS OXYDANT.....	19
1.1 <i>Production de l'anion superoxyde</i>	<i>19</i>
a. Production d'anion superoxyde par le métabolisme cellulaire	19
i. Fuite d'électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale	19
ii. Le catabolisme des bases puriques.....	21
iii. Les cytochromes P450	23
b. Production d'anion superoxyde par les NAD(P)H Oxydases.....	25
i. Présentation des NAD(P)H Oxydases.....	25
ii. La NAD(P)H Oxydase des phagocytes : Nox 2	26
iii. Gp91phox : La sous-unité catalytique.....	27
iv. L'activation des NOX.....	27
v. La flambée respiratoire.....	29
1.2 <i>Les propriétés de l'anion superoxyde</i>	<i>30</i>

1.3	<i>La production d'anion superoxyde est finement modulée par la cellule (Carriere et al., 2006).</i>	31
1.4	<i>Présentation des dérivés de l'anion superoxyde</i>	32
2.	LES DÉRIVÉS AZOTÉS DE L'ANION SUPEROXYDE	32
2.1	<i>Formation du monoxyde d'azote par la NO synthase</i>	32
a.	Les trois isoformes de la NO synthase	33
b.	Structure des NO synthases	33
c.	Cycles réactionnels	34
2.2	<i>Les effets bénéfiques et délétères du monoxyde d'azote</i>	36
a.	Propriétés du monoxyde d'azote	36
b.	Inactivation des protéines par le monoxyde d'azote	37
c.	Fixation des métaux de transition par le monoxyde d'azote et activation de la guanylate cyclase	37
d.	Oxydation de l'hémoglobine par le monoxyde d'azote	38
2.3	<i>Réactions possibles du monoxyde d'azote</i>	38
a.	Réaction entre le monoxyde d'azote et l'oxygène : formation de dioxyde d'azote	38
b.	Réaction entre le monoxyde d'azote et l'anion superoxyde : formation de peroxynitrite	39
3.	LE PEROXYDE D'HYDROGÈNE	39
3.1	<i>Formation du peroxyde d'hydrogène H₂O₂</i>	40
a.	Réactions de dismutation de l'anion superoxyde	40
b.	Catalyse des réactions de formation du peroxyde d'hydrogène par les enzymes mitochondriales	40
3.2	<i>Les superoxyde dismutases</i>	41
a.	SOD 1 ou CuZn-SOD	41
b.	SOD 2 ou Mn-SOD	42
c.	SOD 3 ou EC-SOD	42
3.3	<i>Quelques actions physiologiques du peroxyde d'hydrogène</i>	43
3.4	<i>Les dérivés formés à partir du peroxyde d'hydrogène sont responsables de sa toxicité</i>	43
a.	La réaction d'Haber-Weiss et formation de radical hydroxyle	44
b.	Réaction avec les peroxydases	44
4.	LE RADICAL HYDROXYLE : LE PLUS REDOUTÉ DES RADICAUX LIBRES	45
4.1	<i>Propriétés physico-chimiques du radical hydroxyle</i>	45
4.2	<i>Mode d'action du radical hydroxyle</i>	46
a.	Arrachement d'électrons	46

b.	Arrachement d'un atome d'hydrogène sur un substrat organique	46
c.	Addition sur une double liaison	46
4.3	<i>Production de radical carbonate</i>	47
4.4	<i>La lipoperoxydation par le radical hydroxyle</i>	47
a.	Phase d'initiation de la lipoperoxydation.....	48
b.	Phase de propagation de la lipoperoxydation	49
c.	Réactivation du cycle de lipoperoxydation	50
d.	Phase de terminaison de la lipoperoxydation.....	51
4.5	<i>Dommmages moléculaires liés au radical hydroxyle</i>	52
a.	Altérations lipidiques majeures	52
b.	Dommmages sur l'ADN	52
5.	LA FORMATION D'ACIDE HYPOCHLOREUX : INTERVENTION DE LA MYÉLOPEROXYDASE (MPO).....	53
5.1	<i>Introduction et contexte d'action de la MPO</i>	53
5.2	<i>Historique</i>	54
a.	Découverte de la MPO	54
b.	Découverte du lieu de stockage de la MPO	55
5.3	<i>Stockage de la myéloperoxydase</i>	55
a.	Synthèse de la MPO lors de l'hématopoïèse.....	55
b.	Les neutrophiles et leur migration jusqu'au site inflammatoire	57
c.	Les granules des neutrophiles.....	59
i.	Présentation	59
ii.	Intervention des différents granules	62
iii.	Libération de MPO : la dégranulation des neutrophiles	63
5.4	<i>Éléments structuraux et synthèse de la MPO</i>	63
a.	Structure générale de la MPO.....	63
b.	Codage génétique pour la MPO	63
c.	Synthèse de la MPO humaine	64
d.	Les liaisons	65
5.5	<i>Activité enzymatique de la MPO</i>	66
a.	Activité de chloration.....	67
b.	Activité de peroxydase.....	67
c.	Réactions annexes	68
d.	Régulations de l'activité enzymatique de la MPO.....	69

5.6	<i>Espèces produites dérivées de l'acide hypochloreux</i>	70
a.	Oxydation des thiols et du glutathion	70
b.	Réaction avec les amines	71
c.	Autres réactions.....	71
5.7	<i>Rôles de la MPO au sein du neutrophile</i>	72
a.	L'action bénéfique principale : la MPO, une enzyme antimicrobienne.....	72
i.	Des preuves de son action antimicrobienne.....	72
ii.	Mécanisme de l'action antimicrobienne	73
iii.	Substituts à l'ion Cl ⁻	74
b.	Les systèmes antimicrobiens en absence de MPO.....	74
c.	La composante anti-oxydante de la MPO	75
d.	Autres actions bénéfiques de la MPO	75
e.	L'action délétère : La MPO peut se révéler cytotoxique	75
f.	Les déficits en MPO.....	76
5.8	<i>La MPO : un marqueur de l'inflammation ?</i>	77

III. LE STRESS OXYDANT ET QUELQUES PATHOLOGIES ASSOCIÉES 79

1.	LE STRESS OXYDANT AU CENTRE DE NOMBREUSES PATHOLOGIES	79
1.1	<i>Notion de dose de stress oxydant</i>	79
1.2	<i>Les lésions moléculaires et cellulaires du stress oxydant</i>	80
a.	Lésions sur l'ADN	80
b.	Altérations des lipides.....	80
c.	Lésions des protéines.....	81
d.	Les cibles glucidiques du stress oxydant	82
1.3	<i>Stress oxydant et pathologies chez les animaux de rente</i>	82
2.	L'ÉVALUATION DU STRESS OXYDANT	83
2.1	<i>L'exploration du stress oxydant est intéressante mais difficile</i>	83
2.2	<i>Présentation des différentes méthodes d'évaluation</i>	83
a.	Les ERO sont des marqueurs directs du stress oxydant	83
b.	Les produits d'oxydation sont des marqueurs indirects du stress oxydant	84
i.	Marqueurs de l'oxydation des lipides.....	84
ii.	Marqueurs de l'oxydation des protéines	85
iii.	Marqueurs de l'oxydation de l'ADN.....	86

c.	Les antioxydants sont des marqueurs indirects du stress oxydant	86
d.	Réalisation du profil de stress oxydant : Oxidative Stress Profiling.....	87
e.	Mesure de l'activation des neutrophiles.....	88
2.3	<i>Les limites des techniques d'évaluation du stress oxydant</i>	88
3.	DÉTAILS SUR QUELQUES PATHOLOGIES EN RELATION AVEC LE STRESS OXYDANT	88
3.1	<i>Mutagenèse et cancérogénèse</i>	88
3.2	<i>Le vieillissement cellulaire</i>	89
a.	Théorie radicalaire	89
b.	La restriction calorique	90
3.3	<i>Sénescence et sénilité – affections neurodégénératives</i>	90
3.4	<i>Le diabète et l'hyperglycémie</i>	91
a.	Généralités.....	91
b.	Liens entre hyperglycémie et production d'ERO.....	91
3.5	<i>Cataractes</i>	94
3.6	<i>Maladies inflammatoires</i>	95
a.	Stress oxydant et inflammation	95
b.	Maladies inflammatoires chroniques.....	96
i.	Maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI)	96
ii.	Maladies rénales (implication de la MPO)	96
iii.	L'arthrose	97
c.	Maladies inflammatoires aiguës	97
3.7	<i>Les pathologies vasculaires et cardiaques</i>	98
a.	L'insuffisance cardiaque.....	98
b.	Pathologies vasculaires	98
i.	L'athérosclérose	98
ii.	Ischémie-reperfusion.....	99
	CONCLUSION	101
	BIBLIOGRAPHIE.....	103

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURE 1. ÉLECTRONS DE VALENCE DE L'OXYGÈNE MOLÉCULAIRE.....	11
FIGURE 2. LA PRODUCTION D'ERO ET SES CONSÉQUENCES CELLULAIRES.....	14
FIGURE 3. RÉSUMÉ DES RÉACTIONS SE PRODUISANT EN SITUATION DE STRESS OXYDANT.....	16
FIGURE 4. PRODUCTION D'ANION SUPEROXYDE DANS LA CHAÎNE RESPIRATOIRE MITOCHONDRIALE.....	20
FIGURE 5. SCHÉMA DU CYCLE Q.....	21
FIGURE 6. OXYDATIONS SUCCESSIVES DE LA XOR.....	22
FIGURE 7. CHAÎNE DE RÉACTIONS LORS DE L'OXYDATION DE L'HYPOXANTHINE EN ACIDE URIQUE.....	22
FIGURE 8. PRODUCTION D'ANION SUPEROXYDE ET AUTRES ERO PAR LA XANTHINE OXYDORÉDUCTASE.....	23
FIGURE 9. PRODUCTION D'ANION SUPEROXYDE PAR LES CYTOCHROMES P450.....	24
FIGURE 10. TABLEAU PRÉSENTANT LES NADPH OXYDASES.....	26
FIGURE 11. ASSEMBLAGE ET ACTIVATION DE LA NOX PHAGOCYTAIRE (NOX2).....	27
FIGURE 12. CASCADE D'ACTIVATION DE NOX 2 ET FORMATION D'ANION SUPEROXYDE.....	28
FIGURE 13. STRUCTURE D'UNE SOUS-UNITÉ D'UNE NO SYNTHASE.....	34
FIGURE 14. FLUX D'ÉLECTRONS DANS LES NOS.....	35
FIGURE 15. LA PEROXYDATION LIPIDIQUE.....	47
FIGURE 16. LA PEROXYDATION LIPIDIQUE - PHASE D'INITIATION.....	48
FIGURE 17. LA PEROXYDATION LIPIDIQUE - PHASE DE PROPAGATION.....	49
FIGURE 18. LA PEROXYDATION LIPIDIQUE - LA RÉACTIVATION.....	50
FIGURE 19. LA PEROXYDATION LIPIDIQUE - PHASE DE TERMINAISON.....	51
FIGURE 20. HÉMATOPOÏÈSE.....	56
FIGURE 21. MIGRATION DU NEUTROPHILE SUR LE SITE INFLAMMATOIRE.....	57
FIGURE 22. CLASSIFICATION DES GRANULES DES NEUTROPHILES.....	60
FIGURE 23. CONTENU DES GRANULES DES NEUTROPHILES ET DES VÉSICULES SÉCRÉTOIRES CHEZ L'HOMME.....	61
FIGURE 24. SYNTHÈSE IN VIVO DE LA MPO.....	64
FIGURE 25. STRUCTURE DU NOYAU HÉMINIQUE DE LA MPO HUMAINE.....	66
FIGURE 26. ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DE LA MPO.....	68
FIGURE 27. PRODUITS FORMÉS À PARTIR DE HOCL.....	70
FIGURE 28. LIENS ENTRE LES MALADIES HUMAINES ET LE STRESS OXYDANT.....	79
FIGURE 29. PROFIL OXYDATIF CHEZ UN CHEVAL APRÈS UN EFFORT STANDARDISÉ AVANT COMPLÉMENTATION ET APRÈS COMPLÉMENTATION EN ANTIOXYDANTS.....	87
FIGURE 30. RELATION ENTRE DIABÈTE ET PRODUCTION D'ERO.....	93

LISTE DES ABRÉVIATIONS

μg : Micro grammes	EC-SOD : Superoxyde dismutase 3 (SOD3)
$^1\text{O}_2$: Oxygène singulet	ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène
A° : Molécule antioxydante, forme oxydée	FAD : Flavine adénine dinucléotide
8OHdG : 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine	FADH° : Forme partiellement réduite de la flavine adénine dinucléotide (FAD)
ADN : Acide désoxyribonucléique	FADH_2 : Forme réduite de la flavine adénine dinucléotide (FAD)
ADP : Adénosine di-phosphate	Fe: Fer
AH: Molecule antioxydante, forme réduite	Fe^{2+} : Fer ferreux
AMP : Adénosine mono-phosphate	Fe^{3+} : Fer ferrique
Asp : Aspartate	FMN : Flavine mono nucléotide
ATP : Adénosine tri-phosphate	G : Protéine G
BH_4 : Tétrahydrobioptérine	G-CSF: Facteur de croissance des colonies de granulocytes (Granulocyte– Colony Stimulating Factor)
C : Extrémité C-terminale d'une protéine	GDP: Guanosine diphosphate
Ca^{2+} : Ion calcium	Glu : Glutamate
CCl_4 : Carbone tétrachloride	GM-CSF: Facteur de croissance des colonies de granulocytes et macrophages (Granulocyte and macrophage – Colony Stimulating Factor)
Cd I: Composé I de la MPO ou π -cation radical ou $\text{MPO}^+ \text{Fe(IV)=O}$	GMPc : Guanosine monophosphate cyclique
Cd II : Composé II de la MPO ou MPO-Fe(IV)=O	GSH : Forme réduite du glutathion
Cd III : Composé III de la mPO ou MPO-Fe(II)	GSO_2HN : Glutathion sulfonamide cyclique
CD4, CD8 ou 35 : Cluster de différenciation 4, 8 ou 35	GSO_2SG : Glutathion thiosulphonate
CFU : Cellule progénitrice myéloïde (colony-forming unit)	GSSG : Forme oxydée du glutathion (Glutathion disulfide)
CGD: Chronic Granulomatous disease (maladie granulomateuse chronique)	GTP: Guanosine triphosphate
CIVD : Coagulation intravasculaire disséminée	H^+ : Proton
Cl^- : Ion chlorure	H_2O : Eau
CO_3° : Radical carbonate	H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène
CO_3^{2-} : Ion carbonate	Hb: Hémoglobine
COX : Cyclo oxygénase	HCO_3^- : Ion bicarbonate
Cu : Cuivre	HO_2° : Radical hydroperoxyde
CuZn-SOD : Superoxyde dismutase 1 (SOD1)	HOCl: Acide hypochloreux
Cyt : Cytochrome	HSP: Protéines de choc thermique (Heat Shock Proteins)
D : Forme oxydée de DH	ICAM-1 : Molécule d'adhésion intracellulaire située sur les cellules endothéliales (Intra cellular adhesion molecule)
Da : Dalton	IFN γ : Interféron gamma
DAG: Diacylglycérol	IL-2 : Interleukine 2
Def-neg: Défensine - négatif	
Def-pos: Défensine - positif	
DH : Substrat réducteur divers (forme réduite)	
Duox: Dual oxidase	
e^- : Electron	

IL-3 : Interleukine 3
 IL-8 : Interleukine 8
 IP3 : Inositol triphosphate
 Kb: Kilo bases
 kDa : Kilo Dalton
 L: Litres
 LDL : Low density lipoprotein (lipoprotéine de faible densité)
 LFA-1 : Intégrine située sur les neutrophiles (Leucocyte function associated antigen)
 LO[•]: Radical alkoxy
 L[•]: Radical alkyle
 LOOH: Lipide hydroperoxyde
 LH: Molécule lipidique
 LOO[•]: Radical peroxy
 L-L: Chaîne lipidique
 MDA : Malondialdéhyde
 Met: Méthionine
 MICI : Maladie inflammatoire chronique de l'intestin
 mL : Millilitres
 Mn : Manganèse
 Mn-SOD : Superoxyde dismutase 2 (SOD2)
 Mo : Molybdène
 Mol: Moles
 MPO: Myéloperoxydase
 MPO_n : MPO native ou MPO-Fe(III)
 N : Extrémité N terminale d'une protéine
 NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide
 NADH : Forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD)
 NADP : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
 NADPH : Forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP)
 NF κB: Facteur nucléaire kappa B (Nuclear Factor kappa B)
 NGAL: Lipocaline associée à la gélatinase des neutrophiles (Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin)
 NK : Natural Killer
 NO : Monoxyde d'azote (forme radicalaire)
 NO₃⁻: Ion peroxytrinitrate
 NOS : NO Synthase
 NOX : NADPH Oxydase
 O₂ : Dioxygène
 O₂^{•-} : Anion superoxyde
 OH[•] : Radical hydroxyle
 P: Phosphate
 PFG : Produits finaux de glycosylation ou produits de Maillard
 pH : Potentiel hydrogène
 Pi : Phosphate inorganique
 PIP2: Phosphatidylinositol biphosphate
 PKC: Protéine kinase C
 PLC: Phospholipase C
 PMN : Polymorphonucléaires
 PR : Protéine de Rieske
 Prepro-MPO : Protéine précurseur de la MPO
 Q : Coenzyme Q (ubiquinone ou ubiquinol selon s'il est réduit ou oxydé)
 QH₂ : Ubiquinol
 Qi : Site de fixation interne du coenzyme Q sous sa forme oxydée dans le complexe III de la chaîne mitochondriale
 Qo : Site de fixation externe du coenzyme Q sous sa forme réduite dans le complexe III de la chaîne mitochondriale
 R[•] : Espèce radicalaire générée par RH
 RH: Molécule organique
 RhoGDI: Protéine G Rho Dissociation Inhibitor
 ROO[•] : Radical peroxy
 s: Seconde
 S: Soufre
 SDRA : Syndrome de détresse respiratoire aigue
 SIRS : Syndrome de réponse inflammatoire systémique (Systemic inflammatory response syndrom)
 SOD: Superoxyde dismutase
 TBAR : Acide thiobarbiturique
 TNFα : Tumor Necrosis Factor α
 UQ : Ubiquinone
 VO₂ max : Consommation maximale d'oxygène par unité de temps
 XOR : Xanthine oxydoréductase
 Zn : Zinc

INTRODUCTION

“Oxygen has been a trouble-maker since the very beginning.” Doris Aberlo

“The same thing that makes you live can kill you in the end” Neil Young

Découvert par Scheele en 1772, l’Oxygène (ou dioxygène O₂) fut identifié dans l’air par Lavoisier en 1774 qui décrivit son rôle capital dans la combustion et lui donna son nom à partir du grec *oxys* et *gennan* ce qui signifie « qui génère de l’acide ». Il est le premier à lui soupçonner un rôle néfaste mais il fût guillotiné avant d’avoir pu le prouver.

Gaz indispensable à la vie, l’oxygène est nécessaire pour produire de l’énergie sous forme d’adénosine tri-phosphate (ATP) par l’intermédiaire des chaînes mitochondriales de transport d’électrons. Ce gain d’électrons aboutit à la formation d’espèces réactives de l’oxygène (ERO), appelées également formes réactives de l’oxygène par certains auteurs, au potentiel oxydant très élevé dont font partie les radicaux libres.

Les radicaux libres ont été découverts dans les systèmes biologiques il y a près de soixante ans (Commoner *et al.*, 1954). C’est en 1956, qu’Harman évoque une hypothèse concernant le vieillissement cellulaire : il serait dû à l’accumulation des dommages cellulaires et moléculaires causés par les radicaux libres dus à l’oxygène. Ces radicaux libres, utiles à l’organisme à faibles doses, sont produits par divers mécanismes physiologiques. Lorsque la production devient excessive, les différents systèmes antioxydants se mettent en place mais peuvent être dépassés. Ce déséquilibre entre la production des ERO et les capacités cellulaires anti-oxydantes correspond au stress oxydant.

Le stress oxydant est étroitement lié au vieillissement cellulaire et à de nombreuses pathologies (Halliwell et Gutteridge, 1984). Ce travail a pour but de détailler les mécanismes de production des ERO (notamment au sein des neutrophiles lors d’un phénomène inflammatoire) et de comprendre leurs rôles physiologiques ou pathologiques.

I. Quand l'oxygène devient toxique : le stress oxydant

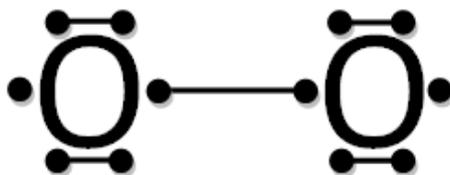
1. L'oxygène et ses propriétés oxydantes

Bien qu'unaniment reconnue, la toxicité de l'oxygène n'était pas élucidée jusqu'en 1954, date à laquelle Gershman *et al.* montrent que la toxicité de l'oxygène est due à ses formes partiellement réduites. Parce qu'il possède deux électrons célibataires (cf I 1.1), l'oxygène a tendance à accepter deux électrons : il s'agit donc d'un oxydant. En acceptant deux électrons, l'oxygène passe à l'état réduit.

1.1 Notions de chimie radicalaire : Appariement des électrons

Au sein des molécules, les électrons sont, le plus souvent, regroupés par paires. On parle d'appariement. Une molécule qui possède un électron non apparié ou électron célibataire, est appelée radical libre ou « doublet ». La molécule de dioxygène O₂ est particulière dans le sens où elle possède deux électrons célibataires (Figure 1). Il s'agit d'un « triplet ».

*Figure 1. Électrons de valence de l'oxygène moléculaire.
Un point représente un électron et un trait un appariement entre deux électrons.*



La matière organique, inerte (= non réactive), est formée de molécules dont tous les électrons sont appariés. Il s'agit de « singulets ».

Nous allons maintenant voir comment le dioxygène, triplet, réagit avec la matière organique qu'il rencontre.

1.2 Interactions entre l'oxygène et la matière organique

a. Présentation des interdictions quantiques

En chimie quantique, il existe trois règles fondamentales qui régissent les réactions entre les molécules :

- La réaction entre un triplet et un singulet est interdite : C'est pourquoi, le dioxygène ne réagit pas spontanément au contact de la matière : il est considéré comme inerte et demeure dans l'atmosphère en quantité importante (21 %) ;
- La réaction entre un doublet et un singulet ou un triplet est autorisée ;
- Les réactions entre molécules semblables sont autorisées (triplet avec triplet, doublet avec doublet et singulet avec singulet).

b. Conséquences des interdictions quantiques sur l'oxygène

Pour lever la barrière énergétique et dépasser les interdictions quantiques, c'est-à-dire pour observer une réaction entre l'oxygène et la matière vivante il faut alors :

- Que l'oxygène triplet soit amené à l'état doublet ou singulet. Il pourra alors réagir avec la matière organique (singulet) ;
- Ou que la matière organique, à l'état singulet, soit amenée à l'état doublet.

In vivo, cette barrière énergétique est franchie grâce à l'action d'enzymes qui transforment le dioxygène ou la molécule organique en un radical libre (doublet). Les oxydases transforment l'oxygène en radical libre et les oxygénases transforment la matière organique en radical libre. (Deby-Dupont *et al.*, 2002).

L'oxygène est donc amené à réagir plus ou moins facilement avec la matière organique qu'il rencontre. Ces réactions, nous l'avons vu, conduisent souvent à la production d'ERO. Nous allons maintenant définir le stress oxydant et puis étudier chacune des ERO.

2. Définition du stress oxydant à l'échelle d'un organisme

Des composés à fort potentiel oxydant, sont produits constamment en situation physiologique au sein d'un organisme. Il se met alors en place un système antioxydant. En situation normale, la balance antioxydant/prooxydant est équilibrée. Mais l'organisme peut être confronté à une surexposition à des composés oxydants lorsque la production endogène d'ERO devient excessive ou suite à l'exposition à un phénomène toxique exogène. Lorsqu'un déséquilibre intervient (par surproduction de composés prooxydants ou par déficit en substances antioxydantes), on parle de stress oxydatif ou stress oxydant (Favier, 2003).

3. Les espèces réactives de l'oxygène

Parmi les composés oxydants formés après réduction de l'oxygène que nous respirons. On distingue :

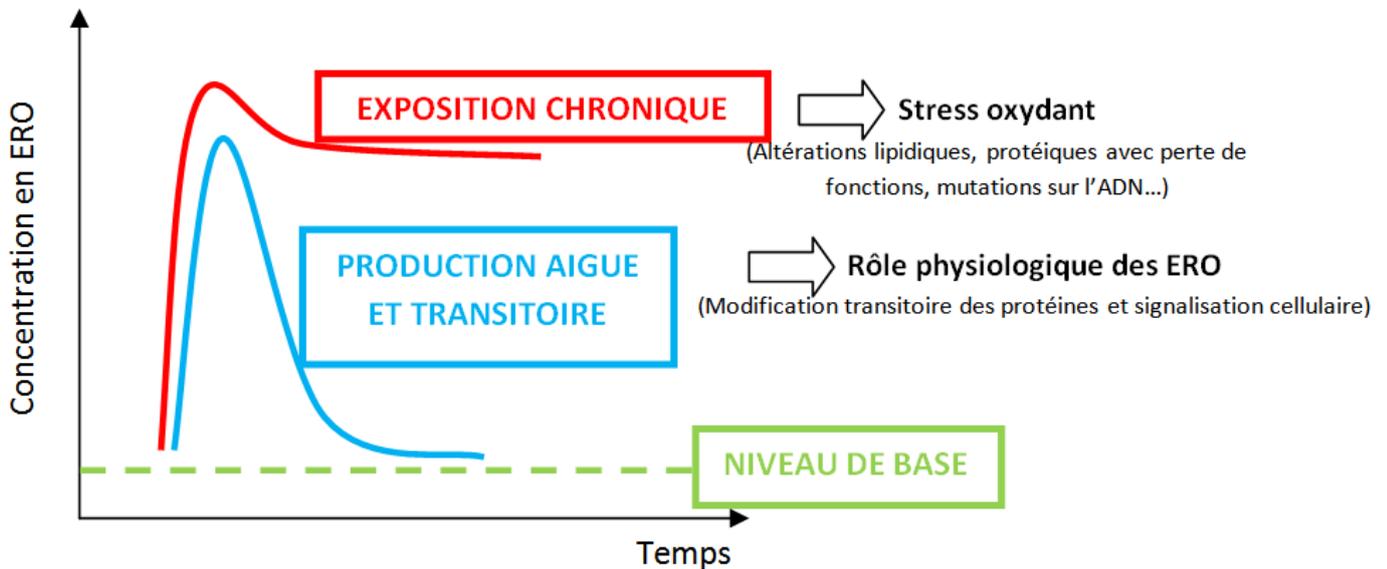
- Les radicaux libres primaires : ils dérivent directement de l'O₂ par une réaction de réduction ;
- Les radicaux libres secondaires : ils sont formés par la réaction des radicaux libres primaires sur des composés biochimiques cellulaires ;
- Les espèces actives de l'oxygène : ce sont des molécules ne possédant pas d'électron non apparié mais au fort pouvoir oxydant car elles peuvent donner naissance à des radicaux libres ;

Les radicaux libres primaires et secondaires et les espèces actives de l'oxygène sont regroupées sous le nom d'espèces réactives de l'oxygène ou ERO (ou « ROS » en anglais pour reactive oxygen species).

La présence d'ERO dans les matériaux biologiques a été relevée il y a cinquante ans (Droge, 2002). Dans des conditions physiologiques, c'est-à-dire lorsque leur production est aiguë et transitoire, les ERO jouent le rôle de seconds messagers et participent activement à la signalisation cellulaire. C'est quand ils sont produits de manière incontrôlée ou chronique, ou lorsque les

défenses anti-oxydantes ne sont pas suffisamment puissantes qu'ils sont à l'origine de stress oxydant comme le schématise la Figure 2 ci-dessous.

Figure 2. La production d'ERO et ses conséquences cellulaires (Illustration personnelle d'après Carriere et al., 2006).



4. La toxicité de l'oxygène

L'O₂ est capable d'entretenir les réactions radicalaires. En effet, la recombinaison de deux radicaux libres arrête la réaction mais la présence quasi-permanente d'O₂ empêche cette dimérisation et le radical libre réagit avec O₂ pour produire de nouveaux radicaux. Il s'agit, la plupart du temps, de réactions en chaîne.

Deby-Dupont *et al.* (2002) nous expliquent que chez l'Homme sain, l'exposition à 100% d'O₂ à la pression atmosphérique provoque une situation d'hyperoxie et peut provoquer de graves lésions :

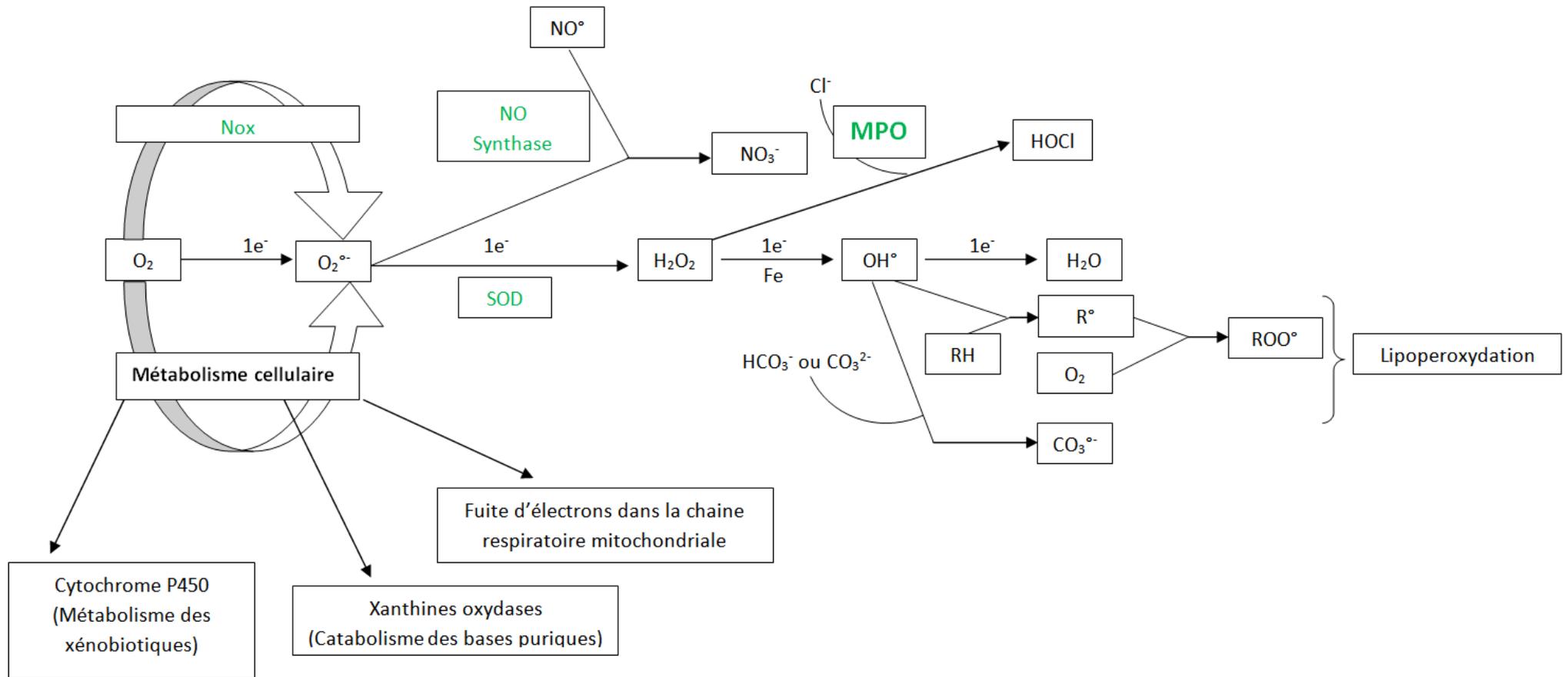
- Après 10 heures d'exposition, une trachéo-bronchite (réversible rapidement) apparaît ;
- Après 24 heures d'exposition, un syndrome de détresse respiratoire aiguë se met en place ;

- Après 24 à 48 heures d'exposition, on trouve une concentration élevée en albumine dans les liquides de lavage broncho-alvéolaire ce qui signifie que la barrière alvéolo-capillaire est détériorée, signant une atteinte de l'endothélium capillaire ;
- Enfin, des dégâts pulmonaires étendus sont visibles en 4 à 6 jours d'exposition.

Les auteurs s'accordent sur le fait que la toxicité de l'oxygène est majoritairement liée à la production d'ERO à des concentrations qui dépassent les capacités antioxydantes de l'organisme. Ces ERO causent des dommages *in situ* et réagissent avec les cellules puis déclenchent une réaction inflammatoire avec production de médiateurs.

Les réactions aboutissant à la formation d'ERO sont synthétisées dans la Figure 3 ci-après et seront détaillées dans ce travail après avoir abordé les situations pouvant amener à un stress oxydant.

Figure 3. Résumé des réactions se produisant en situation de stress oxydant (Illustration personnelle).



O₂ : Dioxygène
 O₂^{•-} : Anion superoxyde
 NO[•] : Monoxyde d'azote
 SOD : Superoxyde dismutase
 NO₃⁻ : Nitrate
 H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
 Fe: Fer

Cl⁻: Ion chlorure
 MPO: Myéloperoxydase
 OH[•]: Radical hydroxyle
 HCO₃⁻: Ion bicarbonate
 CO₃²⁻: Ion carbonate
 HOCl: Acide hypochloreux

H₂O: Eau
 RH: Molécule organique
 R[•]: Espèce radicalaire générée par RH
 CO₃^{•-}: Radical carbonate
 ROO[•]: Radical peroxyde
 e⁻: Electron

5. Les situations de stress oxydant

Les situations lors desquelles l'organisme est soumis à un stress oxydant sont toutes les situations au cours desquelles la consommation en dioxygène et donc la production d'ERO sont accrues (Fisher-Wellman et Bloomer, 2009). On peut citer toutes les maladies inflammatoires chroniques et aiguës (par l'intervention du TNF α), l'exercice physique intense et les situations d'hyperoxie, les phénomènes d'ischémie-reperfusion, certains désordres nutritionnels (carence en ubiquinone par exemple), le vieillissement cellulaire... Cependant, il faut être conscient qu'il est, le plus souvent, difficile de savoir si les pathologies présentes ont engendré une production accrue d'ERO ou si le stress oxydant a provoqué des dommages cellulaires aboutissant à la pathologie en question.

6. Le chien est un bon modèle d'étude pour le stress oxydant

Selon Grandjean *et al.* (2005), le chien exerçant un effort en altitude est le modèle expérimental de choix pour l'étude du stress oxydant. En effet, nous venons de le voir, l'exercice physique est une situation de stress oxydant de par l'augmentation de la consommation d'oxygène qu'il impose. Le chien possède la plus forte consommation maximale d'oxygène (appelée VO₂ max) de toutes les espèces animales et son organisme utilise presque exclusivement l'oxydation des lipides comme source d'énergie lors d'un effort d'endurance. L'altitude imposant des conditions hypoxiques et hypobariques, un stress physiologique est imposé à l'organisme le rendant plus vulnérable aux conséquences du stress oxydant. Bailey *et al.* (2004) ont montré que le mal aigu des montagnes est associé à une augmentation des marqueurs de la peroxydation et qu'une supplémentation prophylactique en antioxydants serait bénéfique.

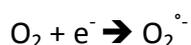
Nous allons voir dans ce qui suit, les mécanismes de production de chaque ERO et les dérivés produits pouvant causer des dommages cellulaires.

II. Le stress oxydant : ami ou ennemi ?

1. L'anion superoxyde est à la base du processus de stress oxydant

1.1 Production de l'anion superoxyde

L'anion superoxyde est issu de la réduction mono électrique d'une molécule de dioxygène. Il est donc le premier ERO produit dans une situation de stress oxydant. L'addition d'un électron au dioxygène forme le radical anion superoxyde :



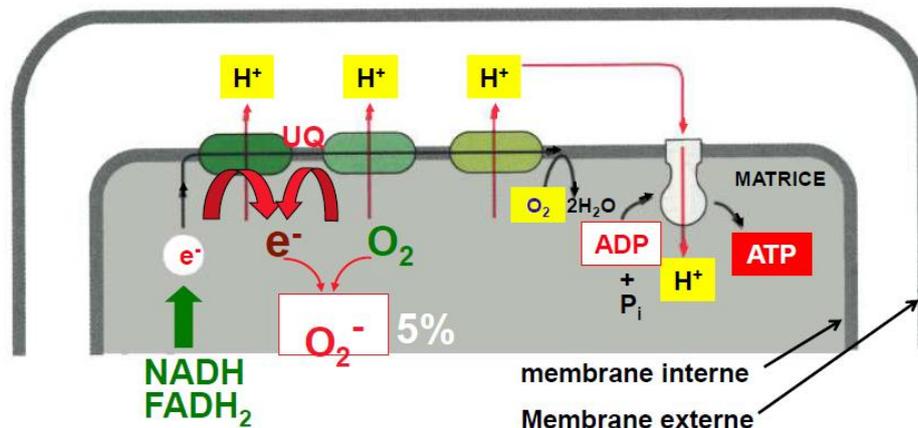
Cet anion est produit au niveau cellulaire lors du catabolisme des bases puriques et du fonctionnement des cytochromes P450 dans les *reticuli* endoplasmiques et les mitochondries. Cependant, c'est la chaîne respiratoire mitochondriale qui, selon Carriere *et al.* (2006), est responsable de 80% de la production d'anion superoxyde dans les cellules non phagocytaires. Le métabolisme cellulaire n'est pas le seul responsable de la formation d'anion superoxyde. En effet, ce dernier est également produit par le système enzymatique des NAD(P)H Oxydases (ou NOX).

a. Production d'anion superoxyde par le métabolisme cellulaire

i. *Fuite d'électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale*

Les êtres vivants trouvent leur énergie dans la respiration mitochondriale dont la dernière étape réduit par quatre électrons la molécule d'oxygène. Cependant, au contact entre l'oxygène et certaines protéines de la chaîne respiratoire, il advient une production connexe inévitable d'anions superoxydes. En effet, la chaîne respiratoire mitochondriale présente deux principales imperfections : les électrons sont apportés un à un et un faible pourcentage d'oxygène est converti en EOR (Cf Figure 4 ci-dessous). Comme le confirme Turrens (2003), la chaîne respiratoire mitochondriale constitue la principale source d'anion superoxyde dans l'organisme.

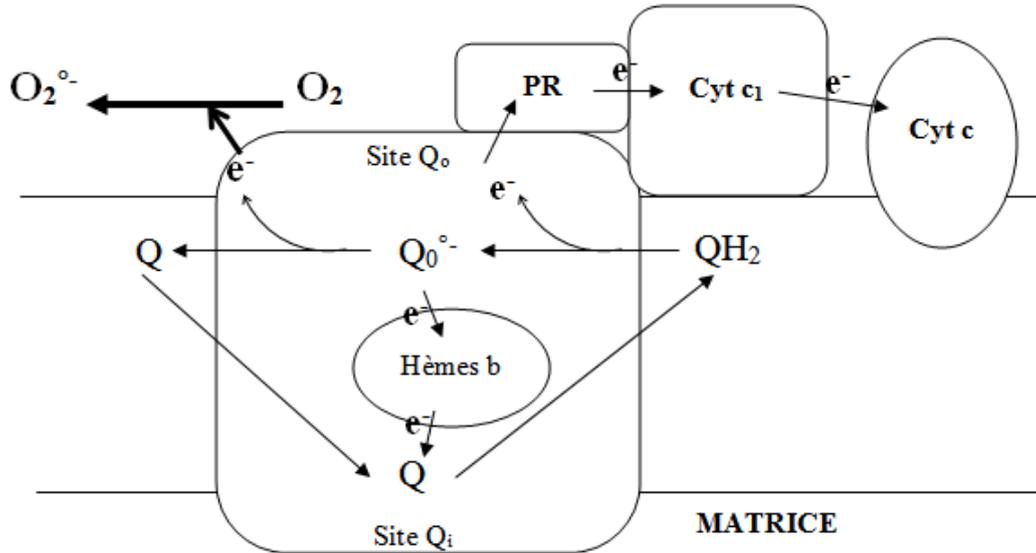
Figure 4. Production d'anion superoxyde dans la chaîne respiratoire mitochondriale (D'après Alberts et al., 2009).



Selon Valko *et al.* (2007) et d'autres auteurs, on estime entre 1 et 4 % la quantité de dioxygène qui subit une réduction mono électrique au niveau de l'ubiquinone au lieu de contribuer à la réduction complète du dioxygène en eau. Les fuites se produisent essentiellement au niveau du complexe I et du complexe III (le plus étudié) de la chaîne respiratoire mitochondriale (Starkov, 2008). Muller *et al.* (2004) ont montré que les radicaux superoxydes issus des fuites électroniques du complexe I sont exclusivement relargués dans la matrice et demeurent au sein de la mitochondrie tant que cette dernière reste intacte. Le complexe III transporte les électrons de l'ubiquinol (QH_2) au cytochrome c selon le mécanisme décrit par Mitchell en 1976 (Figure 5). En effet, le complexe III comporte dix sous unités protéiques dont:

- Quatre centres redox :
 - Une protéine dite de Rieske (PR) à centre fer-soufre ;
 - Un cytochrome c1 ;
 - Deux hèmes B.
- Deux sites de fixation pour le coenzyme Q :
 - Q_i côté interne qui fixe la forme oxydée du coenzyme Q (ubiquinone) ;
 - Q_o côté externe qui fixe la forme réduite du coenzyme Q (ubiquinol).

Figure 5. Schéma du cycle Q (PR=protéine de Rieske, cyt=cytochrome)
(Illustration personnelle d'après Andreyev et al., 2005 et Turrens, 2003).



Lorsqu'un ubiquinol est fixé au site Q_o , il subit une oxydation et donne deux électrons :

- Un électron qui parvient au cytochrome c par l'intermédiaire de la protéine PR et du cytochrome c_1 . L'ubiquinol est alors instable sous sa forme $Q^{\circ-}$ (forme semiquinonique) ;
- Un second électron réduit une ubiquinone fixée sur Q_i en semiquinone par l'intermédiaire des hèmes B.

Il est communément admis, selon Jungbluth (2008), que la formation de radicaux superoxydes est due à l'oxydation des semiquinones sur le site Q_o par l'oxygène dissous dans les membranes.

ii. Le catabolisme des bases puriques

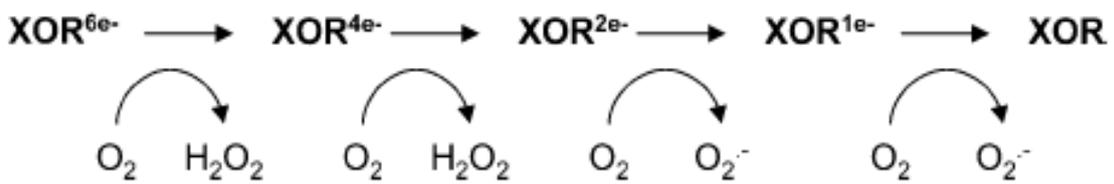
La principale enzyme du catabolisme des bases puriques est la xanthine oxydoréductase (XOR). Elle existe sous deux formes :

- La xanthine déshydrogénase qui prédomine *in vivo* ;
- La xanthine oxydase présente majoritairement dans les cellules endothéliales.

Le passage d'une forme à l'autre est possible par l'oxydation de fonctions thiols (réversible) ou par protéolyse (irréversible).

La XOR possède une chaîne interne de cofacteurs d'oxydoréduction ce qui rend son fonctionnement très complexe. La forme réduite de la XOR possède six électrons qui peuvent être progressivement transférés à l'oxygène ce qui produit du peroxyde d'hydrogène et des anions superoxydes (Figure 6).

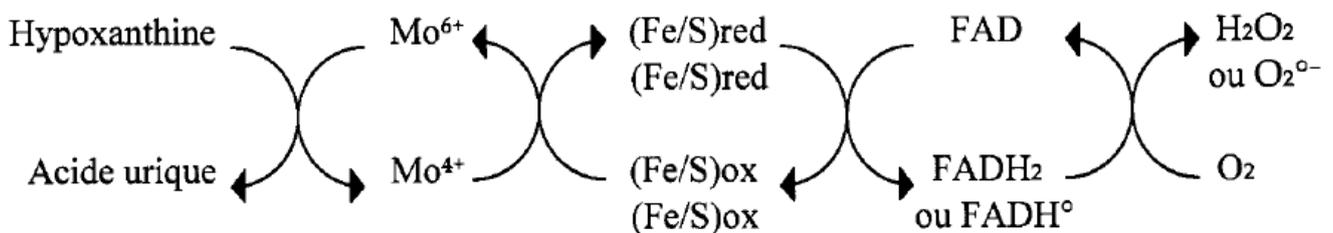
Figure 6. Oxydations successives de la XOR (D'après Hille et Nishino, 1995).



Comme l'expliquent d'abord Hille et Nishino (1995) puis Berry et Hare (2004) (voir Figure 7 ci-dessous), la flavine peut être réduite (FADH_2) ou partiellement réduite (FADH^\bullet) lors de la chaîne de réactions induisant successivement l'oxydation de la xanthine en hypoxanthine puis de l'hypoxanthine en acide urique est ensuite réoxydée en FAD par le dioxygène, produisant :

- du peroxyde d'hydrogène s'il s'agit de FADH_2 ;
- ou de l'anion superoxyde s'il s'agit de FADH^\bullet .

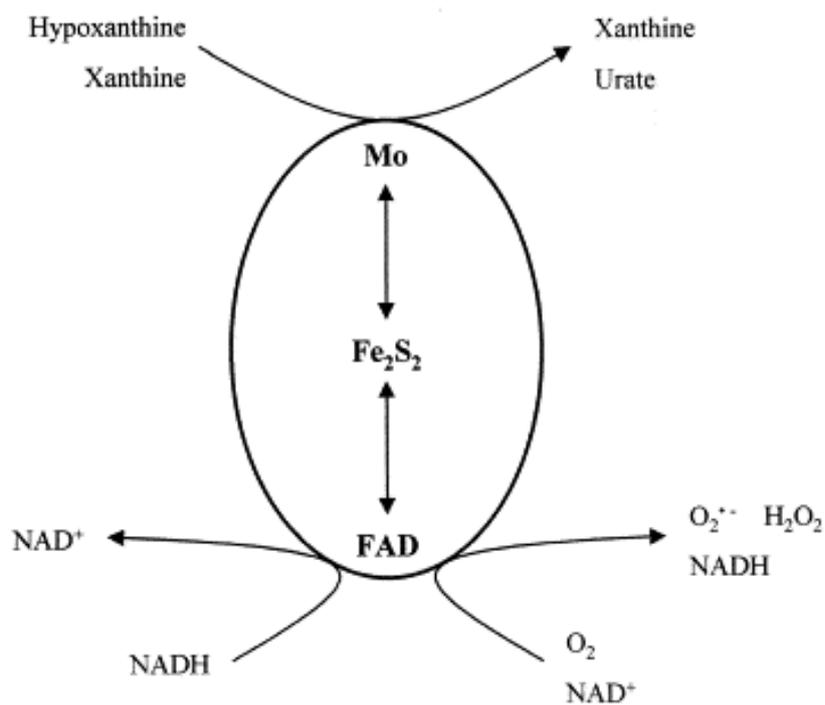
Figure 7. Chaîne de réactions lors de l'oxydation de l'hypoxanthine en acide urique (d'après Jungbluth, 2008).



Cependant, cette production d'anion superoxyde est secondaire, car selon Chance *et al.* (1979), il s'agit d'une faible proportion de la production totale d'anion superoxyde. Selon Ono *et al.* (2009), la xanthine oxydase est la source majeure de production d'anion superoxyde chez des rats ayant subi une ischémie-reperfusion du cerveau.

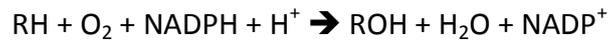
Godber *et al.* (2000) ont montré que la XOR possède, par ailleurs, une activité de type NADH oxydase : le NADH est oxydé par la flavine qui transmet ses électrons soit au NAD^+ soit au dioxygène ce qui entraîne la production d'anion superoxyde et d'autres ERO. Comme le montre la Figure 8 ci-dessous, l'anion superoxyde n'est pas la seule ERO qui est produite par ce mécanisme : du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 est également produit (Harrison, 2002).

Figure 8. Production d'anion superoxyde et autres ERO par la xanthine oxydoréductase (d'après Harrison, 2002).



Les cytochromes P450 sont des complexes enzymatiques situés dans la membrane du *reticulum* endoplasmique ou dans la membrane interne des mitochondries. Ils sont essentiellement présents dans le foie et participent au métabolisme des médicaments et autres xénobiotiques, de l'acide arachidonique, du cholestérol, de la vitamine D3, des eicosanoïdes. Ils

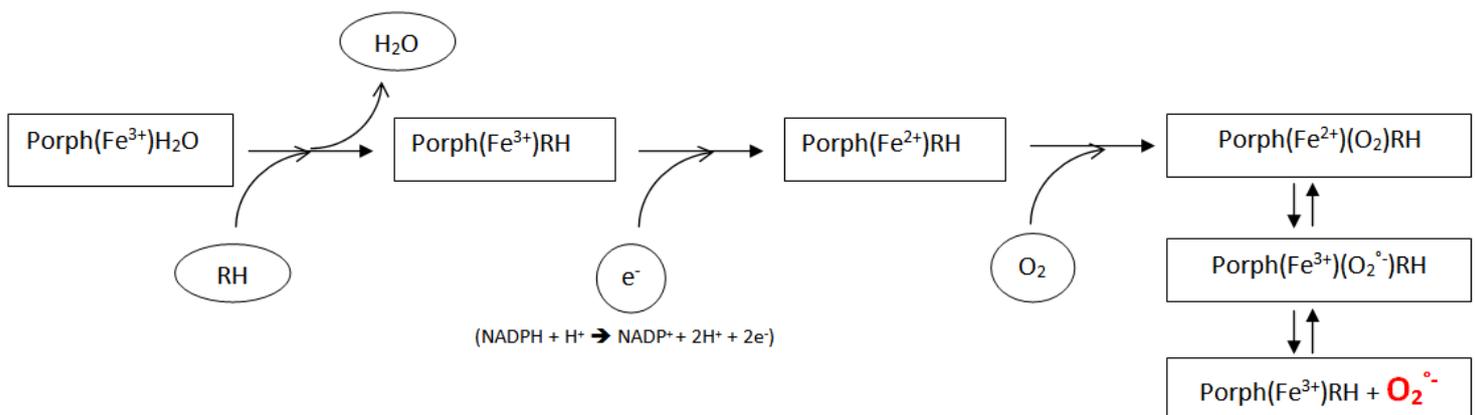
catalysent l'oxydation de ces substrats par le dioxygène selon un cycle réactionnel qui a pour bilan la réaction suivante :



Les cytochromes P450 ont une structure héminique. Ils sont composés d'un groupement prosthétique (protoporphyrine IX identique à celle de l'hémoglobine et de la myoglobine) et d'une partie protéique (apoprotéine). Le groupement prosthétique fixe, par quatre liaisons, un atome de fer en son centre. Une cinquième liaison est réalisée entre l'atome de fer et le groupement thiolate (RS^-) d'une cystéine de l'apoprotéine. Enfin, une molécule d'eau ou de dioxygène peut se fixer par une sixième liaison à l'atome de fer (Porter et Coon, 1991).

En l'absence de substrat, c'est une molécule d'eau qui est fixée à l'atome de fer (fer ferrique Fe^{3+}). Lorsqu'un substrat est présent (Figure 9), la liaison se rompt et le fer accepte alors un électron provenant du NADPH (par l'intermédiaire d'une chaîne de transporteurs d'électrons : la NADPH-cytochrome P450 oxydoréductase). Le fer (fer ferreux Fe^{2+}) fixe alors une molécule de dioxygène. Ce complexe est en équilibre avec une forme isoélectrique dans laquelle le dioxygène récupère l'électron pour devenir anion superoxyde (Jungbluth, 2008).

Figure 9. Production d'anion superoxyde par les cytochromes P450 (Illustration personnelle d'après Porter et Coon, 1991).



b. Production d'anion superoxyde par les NAD(P)H Oxydases

i. *Présentation des NAD(P)H Oxydases*

Les NAD(P)H oxydases sont des complexes multimériques exprimés de façon constitutionnelle dans la majorité des types cellulaires (phagocytes, cellules endothéliales, épithéliales, musculaires lisses etc...). La dénomination « NAD(P)H Oxydases » contient en fait sept enzymes : Nox 1 à 5 (pour **NAD(P)H Oxydase**) et Duox 1 et 2 (pour **Dual Oxydase**). Comme le rappellent Maghzal *et al.* (2012), Nox 2 (présente dans les cellules phagocytaires notamment) fut la première NAD(P)H oxydase découverte et est, à ce jour, la mieux décrite. Elle sert donc de référence pour la description de cette famille enzymatique.

La plupart des cellules sont capables de produire des anions superoxydes via l'activité de leur NOX membranaire. Les centres oxydo-réducteurs sont conservés au sein de la famille et sont tous similaires. Toutes les NAD(P)H oxydases sont capables de produire de l'anion superoxyde selon le mécanisme décrit pour Nox 2 (Maghzal *et al.*, 2012). Cette dernière catalyse la réduction mono électrique du dioxygène en utilisant le NADPH ou le NADH comme donneur d'électrons selon la réaction suivante :



D'abord étudiée dans les cellules phagocytaires, la NAD(P)H oxydase y joue un rôle primordial dans la défense contre les pathogènes. Dans les autres cellules, elle participe à la signalisation cellulaire. Présente dans la membrane cytoplasmique, on la trouve également dans certains granules neutrophiliques. En fonction de la cellule dans laquelle elle se trouve, la NAD(P)H Oxydase libère des anions superoxydes vers l'extérieur (pour les cellules phagocytaires) ou vers l'intérieur (cellules non phagocytaires) du milieu cellulaire. Comme expliqué précédemment, la NAD(P)H Oxydase existe sous plusieurs isoformes, présentées dans la Figure 10 ci-dessous.

Figure 10. Tableau présentant les NADPH Oxydases
(d'après Migdal et Serres, 2011 et Cillard, 2011)

Types de NOX	Distribution	Fonctions	Pathologies
NOX 1	Fibroblastes Cellules épithéliales du poumon	Prolifération	Athérogénèse et maladies cardio-vasculaires
	Cellules épithéliales du côlon	Nécrose et défense	
	Cellules musculaires lisses vasculaires	Hypertrophie, prolifération et migration	
NOX 2	Neutrophiles	Défense	Granulomatose Maladies cardio-vasculaires Carcinome prostatique Angiogénèse Neurodégénérescence
	Cellules endothéliales	Angiogénèse	
	Fibroblastes	Nécrose	
	Macrophages	Apoptose	
NOX 3	Oreille interne	Sénescence	Octoconies
NOX 4	Cellules musculaires lisses vasculaires	Signalisation cellulaire (migration)	Athérogénèse et maladies cardio-vasculaires Neurodégénérescence Angiogénèse Diabète
	Cellules musculaires lisses des voies aériennes	Survie et croissance	
	Cellules mésangiales		
	Adipocytes	Différenciation	
NOX 5	Cellules épithéliales alvéolaires	Expression génique	Infertilité masculine
	Cellules musculaires lisses vasculaires	Prolifération	
DUOX 1 et 2	Cellules épithéliales (Thyroïdes, poumon)	Défense et inflammation	Maladies thyroïdiennes
	Thyroïde	Iodation des hormones	

Nous allons voir en détail le fonctionnement des Nox et plus précisément de la Nox 2.

ii. La NAD(P)H Oxydase des phagocytes : Nox 2

La forme inactive de Nox 2 est constituée de deux sous-unités présentes dans deux compartiments cellulaires distincts. D'une part, un hétérodimère membranaire (le flavocytochrome b558) composé d'une sous-unité lourde (91kDa) gp91^{phox} détaillée ci-dessous (phox pour Phagocytic **O**xidase) et d'une sous-unité légère p22^{phox} (22kDa) et d'autre part des protéines régulatrices cytosoliques (p47^{phox}, p40^{phox} et p67^{phox}).

iii. *Gp91phox* : La sous-unité catalytique

Sous unité lourde du flavocytochrome b558, gp91^{phox} possède :

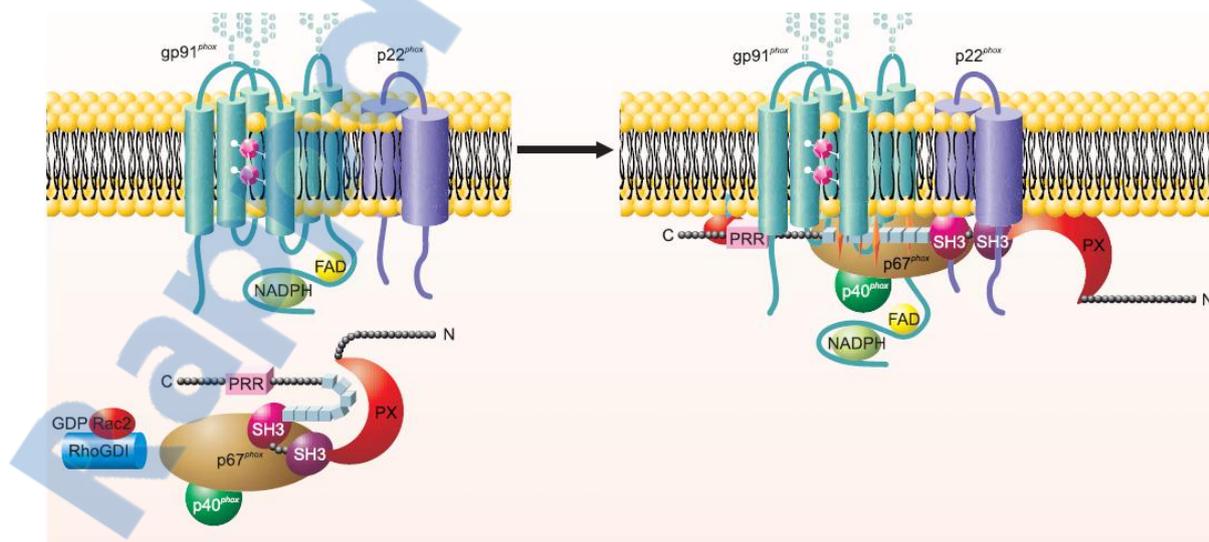
- un domaine carboxyl-terminal cytoplasmique lié de façon covalente à un FAD et capable de fixer le NAD(P)H ;
- un domaine amino-terminal composé de six domaines transmembranaires ayant deux groupements héminiques très proches.

C'est au niveau du domaine gp91^{phox} que sont transférés les électrons : la flavine réduite (FADH₂) par le gain des électrons du NADPH cytoplasmique, transmet via les hèmes intermembranaires, ses électrons au dioxygène ce qui le transforme en anion superoxyde.

iv. *L'activation des NOX*

Comme le montre la Figure 11 ci-dessous, l'enzyme NOX n'est active que lorsqu'elle est assemblée. En effet, des protéines régulatrices cytosoliques (p47^{phox}, p40^{phox} et p67^{phox}) migrent vers la membrane et s'associent au flavocytochrome b558 pour former une Nox2 active (Nauseef, 2008).

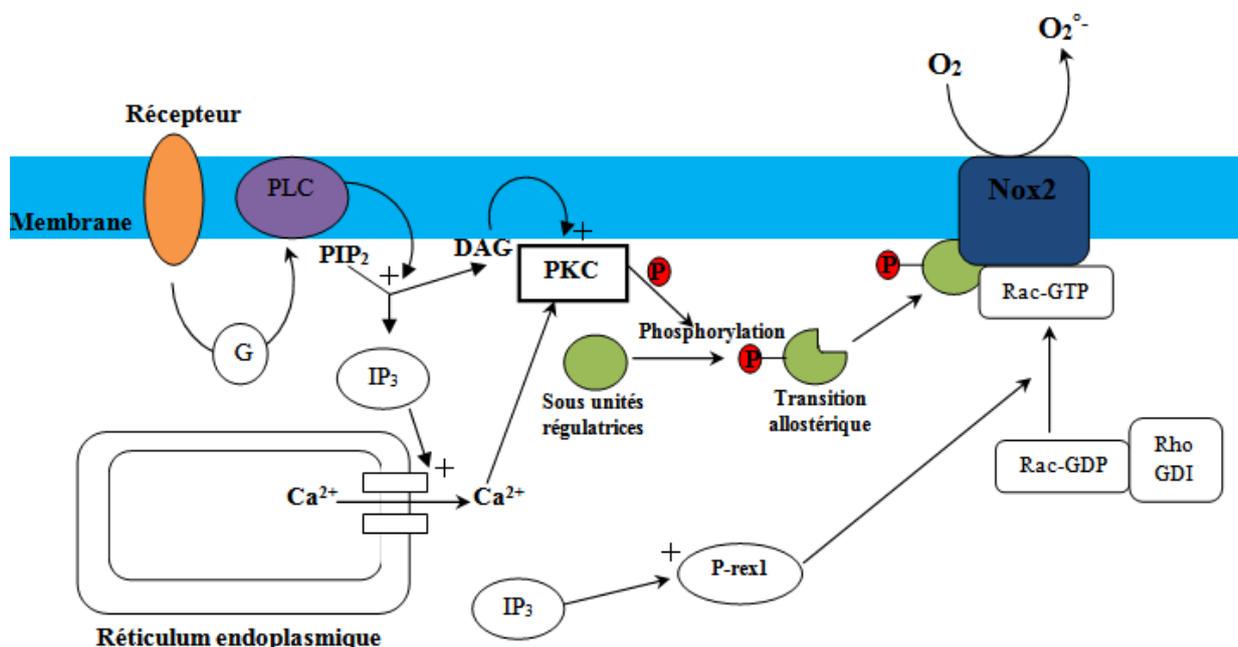
Figure 11. Assemblage et activation de la NOX phagocytaire (NOX2) (D'après Nauseef, 2008).



L'activation de la NOX phagocytaire se produit après une cascade de phosphorylation (Figure 12).

Comme nous l'enseignent Maghzal *et al.* (2012), Nox 1, Nox 2 et Nox 3 s'activent suite à la fixation de facteurs cytosoliques (comme le fragment C5a du complément, TNF α , IL-8, lipopolysaccharide bactérien etc...) alors que Nox 4 génère de façon constitutive des anions superoxydes et que Nox 5, Duox 1 et 2 nécessitent une élévation de la concentration cellulaire en Ca²⁺.

Figure 12. Cascade d'activation de Nox 2 et formation d'anion superoxyde (Illustration personnelle d'après Jungbluth, 2008).



G : Protéine G, PIP₂ : Phosphatidylinositol biphosphate, IP₃ : inositol triphosphate, PLC: Phospholipase C, PKC : Protéine kinase C, DAG: Diacylglycérol, P: Phosphate, RhoGDI: Protéine G Rho Dissociation Inhibitor, GTP: Guanosine triphosphate, GDP: Guanosine diphosphate.

Comme l'illustre la Figure 12 ci-dessus, la fixation d'un ligand (fragment C5a du complément, TNF α , IL-8, lipopolysaccharide bactérien ...) sur le récepteur membranaire aboutit à une cascade de réactions ayant pour messagers des protéines G. Ainsi, la PLC active la transformation du PIP₂ en DAG et IP₃. Ces deux composés activent (directement pour le DAG, via une augmentation de la concentration intracytosolique en Ca²⁺ pour IP₃) la PKC qui va

phosphoryler sept ou huit sites sur l'extrémité C-terminale de p47. Les autres sous-unités gp91^{phox}, p22^{phox}, p67^{phox} et p40^{phox} sont également phosphorylées mais les kinases ainsi que les sites de phosphorylation ne sont pas clairement identifiés. Ces phosphorylations entraînent une transition allostérique et un changement de conformation des sous-unités qui deviennent plus affines pour la Nox 2. La fixation des sous-unités à la Nox 2 entraîne l'activation de cette dernière. L'activation est cependant complète seulement si la protéine Rac activée par du GTP est fixée à Nox 2. Le mécanisme est mal connu mais la protéine Rac-GDP est fixée à une protéine inhibitrice GDI. L'intervention de l'IP₃ qui activerait une protéine P-rax1, responsable de la dissociation de GDI et Rac-GDP, permettrait le remplacement du GDP par du GTP et ainsi, la fixation de la protéine Rac aux sous unités gp91^{phox} et p67^{phox} de la Nox 2. Cette étape finale déclencherait le transfert d'électrons du NADPH à l'oxygène et serait à l'origine de la production d'O₂^{•-} (Jungbluth, 2008).

v. *La flambée respiratoire*

Dans les années 1960, il était évident qu'une augmentation de l'activité métabolique accompagnait le procédé de phagocytose. C'est ainsi que, selon Babior (1984), la flambée respiratoire a été décrite premièrement en 1932 puis fut explorée dans les années 1960 par d'autres auteurs qui ont alors découvert que la flambée respiratoire était associée à la formation de peroxyde d'hydrogène et que ce dernier ou un des composés produits avait une activité antimicrobienne.

Lorsqu'une réaction inflammatoire se produit, il y a ensuite déclenchement de la phagocytose et on observe une surconsommation d'oxygène. Babior (1984) explique dans un article qui lui est dédié que lors de la flambée respiratoire, la consommation d'oxygène peut parfois être multipliée par cinquante. La flambée respiratoire (ou burst respiratoire ou burst oxydatif) se définit comme une production massive d'ERO dans un contexte inflammatoire (Valko *et al.*, 2007). Dans ce contexte, les neutrophiles activés et les macrophages produisent de grande quantités d'ERO (la concentration en H₂O₂ par exemple est multipliée par dix) et notamment d'anion superoxyde suite à l'activation de la NADPH oxydase par les protéines rac (rac 2 dans les neutrophiles et rac 1 dans les macrophages) comme vu au 5.1.1 b iv. L'implication de la NADPH oxydase est démontré dans l'étude d'une maladie particulière : la maladie granulomateuse chronique (ou CGD pour chronic granulomatous disease en anglais). Comme nous l'explique

Loffredo (2011), nous n'observons pas de flambée respiratoire chez les patients atteints de CGD qui sont, en outre, sujets à de nombreuses infections. Ce sont des individus chez lesquels la NADPH oxydase est non fonctionnelle (immunodéficience primaire).

L'anion superoxyde est ainsi la première ERO à être produite lors de phénomène de stress oxydant. Il est le point de départ des réactions aboutissant à la formation des autres ERO. Intéressons nous maintenant aux propriétés de l'anion superoxyde.

1.2 Les propriétés de l'anion superoxyde

La demi-vie de l'anion superoxyde est plutôt longue : elle est mille fois supérieure à celle du radical hydroxyle par exemple, selon Palmieri et Sblendorio (2007) ce qui nous amène à penser, comme le soulignent Gardes-Albert *et al.* (2003) que l'anion superoxyde peut diffuser loin de son lieu de production. Cependant, les membranes biologiques lui étant relativement peu perméables, sa diffusion et donc, sa dangerosité, sont limitées (Lenzi, 2011).

Comme nous l'explique Jungbluth (2008), la réaction de formation de l'anion superoxyde a une constante de vitesse faible (inférieure à $10^2 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$) comme toutes les réactions dans lesquelles l'anion superoxyde est impliqué. En effet, il s'agit du radical le moins réactif vis-à-vis des substrats organiques.

Cependant, il possède une affinité particulière pour certains substrats : le cytochrome c (plus précisément l'ion Fe^{3+}), la vitamine C et la Super Oxyde Dismutase (SOD). Ainsi, il présente une toxicité indirecte (Migdal et Serres, 2011) qui s'exerce par les dérivés qui sont produits. En effet, ces derniers présentés ci-après sont plus réactifs.

De plus, la toxicité de l'anion superoxyde réside surtout dans sa capacité à entretenir les réactions radicalaires en chaîne comme la lipoperoxydation vue au 5.4.4.

En revanche, il existe une forme protonée : le radical hydroperoxyde HO_2^\bullet qui est plus réactif et plus dangereux que l'anion superoxyde. Il traverse les membranes biologiques et s'attaque aux acides gras polyinsaturés (Tissier, 2011).

1.3 La production d'anion superoxyde est finement modulée par la cellule (Carriere *et al.*, 2006).

La production d'anion superoxyde au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire mitochondriale est contrôlée par la pression partielle en dioxygène et par l'état réduit ou oxydé des complexes. En effet, si la pression partielle en dioxygène est élevée et/ou si les complexes sont à l'état réduit, de l'anion superoxyde pourra être produit.

Il existe des molécules capables d'inhiber le transfert d'électrons au sein des complexes I et III de la chaîne respiratoire mitochondriale ce qui augmente la production d'ERO. L'utilisation pharmacologique de ces molécules a permis notamment d'étudier les effets des ERO.

Une surproduction d'anion superoxyde et donc d'ERO en général intervient lorsque par exemple, il existe un déséquilibre entre les besoins énergétiques cellulaires et la quantité de substrat apporté à la cellule (ce qui induit un rapport ATP/ADP élevé). L'ATP synthase a alors moins d'ADP à phosphoryler et ne fonctionne que très peu ce qui ne permet pas de dissiper le gradient cellulaire de protons. Ce potentiel de membrane ralentit alors la progression des électrons au sein de la chaîne respiratoire et augmente la production concomitante d'ERO. C'est ce qu'il se produit lors d'hyperglycémie par exemple. Nemoto *et al.* (2000) ont montré que lorsqu'il y a un excès de substrat énergétique (en pyruvate lors d'hyperglycémie), les ERO produits (dérivés de l'anion superoxyde) activent une voie de signalisation cellulaire qui réoriente le métabolisme permettant un stockage du glucose plutôt qu'une utilisation oxydative.

De façon corollaire, toute molécule qui est capable d'augmenter le potentiel de membrane permet de diminuer la production d'anion superoxyde et d'ERO dérivés (Le céramide, sphingolipide des membranes cellulaires en est un exemple).

Nous venons de le voir, l'anion superoxyde est le point de départ des réactions du stress oxydant. Les auteurs s'accordent pour dire qu'il est relativement peu dangereux et sa production est relativement bien régulée. Il donne naissance à d'autres ERO auxquelles nous allons maintenant nous intéresser.

1.4 Présentation des dérivés de l'anion superoxyde

Considéré comme une ERO primaire, l'anion superoxyde est l'une des premières ERO à être formée par réduction d'une molécule de dioxygène. Il peut interagir avec d'autres molécules pour former des ERO secondaires de façon directe ou par l'intervention d'enzymes catalysant le processus (Valko *et al.*, 2005).

En réagissant avec le monoxyde d'azote NO° et sous l'action de la NO synthase, l'anion superoxyde va conduire à la formation de peroxynitrites.

Grâce à l'intervention de la super-oxyde dismutase (SOD), l'anion superoxyde va aboutir à la formation de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . L'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène activent plusieurs voies de signalisation et jouent un rôle crucial lors de l'inflammation et dans le précieux équilibre entre croissance, sénescence et apoptose cellulaire (Barouki, 2006).

Les composés azotés qui dérivent du métabolisme de l'oxygène lors du processus de stress oxydant sont parfois regroupés sous le nom d'espèces réactives de l'azote. On distingue le monoxyde d'azote et ses dérivés : le dioxyde d'azote et le peroxynitrite.

2. Les dérivés azotés de l'anion superoxyde

2.1 Formation du monoxyde d'azote par la NO synthase

NO° est un radical libre provenant de la transformation de la L-arginine ($\text{R}=\text{NH}$) en citrulline ($\text{R}=\text{O}$) (sous forme L ou D, le doute subsiste encore (Alderton *et al.*, 2001) par la NO-Synthase. (Valko *et al.*, 2007):



a. Les trois isoformes de la NO synthase

Identifiées pour la première fois en 1989, les trois isoformes de la NO synthase ont été clonés et purifiés entre 1991 et 1994 (Alderton *et al.*, 2001) :

- La NOS neuronale exprimée de manière constitutive et prédominante dans le cytoplasme des cellules du système nerveux central. Elle est activée par l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire ;
- La NOS inductible présente dans le cytoplasme des macrophages (mais aussi, en moindre mesure, dans les hépatocytes, les neutrophiles, les cellules pancréatiques et les cellules endothéliales). Elle aussi est activée par l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire, après action d'un stimulus inflammatoire (TNF α , IL-1, IFN γ , lipopolysaccharide bactérien...). Valko *et al.* (2007) précisent que c'est la stimulation des lipopolysaccharides, des cytokines et d'autres agents qui induit l'expression de la NOS inductible des macrophages ;
- La NOS endothéliale, exprimée de façon constitutive et associée aux membranes plasmiques et à l'appareil de Golgi des cellules endothéliales, des plaquettes et des cellules mésangiales rénales. Elle est également activée par une augmentation de la concentration calcique intracellulaire.

b. Structure des NO synthases

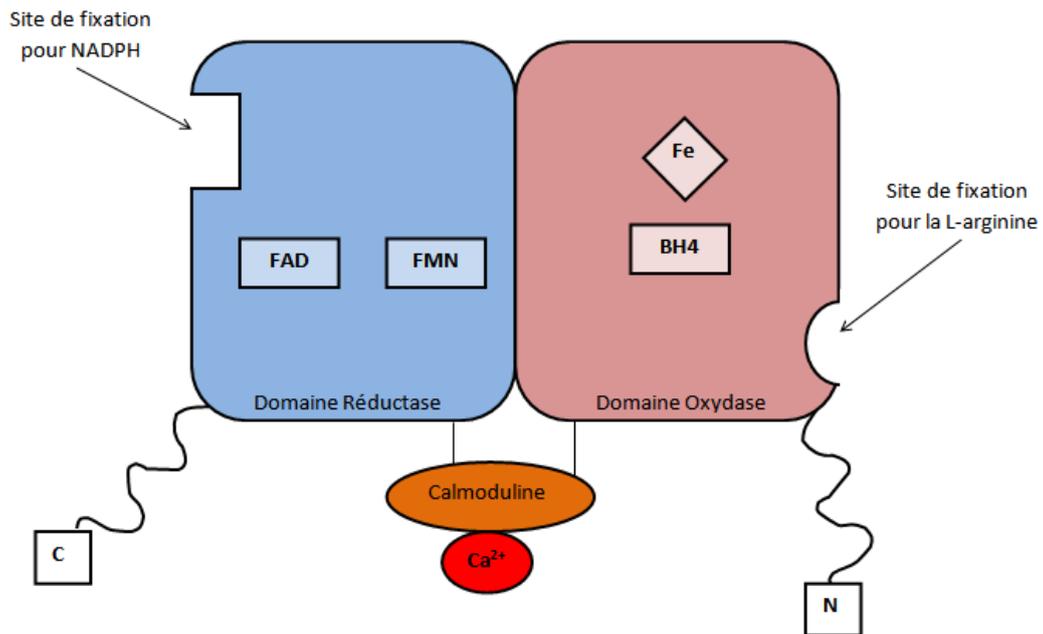
Les NOS sont associées en dimères et donc, formées de deux sous unités. Chaque sous unité, représentée sur la Figure 13, possède deux domaines : un domaine réductase à l'extrémité C-terminale et un domaine oxydase à l'extrémité N-terminale.

Le domaine réductase possède deux flavines (FMN pour flavine mono nucléotide et FAD pour flavine adénine dinucléotide) et un site de fixation pour le NADPH.

Le domaine oxydase possède un hème, un coenzyme particulier : la tétrahydrobioptérine (BH₄) et un site de fixation pour la L-arginine.

Les deux domaines sont reliés par un pont protéique capable de fixer une molécule de calmoduline (Alderton *et al.*, 2001 et Jungbluth, 2008).

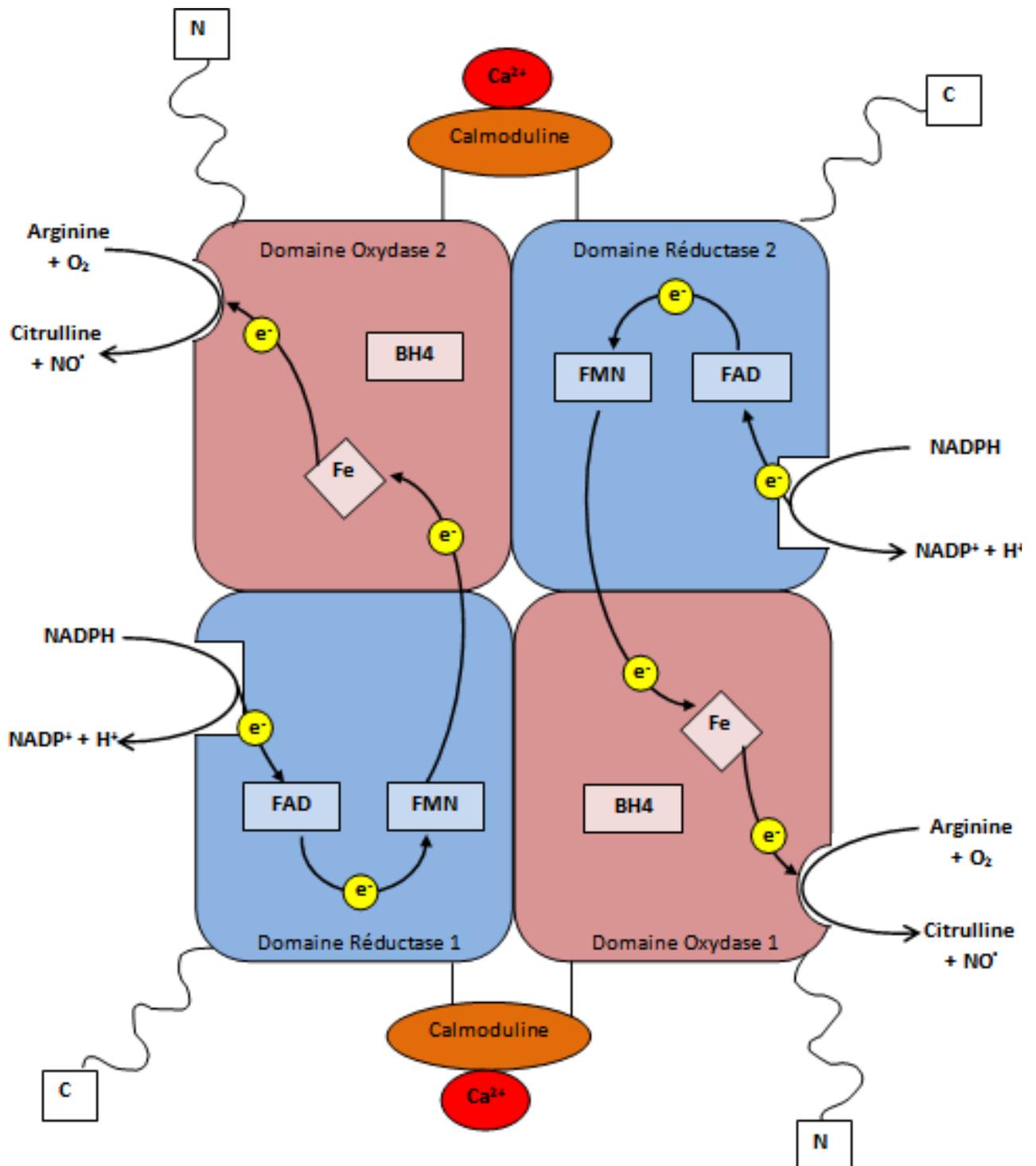
Figure 13. Structure d'une sous-unité d'une NO synthase (Illustration personnelle d'après Alderton *et al.*, 2001).



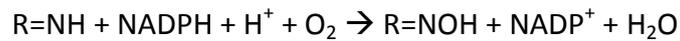
c. Cycles réactionnels

Selon Alderton *et al.* (2001), le flux d'électrons au sein du dimère s'effectue du domaine réductase d'une sous unité au domaine oxydase de la deuxième sous unité (Figure 14). NADPH est le donneur d'électrons initial puis les flavines permettent de donner transférer les électrons un par un, l'hème ne pouvant en accepter qu'un seul à la fois. Il semblerait que le domaine oxydase reçoive l'arginine puis un premier électron transféré depuis le NADPH puis le dioxygène et enfin, un deuxième électron transféré du BH₄.

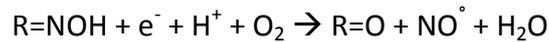
Figure 14. Flux d'électrons dans les NOS
 (Illustration personnelle d'après Alderton et al., 2001).



Jungbluth (2008) décrit que la formation d'une molécule de NO° nécessite deux cycles. Tout d'abord, la L-arginine (R=NH) est hydroxylée en N-ω-hydroxyarginine (R=NOH) :



Ensuite, le deuxième cycle d'oxygénation permet la transformation de la N-ω-hydroxyarginine en citrulline, ce qui libère une molécule de NO° :



Au cours du deuxième cycle d'oxygénation, l'hème réagirait avec le substrat lorsque l'oxygène arrive au stade superoxyde. C'est alors le substrat qui fournirait le deuxième électron.

Le monoxyde d'azote produit par deux cycles au sein des NO synthases qui catalysent la réaction de formation est abondant dans les milieux biologiques et possède des actions bénéfiques et délétères pour l'organisme.

2.2 Les effets bénéfiques et délétères du monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote NO° œuvre comme neurotransmetteur et comme messenger pour la régulation de la pression sanguine (activation de la guanylate cyclase), les mécanismes de défense, la relaxation musculaire et la régulation de l'immunité (Valko *et al.*, 2007).

a. Propriétés du monoxyde d'azote

NO° a, dans les milieux aqueux, une demi-vie de quelques secondes. Cependant, cette dernière peut dépasser les quinze secondes si la concentration en dioxygène est faible. Il s'agit d'une demi-vie élevée pour une espèce radicalaire ce qui lui confère une dangerosité potentielle en lui permettant de diffuser et d'agir au sein des cellules de l'organisme.

NO° étant hydrosoluble et liposoluble, il diffuse aisément au travers des membranes biologiques et provoque des effets néfastes sur le système nerveux central en altérant la plasticité synaptique (Jungbluth, 2008).

NO° n'est délétère que lorsqu'il est présent en concentration importante. En effet, dans cette situation, il va générer du peroxyde d'azote, agent très oxydant comme expliqué ci-dessus. (Lenzi, 2011).

b. Inactivation des protéines par le monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote réagit avec les fonctions thiols de certaines protéines, sur un résidu cystéine, ce qui a pour conséquence l'inactivation de ces dernières (Jungbluth, 2008) :



Il s'agit d'une réaction de S-nitrosylation.

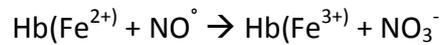
c. Fixation des métaux de transition par le monoxyde d'azote et activation de la guanylate cyclase

NO° peut fixer certains métaux de transition comme le Fe²⁺ présent dans les groupements héminiques de certaines enzymes comme la guanylate cyclase (Valko *et al.*, 2007). Cette fixation entraîne l'activation de l'enzyme et donc la synthèse de GMPc (Droge, 2002). Le GMPc est un second messenger intervenant dans la signalisation cellulaire et pouvant provoquer une vasodilatation, une bronchodilatation et une inhibition de l'agrégation plaquettaire (Jungbluth, 2008). En activant la guanylate cyclase, le monoxyde d'azote exerce donc des fonctions vasculaires mais également immunitaire, neuronales et métabolique (Barouki, 2006).

La fixation de métaux de transition des groupements héminiques peut également aboutir à l'inactivation d'enzymes et perturber gravement le fonctionnement cellulaire. C'est le cas pour l'aconitase (enzyme du cycle de Krebs qui permet la réalisation de l'isomérisation stéréospécifique du citrate en isocitrate) ou la ribonucléotide réductase, nécessaire à la synthèse de l'ADN.

d. Oxydation de l'hémoglobine par le monoxyde d'azote

L'affinité du monoxyde d'azote pour l'hémoglobine est nettement supérieure à celle de l'oxygène. C'est ainsi que le NO[°] oxyde l'oxyhémoglobine en méthémoglobine qui est alors inapte au transport de l'oxygène. Il se produit une hypoxie sévère pouvant entraîner la mort.

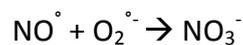
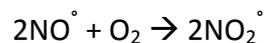


NO[°] réagit donc avec l'anion superoxyde et peut avoir des effets délétères et participer au stress oxydant. Cependant, il est présent en grande quantité de façon physiologique et occupe plusieurs rôles dans la signalisation cellulaire.

C'est d'ailleurs cette diversité d'effets qu'il produit qui lui a permis d'obtenir le titre de « molécule de l'année » en 1992 attribué par la revue *Sciences* (Jungbluth, 2008).

2.3 Réactions possibles du monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote produit deux dérivés en réagissant avec l'oxygène et l'anion superoxyde :



a. Réaction entre le monoxyde d'azote et l'oxygène : formation de dioxyde d'azote

Le dioxyde d'azote ou NO₂[°] agit de trois façons : par addition sur une double liaison, par déshydrogénation ou par transfert d'électrons.

Quelque soit l'action observée, il y a toujours formation d'un nouveau radical libre susceptible de propager une réaction en chaîne (Tissier, 2011) comme une peroxydation lipidique (des LDL par exemple, Carr *et al.*, 2000).

Comme l'expliquent Augusto *et al.* (2002), le dioxyde d'azote serait très réactif et induirait la formation d'acides gras polyinsaturés nitrés (acide arachidonique principalement) qui joueraient le rôle de nouveaux messagers.

b. Réaction entre le monoxyde d'azote et l'anion superoxyde :
formation de peroxynitrite

Le monoxyde d'azote est une molécule très réactive qui réagit avec un grand nombre de substrat, notamment par nitration (Jungbluth, 2008). Il possède une demi-vie relativement longue et il est capable de traverser les membranes cellulaires. Cependant, il serait rapidement protoné en acide nitreux et son importance *in vivo* n'est pas clairement comprise (Tissier, 2011).

L'anion peroxynitrite NO_3^- est un puissant agent oxydant qui provoque l'oxydation de l'hémoglobine et de la méthémoglobine, l'oxydation lipidique (notamment des LDL), la fragmentation de l'ADN (Carr *et al.*, 2000) et qui a également des effets délétères sur les protéines (Jungbluth, 2008).

On peut noter que le peroxynitrite peut aussi être formé par l'oxydation de NO_2^- par la myéloperoxydase ou le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (Fang, 1997).

L'anion superoxyde possède encore beaucoup d'autres dérivés qu'il nous reste à découvrir. Nous allons maintenant nous intéresser à la formation de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 sous l'action de la super-oxyde dismutase (SOD).

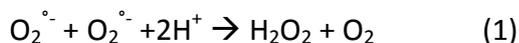
3. Le peroxyde d'hydrogène

Comme nous l'avons vu précédemment, l'anion superoxyde possède une réactivité peu importante. C'est en fait l'EOR possédant la plus faible réactivité. Ainsi, nous rappelons qu'il doit sa toxicité aux espèces qui en sont dérivées. Parmi celles-ci, le peroxyde d'hydrogène ou eau oxygénée, de formule H_2O_2 , est particulièrement réputé pour sa toxicité qui est, nous le verrons, principalement due aux dérivés produits.

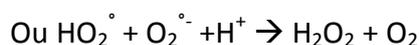
3.1 Formation du peroxyde d'hydrogène H₂O₂

a. Réactions de dismutation de l'anion superoxyde

La plupart du peroxyde d'hydrogène présent dans l'organisme est formé par dismutation :



La constante de vitesse de cette réaction étant extrêmement faible, il est thermodynamiquement impossible que cette réaction se produise spontanément *in vivo* car il s'agit d'une réaction endothermique. On observe alors l'intervention du radical hydroperoxyde HO₂[°] présenté plus haut (Jungbluth, 2008 et Gardes-Albert, 2006) :



Les constantes de vitesse de ces deux réactions sont suffisamment élevées pour qu'elles soient source de peroxyde d'hydrogène *in vivo* (Gardes-Albert, 2006).

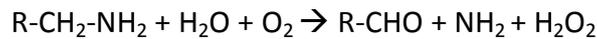
Comme nous les présentent Zelko *et al.* (2002), et comme détaillé ci-après, les superoxyde dismutases permettent de multiplier la constante de vitesse de la réaction (1) par mille.

b. Catalyse des réactions de formation du peroxyde d'hydrogène par les enzymes mitochondriales

H₂O₂ peut être formé par des réactions catalysées par des enzymes mitochondriales qui n'appartiennent pas à la chaîne respiratoire et qui sont, pour la plupart des déshydrogénases flaviniques. Ces enzymes réduisent le dioxygène O₂ en anion superoxyde O₂^{°-} ou en peroxyde d'hydrogène H₂O₂ à l'aide de l'intervention d'un cofacteur réduit : FADH₂ (Jungbluth, 2008).

Comme nous le rappellent Cadenas et Davies (2000), les monoamines oxydases sont une source importante de peroxyde d'hydrogène. Ce sont des enzymes retrouvées de façon ubiquitaire dans les membranes externes des mitochondries. Elles catalysent la transformation des monoamines (R-CH₂-NH₂) en aldéhydes (R-CHO). Il s'agit d'une désamination oxydative.

Certaines monoamines sont primordiales au fonctionnement cellulaire puisqu'il s'agit de neurotransmetteurs (sérotonine, dopamine, noradrénaline, adrénaline) :



Drahota *et al.* (2002) nous enseignent le rôle de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase dans la formation de peroxyde d'hydrogène (et dans une moindre mesure, d'anion superoxyde) dans le cytosol. Il s'agit d'une enzyme présente dans la membrane interne des mitochondries (en grande quantité dans le tissu adipeux brun et le cerveau) qui permet de générer du NAD^+ en assurant le transport des électrons entre le NADH présent dans le cytosol et la chaîne respiratoire mitochondriale.

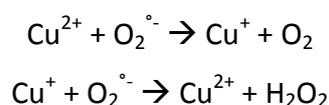
3.2 Les superoxyde dismutases

Les superoxyde dismutases sont le premier et le plus important élément de défense contre les EOR et plus particulièrement contre l'anion superoxyde (Zelko *et al.*, 2002). En effet, même si elles sont à l'origine de la production de peroxyde d'hydrogène, elles permettent surtout de diminuer la durée d'existence de l'anion superoxyde et ainsi, d'empêcher la formation d'espèces beaucoup plus néfastes comme le peroxyde d'hydrogène par exemple.

Découverte en 1969 par McCoord et Fridovich (Valko *et al.*, 2007), il existe trois isoformes de la superoxyde dismutase (Fridovich, 1997) qui diffèrent par leurs localisations et leurs cofacteurs.

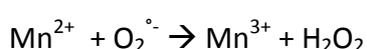
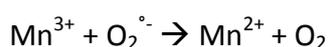
a. SOD 1 ou CuZn-SOD

Découverte en premier, il s'agit d'un homodimère très stable. Elle possède du cuivre (Cu) et du zinc (Zn) comme cofacteurs dans son centre catalytique et est localisée dans le milieu intracellulaire (Fridovich, 1997 et Starkov, 2008). Elle est particulièrement active dans le foie, le cerveau et les globules rouges. Le cuivre participe à l'activité catalytique alors que le zinc stabilise le site actif (Jungbluth, 2008) où il se produit une alternance de réduction et d'oxydations du cuivre par les anions superoxydes :



b. SOD 2 ou Mn-SOD

Assemblée en tétramère, la protéine SOD-2 possède Mn comme cofacteur dans son centre catalytique et est présente dans les membranes internes des mitochondries (Fridovich, 1997). Starkov (2008) et Andreyev *et al.* (2005) signalent sa présence plutôt dans la matrice mitochondriale où elle permet la protection des mitochondries face aux anions superoxydes produits. Son activité est plus notable dans le cœur, le cerveau, le foie et les reins (Jungbluth, 2008). On observe aussi, au sein du site actif, une alternance de réduction et d'oxydation :



c. SOD 3 ou EC-SOD

Il s'agit de la SOD découverte le plus récemment. Assemblée en tétramère, elle possède une haute affinité pour l'héparine et a été détectée dans le plasma, la lymphe, les liquide d'ascite et dans le liquide cérébro-spinal (Fridovich, 1997). Comme SOD 1, elle possède Cu et Zn comme cofacteur dans son centre catalytique mais est localisée dans le milieu extracellulaire. Son mécanisme d'action est encore mal connu et il s'avère que les concentrations en SOD 3 chez le chien sont extrêmement faibles (Jungbluth, 2008).

Le peroxyde d'hydrogène est donc principalement formé par dismutation du dioxygène, catalysée par la superoxyde dismutase. Cette molécule possède différents rôles, plus ou moins néfastes au sein de l'organisme et est à l'origine de nombreux dérivés impliqués dans le processus de stress oxydant.

3.3 Quelques actions physiologiques du peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène jouerait un rôle dans la régulation de l'apoptose cellulaire (Lenzi, 2011).

Selon Droge (2002), le peroxyde d'hydrogène peut, au sein des lymphocytes T activés, augmenter la production de facteurs de croissances et d'IL-2, protéine importante dans la régulation du système immunitaire (elle permet la prolifération des CD4 et CD8, augmente l'activité des macrophages et la production d'anticorps par les lymphocytes B).

Droge (2002) rapporte également l'induction du gène codant l'hème oxygénase 1 (enzyme responsable de la dégradation de l'hème) et de nombreux gènes bactériens.

Ce même auteur cite par ailleurs l'activation du facteur de transcription NF κ B (NF pour Nuclear Factor) par le peroxyde d'hydrogène. L'activation de ce facteur, entrainerait notamment la régulation de l'expression d'enzymes anti-oxydantes (comme la SOD) et de protéines cytoprotectrices comme les HSP (Heat Shock Proteins) qui chaperonnent les protéines dégradées par l'effort musculaire permettant leur orientation vers les protéasomes où elles peuvent être recyclées en protéines fonctionnelles (Lenzi, 2011).

Enfin, Droge (2002) aborde le fait que le peroxyde d'hydrogène permet une activation de la guanylate cyclase (enzyme pouvant être activée par le NO comme expliqué au 0 2.2) qui provoque la formation de GMPc, second messenger possédant d'importants rôles dans la signalisation cellulaire et notamment dans la régulation du tonus vasculaire.

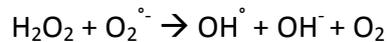
3.4 Les dérivés formés à partir du peroxyde d'hydrogène sont responsables de sa toxicité

Le peroxyde d'hydrogène est unanimement reconnu comme un agent cytotoxique. Cependant, il est chimiquement peu réactif, surtout en l'absence de métaux de transition.

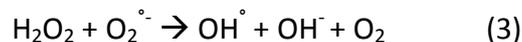
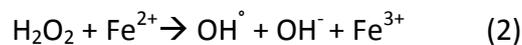
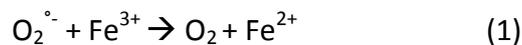
En réalité, sa dangerosité est liée à sa conversion en radical hydroxyle OH° sous l'action des UV ou par l'interaction avec des ions métalliques comme le fer ferreux Fe^{2+} .

a. La réaction d'Haber-Weiss et formation de radical hydroxyle

Il s'agit de la réaction d'une molécule de peroxyde d'hydrogène avec un anion superoxyde pour former un radical hydroxyle, un anion hydroxyde et une molécule de dioxygène :



Comme nous le rappelle Jungbluth (2008), cette réaction est thermodynamiquement possible *in vivo* mais avec une constante de vitesse très faible. Cependant, elle peut être catalysée par des cations métalliques comme l'ion ferreux Fe^{2+} (ou l'ion cuivre Cu^{2+}) :



Nous reconnaissons en (3), la réaction d'Haber-Weiss et la réaction (2) est appelée réaction de Fenton.

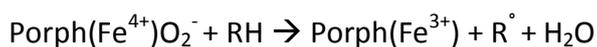
L'existence de ces deux réactions est largement discutée désormais dans la littérature. En effet, comme nous l'explique Koppenol (2001), les métaux de transition sont, pour la plupart, complexés par des matières organiques ce qui modifie leurs propriétés chimiques et thermodynamiques et les rend incapables de réaliser de telles réactions. De plus, la majorité du fer ionisé *in vivo* serait sous forme ferrique Fe^{3+} (Lenzi, 2011) ce qui empêche la réaction de Fenton de se produire.

b. Réaction avec les peroxydases (Jungbluth, 2008 et Furtmuller *et al.*, 2006)

Les peroxydases sont des enzymes héminiques avec un atome de fer au centre de l'hème. Le peroxyde d'hydrogène est réduit par deux électrons cédés par le fer Fe^{3+} et par une liaison covalente (liaison π) de la protéine :



Lorsque le composé I ($\text{Porph}^{\circ+}(\text{Fe}^{4+})\text{O}_2^-$) rencontre une molécule organique RH, il peut lui arracher un électron et se transformer en composé II ($\text{Porph}(\text{Fe}^{4+})\text{O}_2^-$). La molécule organique devient alors une espèce radicalaire R° et un proton est libéré. De la même façon, le composé II peut générer une espèce radicalaire R° en reprenant la forme initiale $\text{Porph}(\text{Fe}^{3+})$ et en libérant une molécule d'eau :



Les groupements ferryles $\text{Fe}^{4+}\text{O}_2^-$ présents dans les composés I et II sont très réactifs et oxydent des substrats de façon non spécifique.

La réaction des espèces radicalaires produites avec du dioxygène peut aboutir à la formation de radicaux peroxydes responsables de réactions en chaîne produisant des hydroperoxydes qui affectent particulièrement les acide gras polyinsaturés : il s'agit de la lipoperoxydation des acides gras que nous détaillerons dans le 4.4.

Parmi les peroxydases cellulaires, nous porterons une attention particulière à la myéloperoxydase un peu plus loin dans ce travail.

4. Le radical hydroxyle : le plus redouté des radicaux libres

Comme nous l'avons vu précédemment, le radical hydroxyle est formé par la célèbre mais néanmoins discutée réaction d'Haber-Weiss. Nous verrons plus loin dans ce travail qu'il est également formé par l'action de la MPO.

4.1 Propriétés physico-chimiques du radical hydroxyle

Les constantes de vitesse de réaction du radical hydroxyle avec les substrats organiques (protéines, ADN, lipides...) sont très élevées. En effet, la valeur limite des constantes de vitesse est $10^{10} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$. Celles des réactions entre le radical hydroxyle et ses substrats organiques varient entre 10^8 et $10^{10} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$. C'est pourquoi, une seule collision suffit à ce que la réaction se produise, sans apport d'énergie supplémentaire.

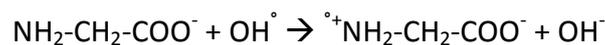
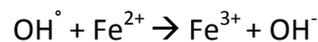
Ainsi, la durée de vie de ce radical est extrêmement faible (10^{-9} s) et sa diffusion au sein des tissus s'en trouve fortement limitée. Il s'agit donc d'un radical qui réagit au sein même de son lieu de production, ce qui lui confère une grande toxicité *in situ*.

4.2 Mode d'action du radical hydroxyle

Il réalise des oxydations mono-électriques c'est-à-dire qu'il arrache un électron à la cible qui se retrouve alors transformée en espèce radicalaire.

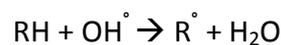
a. Arrachement d'électrons

Il s'agit d'un transfert de charge que l'on peut illustrer par la réaction avec un radical hydroxyle et l'ion ferreux (Jungbluth, 2008) ou avec un acide aminé particulier : la glycine (Gardes-Albert, 2006) :



b. Arrachement d'un atome d'hydrogène sur un substrat organique

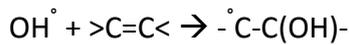
Le radical hydroxyle arrache un atome d'hydrogène à un substrat organique RH qui se retrouve alors sous sa forme radicalaire R^\bullet :



Les espèces radicalaires ainsi formées peuvent se transformer en radicaux peroxydes par addition d'une molécule de dioxygène et propager des réactions en chaîne comme nous l'avons vu au 3.4 b. (Jungbluth, 2008 et Gardes-Albert, 2006).

c. Addition sur une double liaison

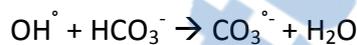
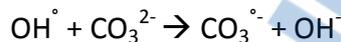
Cette troisième voie a lieu au niveau des doubles liaisons comme sur les bases de l'ADN, les acides aminés aromatiques ou les acides gras polyinsaturés par exemple. L'addition du radical hydroxyle sur une double liaison carbonée aboutit à la formation de sites radicalaires sur les atomes de carbone (Gardes-Albert, 2006) :



Le radical hydroxyle, très redouté, est à l'origine de radicaux carbonates et surtout responsable de peroxydations lipidiques.

4.3 Production de radical carbonate

Comme nous le rappelle Tissier (2011), le radical carbonate est responsable de l'oxydation de l'acide hyaluronique et certains acides aminés mais sa toxicité *in vivo* est très mal connue. Il est formé par réaction entre le radical hydroxyle OH^\bullet et les ions bicarbonates ou carbonates :

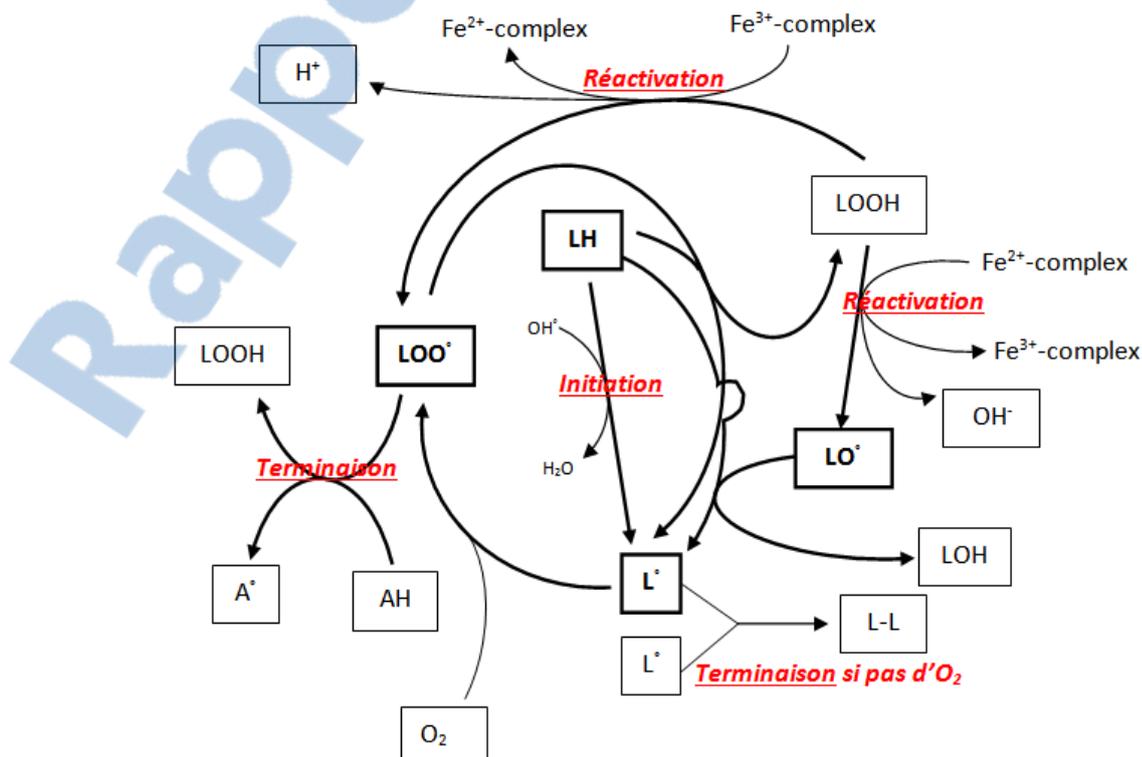


4.4 La lipoperoxydation par le radical hydroxyle

Il s'agit d'un phénomène qui se produit dès lors qu'un composé lipidique contenant des acides gras insaturés est en contact avec de l'oxygène.

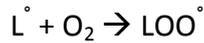
Le radical hydroxyle est réputé comme étant très toxique et la lipoperoxydation induite par ce radical est un processus provoquant de graves dégâts cellulaires (Figure 15).

Figure 15. La peroxydation lipidique
(Illustration personnelle d'après Deby-Dupont et al., 2002).

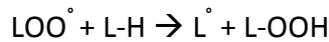


b. Phase de propagation de la lipoperoxydation

La constante de vitesse de la réaction entre le radical alkyle et le dioxygène à l'état triplet est proche de $10^9 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ (Yin *et al.*, 2011): il s'agit d'une réaction très rapide qui forme un radical peroxyde LOO^\bullet :



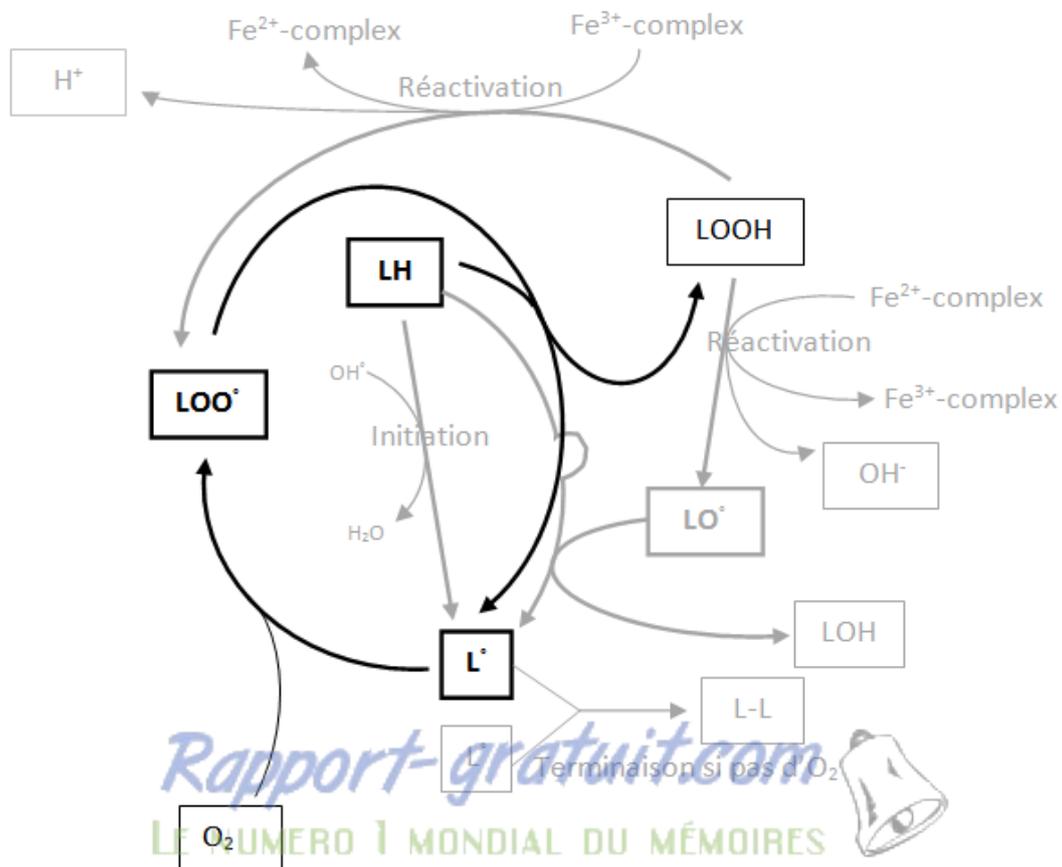
Rappelons que le radical peroxyde peut à nouveau arracher un atome d'hydrogène à une molécule lipidique L-H :



La Figure 17 ci-dessous illustre ces réactions au sein du cycle de la peroxydation lipidique.

Selon Halliwell et Chirico (1993), une simple initiation peut conduire à la formation de plusieurs centaines de lipides hydroperoxydes LOOH avant que se produise la phase de terminaison.

Figure 17. La peroxydation lipidique - phase de propagation
(Illustration personnelle d'après Deby-Dupont *et al.*, 2002)



c. Réactivation du cycle de lipoperoxydation

Comme nous l'expliquent Halliwell et Gutteridge (1984), le fer ferreux complexé (noté Fe²⁺-complex) ou ferrique complexé (noté Fe³⁺-complex) sont capables de réactiver le cycle de peroxydation en étant responsables de la formation, respectivement, de radicaux alkoxy (LO[•]) et peroxy (LOO[•]) qui peuvent à leur tour arracher des atomes d'hydrogènes aux molécules L-H (Figure 18) :

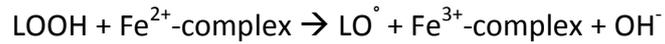
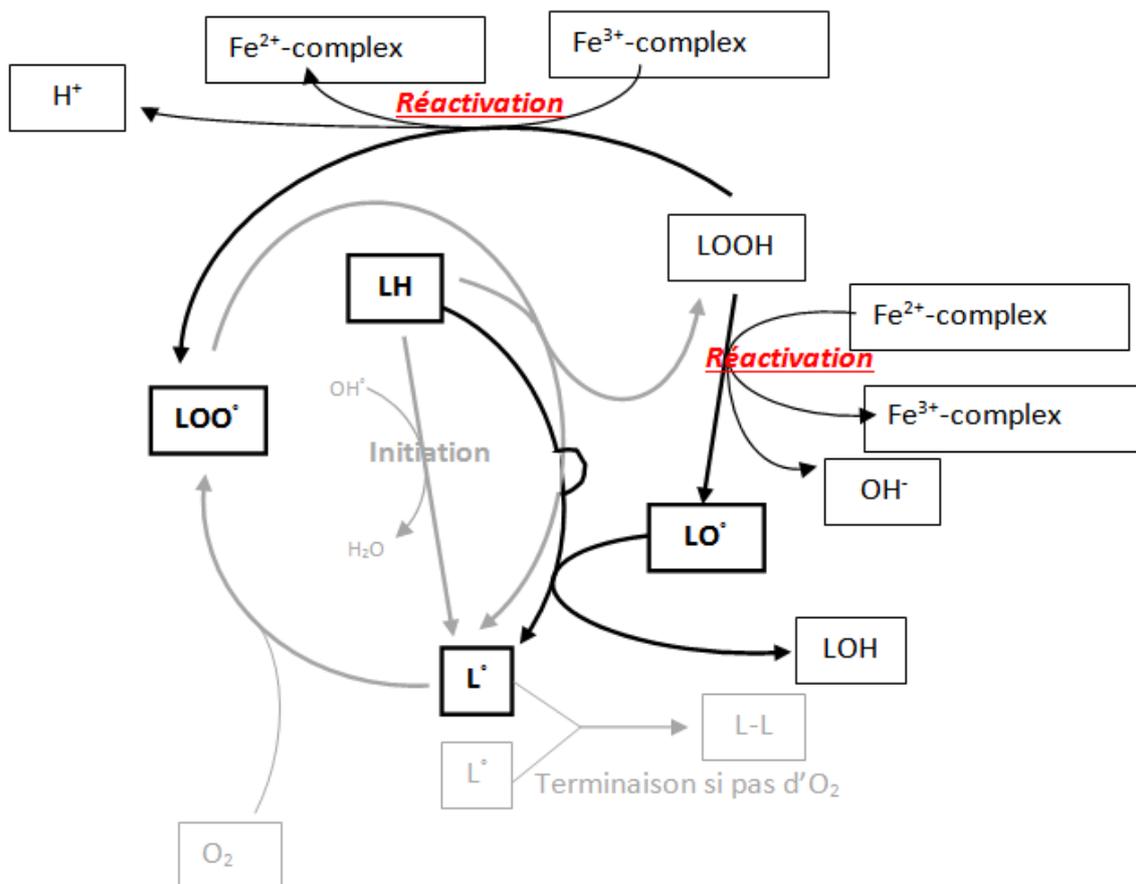


Figure 18. La peroxydation lipidique - la réactivation
(Illustration personnelle d'après Deby-Dupont et al., 2002).



d. Phase de terminaison de la lipoperoxydation

Les radicaux lipidiques se combinent pour reformer des espèces non radicalaires et donc moins oxydantes (Figure 19). On observe, le plus fréquemment une dimérisation :



Certains antioxydants (AH) réagissent avec les radicaux peroxydes et forment des produits non radicalaires LOOH ce qui provoque la terminaison de la peroxydation :

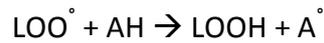
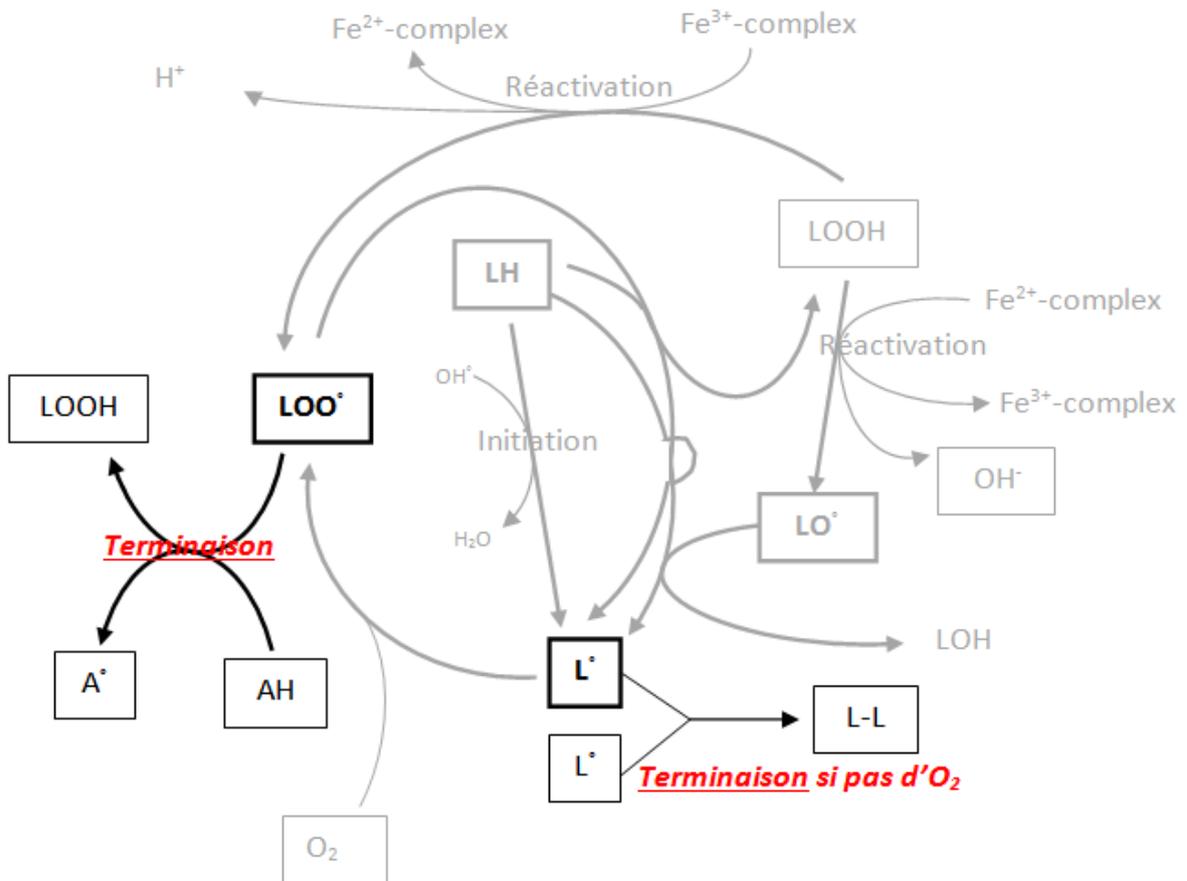


Figure 19. La peroxydation lipidique - phase de terminaison
(Illustration personnelle d'après Deby-Dupont et al., 2002).



Le radical hydroxyle est considéré comme l'ERO la plus destructrice notamment par le phénomène de peroxydation lipidique que nous venons de décrire. Il est à l'origine de graves dommages moléculaires.

4.5 Dommages moléculaires liés au radical hydroxyle

a. Altérations lipidiques majeures

Comme nous l'explique Favier (2003), lorsque le processus de peroxydation lipidique atteint par exemple la partie lipidique des lipoprotéines circulantes, nous assistons à la formation de LDL oxydées qui sont alors reconnues et captées par les macrophages ce qui participe grandement aux dépôts lipidiques des plaques d'athérome en pathologie vasculaire humaine. De plus, l'oxydation des phospholipides membranaires modifie la fluidité et la résistance membranaire. Cela altère le fonctionnement de nombreux récepteurs (fixation du ligand notamment), transporteurs et dégrade la transduction des signaux (modification de la perméabilité du calcium). Si les dégâts causés sont importants, on peut alors assister à une mort cellulaire (Lenzi, 2011).

b. Dommages sur l'ADN

Les différentes attaques du radical hydroxyle sur l'ADN conduisent à des mutations et à des arrêts de la division cellulaire ou de la synthèse protéique qui peuvent entraîner la mort cellulaire. On distingue :

- La formation de pontages avec des protéines (ou des dérivés de lipides oxydés) ;

A ce propos, la réaction entre les bases aminées de l'ADN et des aldéhydes dérivés de la peroxydation lipidique comme le malondialdéhyde (MDA) forme ce qu'on appelle des adduits. Ces adduits de l'ADN ont pu être quantifiés (Therond, 2006) et seraient trois à trois mille par cellule soit un nucléotide modifié sur 10^9 à 10^6 nucléotides.

- La destruction du désoxyribose par arrachement d'un atome d'hydrogène entraînant une cassure du brin concerné ;

- La destruction de la liaison base-désoxyribose ce qui aboutit à la formation d'un site a fonctionnel sur l'ADN (car abasique) ;
- La modification des bases azotées : la guanine et la thymine ce qui perturbe l'appariement des bases.

Ces lésions provoquées sur l'ADN font de OH° un agent responsable de cancérogénèse (Lenzi, 2011 et Valko *et al.*, 2007).

Le stress oxydant produit d'autres ERO que le peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyle et les quelques autres dérivés que nous venons de détailler. L'acide hypochloreux possède une place majeure dans les phénomènes oxydants ainsi que la myéloperoxydase, l'enzyme responsable de sa formation.

5. La formation d'acide hypochloreux : intervention de la myéloperoxydase (MPO)

Le peroxyde d'hydrogène produit au cours des phénomènes de stress oxydatif est transformé en acide hypochloreux par l'intervention de la myéloperoxydase (MPO).

5.1 Introduction et contexte d'action de la MPO

Serteyn *et al.* (2003) nous rappellent que lorsqu'une infection survient dans un organisme, les neutrophiles sont les premières cellules du système immunitaire à être activées pour combattre l'infection. Ils parviennent au site infectieux par chimiotactisme et diapédèse (grâce à une perméabilité vasculaire accrue) puis reconnaissent et phagocytent bactéries et autres micro-organismes dans le phagosome.

La digestion bactérienne est permise par une dégranulation et une activation de : la consommation d'oxygène lors de la : c'est la flambée respiratoire expliquée au 5.1.1 b v.

Babior (2000) nous enseigne que la dégranulation des neutrophiles libère des protéines cationiques, la lactoferrine et des enzymes hydrolytiques et protéolytiques. Quant à elle, la

flambée respiratoire induit une action de concert de la NADPH Oxydase, de la MPO et de la NO-synthase pour éliminer les microorganismes en produisant des espèces oxydantes qui détruisent les capsules polysaccharidiques bactériennes résistantes aux enzymes protéolytiques.

Nous allons nous attarder sur cette enzyme particulière qu'est la MPO.

5.2 Historique

a. Découverte de la MPO

Dans les années 1900, des études cytochimiques ont permis d'évoquer la présence d'une peroxydase dans les granules primaires des granulocytes matures.

C'est Agner en 1941 qui mentionne pour la première fois la myéloperoxydase comme acteur essentiel dans la phagocytose et producteur d'acide hypochloreux. Il a isolé, à partir du pus provenant de patients tuberculeux, une protéine riche en fer avec une activité peroxydase. Il la nomma alors verdoperoxydase du fait de sa couleur verte (Hansson *et al.*, 2005).

Des études postérieures ont montré que cette peroxydase n'était présente que dans les cellules myéloïdes et ont permis de lui donner son nom actuel : la myéloperoxydase.

Klebanoff (2005) note qu'il existe une grande variété de peroxydases. Elles se distinguent par leur structure primaire, leur groupement prosthétique et la réaction catalysée. Cependant, leur activité est toujours plus ou moins associée à une augmentation du taux de réactions impliquant le peroxyde d'hydrogène H₂O₂.

Les MPO des différentes espèces d'êtres vivants semblent très proches et la MPO apparaît comme une protéine bien conservée. Par exemple, la MPO du turbot possède 67% à 86% d'analogies avec les MPO des autres poissons et 55% à 57% d'analogies avec les MPO des mammifères (Castro *et al.*, 2008).

b. Découverte du lieu de stockage de la MPO

En 1920, Graham serait le premier (selon Klebanoff, 2005) à évoquer qu'il se produit un relargage des peroxydases contenues dans le cytoplasme des neutrophiles pendant la phagocytose.

Hirsch et Cohn (1960), nous offrent une description détaillée du processus de la dégranulation qu'il se produit dans les phagocytes. La fusion des membranes des granules cytoplasmiques des neutrophiles avec la membrane du phagosome aboutit, après la rupture de la membrane commune, au déversement du contenu des granules dans le phagosome.

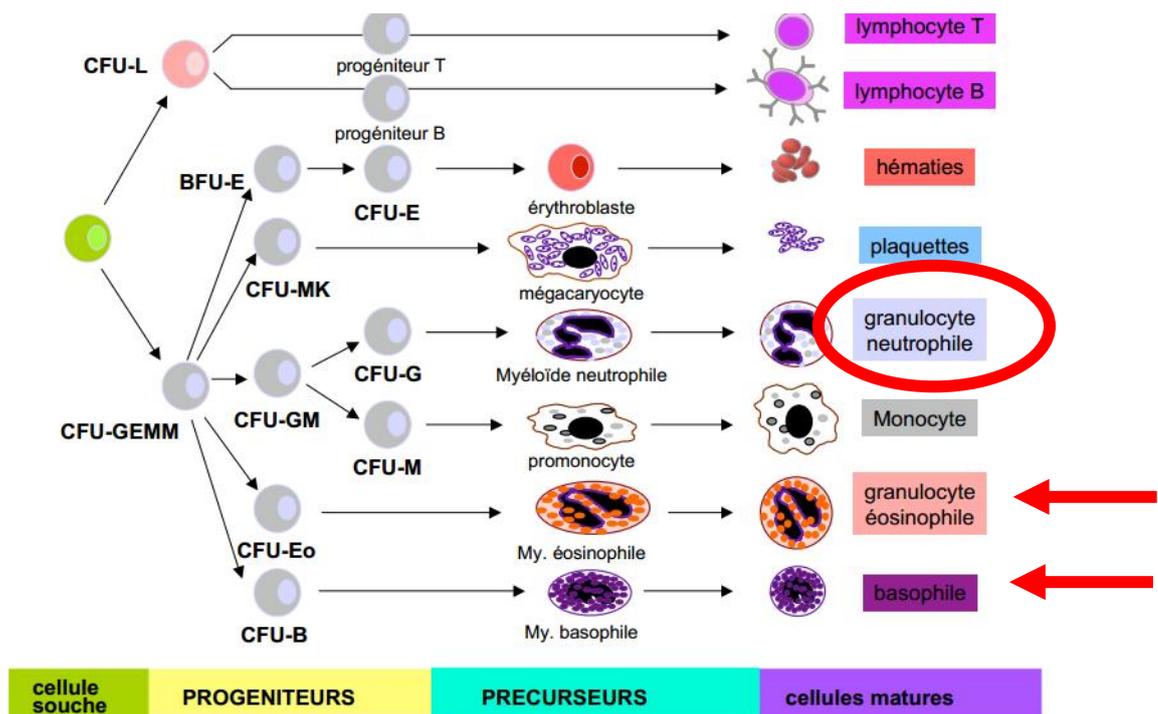
Ces mêmes auteurs ont isolés des granules provenant de granulocytes de lapins et ont montré la présence d'une grande variété d'hydrolases et d'une protéine possédant une activité antimicrobienne. Cette dernière fut nommée « leukine » par Skarnes et Watson en 1956 et « phagocytine » par Hirsch la même année. D'autres études par Klebanoff en 1970 ont montré que la MPO fait partie des enzymes contenues dans les granules et relarguées dans le phagosome lors de la dégranulation (Klebanoff, 2005).

5.3 Stockage de la myéloperoxydase

a. Synthèse de la MPO lors de l'hématopoïèse

Il est désormais communément admis que la myéloperoxydase est stockée au sein des granules des granulocytes neutrophiles. La formation des granulocytes neutrophiles se fait comme les autres cellules sanguines : dans la moelle osseuse, à partir de cellules souches hématopoïétiques (Figure 20).

Figure 20. Hématopoïèse



La cellule souche peut se différencier en cellule progénitrice myéloïde (CFU-GEMM pour granulocytes, érythrocytes, monocytes et mégacaryocytes) ou lymphoïde (CFU-L) selon les facteurs de croissance qui l'entourent : la présence de GM-CSF (*Granulocyte Macrophage – Colony Stimulating Factor*) et d'interleukine 3 (IL-3) favorise la différenciation de la cellule souche vers une lignée myéloïde. Lorsque IL-6 est présente, la différenciation se poursuit jusqu'aux cellules progénitrices des granulocytes et des macrophages (CFU-GM). Enfin, la présence de GM-CSF et de G-CSF dans l'environnement de CFU-GM ainsi que quelques étapes de maturation supplémentaires aboutissent à la formation d'un neutrophile mature (entouré sur la Figure 20) (Saint-Onge, 2009).

Les neutrophiles constituent plus de 95% des granulocytes matures. Les 5% restants sont représentés par les éosinophiles (4%) et les basophiles (1%) (Flèches sur la Figure 20).

Comme l'a montré Koefler en 1985, la synthèse de la MPO commence au stade promyélocyte et se termine au début du stade myélocyte. C'est à ce stade que les granules

primaires contenant la MPO sont distribués aux cellules filles où ils se mélangent avec les granules secondaires (lysosomes) qui ne contiennent pas de MPO.

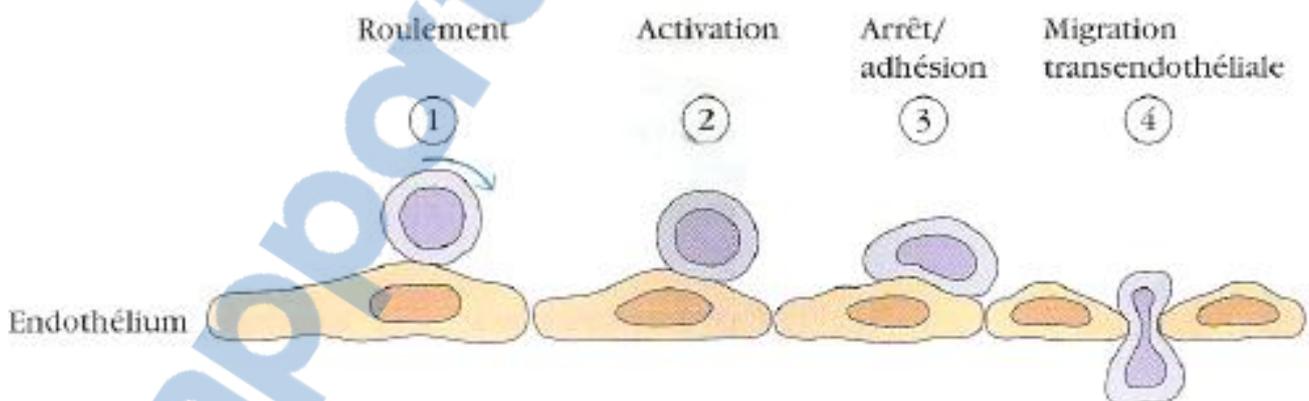
Enfin, de nombreux auteurs s'accordent sur le fait que cette enzyme héminique est présente à forte concentration dans les granules primaires des granulocytes polynucléaires neutrophiles et à faible concentration dans les monocytes. Cependant, elle reste indétectable lors de la maturation en macrophage (Tissier, 2011, Junglbuth, 2008 et Serteyn *et al.*, 2003).

b. Les neutrophiles et leur migration jusqu'au site inflammatoire

La durée de vie des neutrophiles est très courte dans la circulation (sept à douze heures) sauf en cas de contexte inflammatoire (jusqu'à plusieurs jours). Les neutrophiles assurent leur fonction de défense par la phagocytose, la dégranulation et le phénomène de flambée respiratoire.

En contexte inflammatoire, les neutrophiles affluent sur le site inflammatoire via des gradients chimiotactiques par diapédèse c'est-à-dire par voie trans-endothéliale (Arnhold, 2004).

Figure 21. Migration du neutrophile sur le site inflammatoire: quatre étapes successives (D'après Saint-Onge, 2005).



La migration du neutrophile sur le site inflammatoire s'effectue en quatre étapes (Figure 21) (Saint-Onge, 2005) :

- 1/ Le roulement : En conditions physiologiques, les neutrophiles ont une faible affinité (ils expriment des sélectines et des mucine-like à leur surface) pour les cellules endothéliales et sont emportés par le torrent sanguin ;
- 2/ L'activation : Au cours de son transport sanguin, le neutrophile peut rencontrer des éléments pro inflammatoires (bactériens comme les lipopolysaccharides ou immunitaires comme les leucotriènes, les IL-8...). Dans ce cas, le neutrophile s'active et ce dernier ainsi que la cellule endothéliale expriment de nouvelles molécules à leur surface qui ont une forte affinité l'une envers l'autre ;
- 3/ L'adhésion : Parmi ces nouvelles molécules exprimées, nous pouvons citer les intégrines sur les neutrophiles et la superfamille des immunoglobulines sur les cellules endothéliales. Par exemple, le LFA-1 (Leucocyte function associated antigen) du neutrophile se fixe sur le ICAM-1 (intra cellular adhesion molecule) de la cellule endothéliale : c'est l'adhésion ferme ;
- 4/ La diapédèse : Le cytosquelette du neutrophile se réarrange afin que ce dernier se glisse entre les cellules endothéliales et atteignent le site inflammatoire.

c. Les granules des neutrophiles

i. *Présentation*

Les polymorphonucléaires (PMN) ont été découverts par Paul Ehrlich au début du XX^{ème} siècle (Saint-Onge, 2005) et ont ensuite été classés en basophiles, éosinophiles et neutrophiles lorsque les techniques de coloration se sont développées (Borregaard et Cowland, 1997).

Deux types de granules ont d'abord été mis en évidence :

- Les granules azurophiles (ou primaires) qui fixent le colorant azuré au stage promyélocytes ;
- Les granules spécifiques (ou secondaires) qui ne le fixent pas.

La microscopie électronique et le développement de colorations des peroxydases ont permis d'identifier la MPO seulement au sein des granules azurophiles.

Une séparation des granules est possible grâce aux techniques de fractionnement subcellulaire (i.e la séparation des constituants cellulaires par destruction de la membrane plasmique puis par réorganisation de la cellule) exploitées par West *et al.* en 1974 :

- Les granules spécifiques sont sécrétant et participent à l'initiation de la réponse inflammatoire ;
- Les granules azurophiles sont comparables à des lysosomes et agissent dans la digestion du matériel phagocyté.

Deux autres types de granules apparaissent plus tard au cours de la maturation myéloïde : les granules gélatinases (ou tertiaires) et les vésicules sécrétoires qui sont en quelques sorte, un réservoir à récepteurs membranaires.

Il faut tout de même savoir que cette classification n'est qu'arbitraire car comme le rappellent Borregaard et Cowland (1997) et Faurschou et Borregaard (2003), les granules forment un *continuum* des granules primaires aux granules tertiaires et partagent quelques protéines alors

que d'autres sont spécifiques à chaque type de granules. C'est ces dernières qui permettent la classification présentée à la Figure 22.

Selon Beauvillain *et al.* (2012) des expériences de fractionnements cellulaires ont montré que seuls les granules peroxydases négatifs forment un *continuum* hétérogène de granules. Certains seraient très riches en gélatinase et dépourvus de lactoferrine, d'autres riches en lactoferrine et dépourvus de gélatinase avec tous les intermédiaires possibles.

Figure 22. Classification des granules des neutrophiles (D'après Borregaard et Cowland, 1997).

		Cytochrome b 558			
Protéines	Lysozyme				
	MPO	Lactoferrine		CD 35	
	Défensines		Gélatinase		
Granules	Peroxydase pos		Peroxydase neg		Vésicules Sécrétoires
	Primaires (Azurophiles)		Secondaires (Spécifiques)	Tertiaires (Gélatinases)	
	Def-neg	Def-pos			

Tout d'abord, les granules sont divisés en deux types : ceux qui contiennent de la MPO et ceux qui n'en contiennent pas. Puis, comme le montre la Figure 22 ci-dessus, d'autres protéines entrent en jeu dans la classification des granules. Les granules primaires (ou azurophiles) sont peroxydase positifs c'est-à-dire qu'ils contiennent de la MPO et peuvent ensuite être divisés entre ceux qui possèdent des défensines et ceux qui n'en possèdent pas. Les granules secondaires (ou spécifiques, contenant de la lactoferrine) et tertiaires (ou gélatinases, contenant la protéine du même nom) constituent le groupe des granules peroxydase négatifs (Borregaard et Cowland, 1997).

La grande diversité des molécules contenues dans les différents granules permet une régulation fine et très précise de l'activité des neutrophiles (Faurichou et Borregaard, 2003) (Figure 23).

Figure 23. Contenu des granules des neutrophiles et des vésicules sécrétoires chez l'Homme (d'après Faurschou et Borregaard, 2003)

Azurophil granules	Specific granules	Gelatinase granules	Secretory vesicles
<i>Membrane</i>			
CD63	CD11b/CD18	CD11b/CD18	Alkaline phosphatase
CD68	CD15	Cytochrome <i>b</i> ₅₅₈	CD10
Presenilin 1	CD66	Diacylglycerol deacetylating enzyme	CD11b/CD18
Stomatin	CD67	fMLP-R	CD13
V-type H ⁺ -ATPase	Cytochrome <i>b</i> ₅₅₈	Leukolysin	CD14
	fMLP-R	NRAMP-1	CD16
	Fibronectin-R	SCAMP	CD45
	G-protein _γ -subunit	SNAP-23, -25	CR1
	Laminin-R	uPA-R	C1q-R
	Leukolysin	VAMP-2	Cytochrome <i>b</i> ₅₅₈
	NB1 antigen	V-type H ⁺ -ATPase	Decay-accelerating factor (DAF)
	19-kDa protein		fMLP-R
	155-kDa protein		Leukolysin
	Rap1, Rap2		VAMP-2
	SCAMP		V-type H ⁺ -ATPase
	SNAP-23, -25		
	Stomatin		
	Thrombospondin-R		
	TNF-R		
	uPA-R		
	VAMP-2		
	Vitronectin-R		
<i>Matrix</i>			
Acid β-glycerophosphatase	β ₂ -Microglobulin	Acetyltransferase	Plasma proteins
Acid mucopolysaccharide	Collagenase	β ₂ -Microglobulin	
α ₁ -Antitrypsin	CRISP-3 (SGP-28)	CRISP-3	
α-Mannosidase	Gelatinase	Gelatinase	
Azurocidin	hCAP-18	Lysozyme	
BPI	Histaminase		
β-Glycerophosphatase	Heparanase		
β-Glucuronidase	Lactoferrin		
Cathepsins	Lysozyme		
Defensins	NGAL		
Elastase	uPA		
Lysozyme	Sialidase		
MPO	Transcobalamin-I		
N-acetyl-β-glucosaminidase			
Proteinase-3			
Sialidase			
Ubiquitin-protein			

ii. *Intervention des différents granules (Borregaard et Cowland, 1997)*

Les vésicules sécrétoires interviennent lorsqu'un premier contact est établi entre le neutrophile et l'endothélium activé (mobilisation via les sélectines notamment).

Les granules primaires (azurophiles) ont un contenu hydrolytique et bactéricide.

Les granules secondaires (spécifiques) agissent dans la réponse inflammatoire *stricto sensu*. Ils contiennent, entre autres, la protéine NGAL (Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin) qui participe à la régulation de la réponse inflammatoire.

La gélatinase contenue dans les granules tertiaires intervient dans la migration du neutrophile au sein du site inflammatoire.

Si nous repensons à la Figure 21 présentée un peu plus-haut et détaillant les quatre étapes lors de la migration du neutrophile sur le site inflammatoire, nous pouvons y intégrer les rôles des différents granules :

- Le premier contact entre le neutrophile et les cellules endothéliales provoque la mise en place d'une signalisation cellulaire et d'une transduction du signal qui se fait via les vésicules sécrétoires ;
- Lorsque l'adhésion est ferme, l'exocytose des granules tertiaires (à gélatinases) permet la dégradation du collagène de type IV de la membrane basale par les gélatinases ce qui facilite la migration transendothéliale du neutrophile ;
- Lors de la phagocytose, la fusion des granules primaires et secondaires avec le phagosome permet de réunir les conditions nécessaires à l'activité anti-microbienne du neutrophile.

iii. *Libération de MPO : la dégranulation des neutrophiles*

La dégranulation des neutrophiles sur le site inflammatoire est un mécanisme complexe et pas encore totalement élucidé. Elle se produit suite à une fusion entre la membrane plasmique et la membrane des granules.

Après les vésicules sécrétoires qui contiennent les molécules nécessaires aux phases précoces de l'inflammation (les intégrines par exemple), les granules sont mobilisés dans l'ordre suivant : d'abord les granules à gélatinases (granules tertiaires) puis les granules à lactoferrine (granules secondaires ou spécifiques) puis les granules à MPO (granules primaires) (Faurischou et Borregaard, 2003 et Deree *et al.*, 2006).

En effet, selon Beauvillain *et al.* (2012), lorsque les neutrophiles sont activés, ils n'ont plus de contenu au sein de leurs vésicules sécrétoires. Ils ont déversé 38% du contenu de leurs granules tertiaires, 21% du contenu de leurs granules secondaires et seulement 7% du contenu de leurs granules primaires.

Deree *et al.* (2006) nous enseignent que certaines études ont montré que la dégranulation était induite par le lipopolysaccharide des micro-organismes phagocytés et selon Borregaard et Cowland (1997), c'est l'élévation de la concentration intracellulaire en calcium Ca^{2+} qui entraîne l'exocytose des granules de stockage bien que le mécanisme ne soit pas totalement élucidé.

5.4 Éléments structuraux et synthèse de la MPO

a. Structure générale de la MPO

La myéloperoxydase possède deux sous-unités contenant chacune un hème (Jungbluth, 2008) : il s'agit de deux homo dimères symétriques formés de deux hémi enzymes, chacune à deux sous-unités (une chaîne légère de 15 kDa et une chaîne lourde de 59 à 64 kDa).

b. Codage génétique pour la MPO

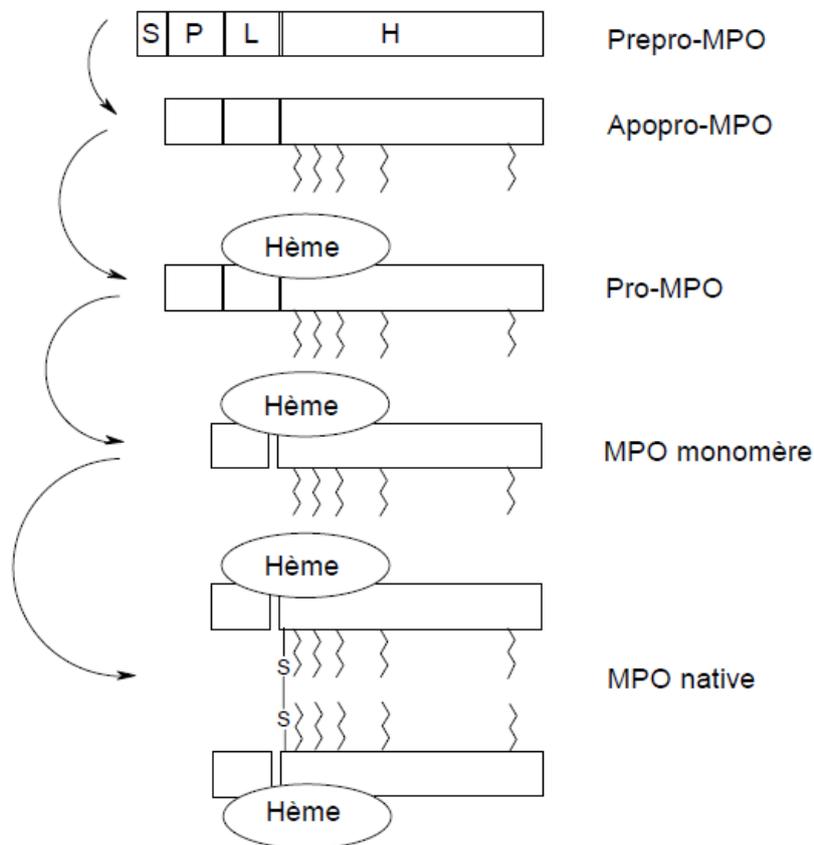
Codée par un seul gène, la MPO humaine a pu être clonée par de nombreux laboratoires. Ce gène mesure environ 11 kb, est composé de onze introns et douze exons et est situé sur le bras long du chromosome 17 dans le segment q12-24 (Klebanoff, 2005).

c. Synthèse de la MPO humaine (Hansson *et al.*, 2006)

La Figure 24 ci-dessous illustre la synthèse de la MPO. La protéine précurseur de 75 à 80 kDa est N-glycosylée dans le *reticulum* endoplasmique pour former une apoproMPO inactive de 90 kDa. Cette dernière, forme un complexe dans le réticulum endoplasmique avec la calréticuline et calnexine qui jouent le rôle de protéines chaperonnes. L'apoproMPO incorpore un groupe prosthétique héminique à Fe³⁺ et devient la proMPO active de 90 kDa. En quittant le réticulum endoplasmique pour un compartiment pré-granulaire, l'enzyme devient mature. En effet, un premier clivage protéolytique de l'extrémité N-terminale permet la formation d'une protéine de 75 kDa. Enfin, un second clivage protéolytique permet la formation d'un protomère constitué d'une chaîne lourde α de 57 kDa et d'une chaîne légère β de 12 kDa. L'association de deux protomères par un pont disulfure au sein des granules permet d'obtenir l'enzyme MPO mature (Serteyn *et al.*, 2003, Furtmuller *et al.*, 2006 et Klebanoff, 2005).

Figure 24. Synthèse *in vivo* de la MPO.

S : Peptide signal, P : Pro-peptide ; L : Chaîne légère ; H : Chaîne lourde (D'après Van Antwerpen, 2006).



d. Les liaisons

L'hème est lié par son atome de fer (III) à deux histidines de la protéine (une liaison coordinative avec l'histidine distale et une liaison par pont hydrogène avec l'histidine distale).

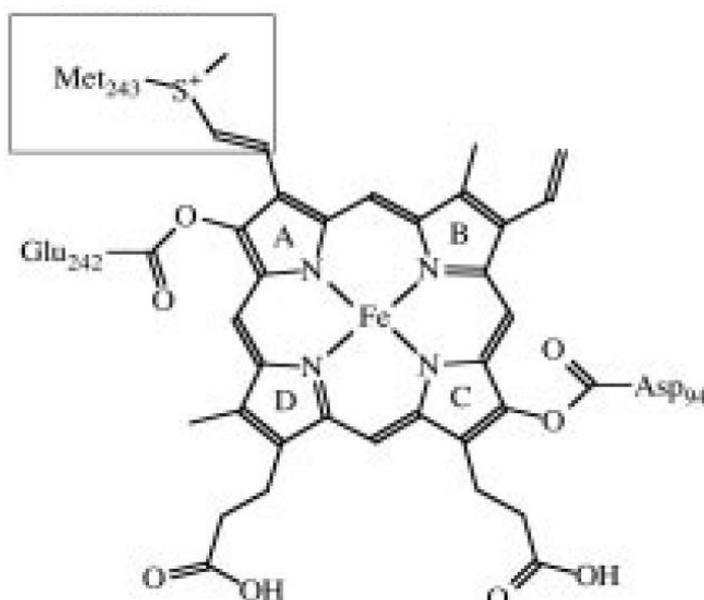
Il existe trois liaisons covalentes entre la MPO et des acides aminés au niveau des noyaux pyrroles A et C (Figure 25). Deux d'entre elles (liaisons esters) sont communes à toutes les peroxydases des mammifères (Kooter *et al.*, 1999) :

- Un groupe méthyle modifié est lié à un résidu Aspartate (Asp 94) ;
- Un groupe méthyle modifié est lié à un résidu Glutamate (Glu 242).

La troisième est formée entre un groupe vinyle d'un noyau pyrrole et l'atome de soufre de la méthionine (Met 243). Caractéristique de la MPO, cette liaison sulfonium, encadrée sur la Figure 25, serait à l'origine de ses propriétés de chloration. En effet, Kooter *et al.* (1999) ont muté la protéine et remplacé la méthionine par une glutamine (M243G), une cystéine (M243C), une thréonine (M243T) et une valine (M243V). Ils ont alors observé que :

- Les protéines mutantes sont presque cent fois moins affines pour l'ion chlorure Cl^- que la MPO nature ;
- Et que toutes les MPO mutantes ont perdu leur activité de chloration (excepté le mutant M243T qui en conserve 15%).

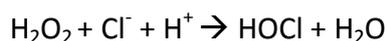
Figure 25. Structure du noyau héminique de la MPO humaine (D'après SerTEyn et al., 2003).



Selon Brogioni *et al.* (2008), cette liaison sulfonium de la MPO, en plus d'être responsable de la chloration, elle assure une stabilité de la forme MPO-Fe(II) (Cd III).

5.5 Activité enzymatique de la MPO

La myéloperoxydase catalyse la réaction suivante :



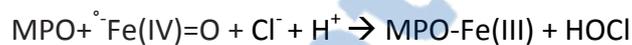
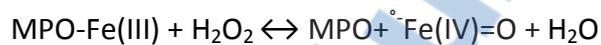
En utilisant le peroxyde d'hydrogène comme substrat oxydant, la myéloperoxydase sous forme pro-MPO et MPO mature exerce une activité de peroxydase et une activité de chloration (Jungbluth, 2008).

Comme nous l'enseignent SerTEyn *et al.* (2003), ces deux activités complexes sont indissociables car elles sont à l'origine de composés intermédiaires communs.

a. Activité de chloration

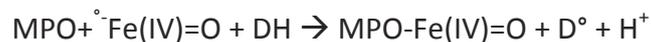
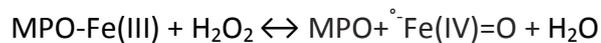
Cette activité fût mise en évidence par Harrisson et Schultz (1976).

L'enzyme native (MPO-Fe(III)) peut être oxydée en son composé I (Cd I), appelé aussi π -cation radical : $\text{MPO}^+ \overset{\circ}{\text{Fe}}(\text{IV})=\text{O}$. Le Cd I est une MPO avec une structure héminique en Fe IV et qui porte un radical libre sur un acide aminé de la chaîne protéique ce qui lui confère une grande capacité oxydante. Cependant, du fait de sa demi-vie très courte, il réagit très vite avec l'ion chlorure (Cl^-) pour former l'acide hypochloreux HOCl et ainsi restituer l'enzyme native MPO-Fe(III). Les deux étapes de cette réaction sont presque simultanées :



b. Activité de peroxydase

Le Cd I ($\text{MPO}^+ \overset{\circ}{\text{Fe}}(\text{IV})=\text{O}$) présenté ci-dessus peut également réagir avec divers substrats réducteurs (notés DH), non spécifiques comme l'ascorbate, l'urate, les catécholamines, la sérotonine, les œstrogènes, la tyrosine ou l'ion nitrite NO_2^- (Jungbluth, 2008 et Serteyn *et al.*, 2003). Il forme alors une espèce radicalaire D° et le composé II (Cd II) : MPO-Fe(IV)=O . Ce dernier possède une structure héminique à Fe IV mais n'a plus de radical contrairement au Cd I. Le retour à l'état de MPO native se fait alors grâce à l'oxydation d'une nouvelle molécule de DH. Il y a donc production d'une autre molécule D° . Klebanoff (2005) rapporte une conversion du composé II en MPO native par l'anion superoxyde. Cependant, cette réaction serait beaucoup plus lente que la même conversion avec un réducteur DH comme par exemple l'acide ascorbique.



d. Régulations de l'activité enzymatique de la MPO

Le composé III, inactif, participe à la régulation de l'activité enzymatique de la MPO dans le sens où lorsque les conditions favorables à sa production sont réunies, la MPO se retrouve sous forme inactive et ne peut plus jouer son rôle enzymatique.

Comme nous le rappelle Segal *et al.* (1981), la MPO agit sous un pH optimal de 5,5. Lorsque ce dernier est alcalin ou neutre, comme dans le phagosome au début de la phagocytose, la majorité de la MPO est sous forme Cd III et est donc inactive. Dans ces conditions, c'est le système des NADPH oxydases qui fonctionne de façon maximale, permettant une quiescence de la MPO (Cech et Lehrer, 1984).

L'acide hypochloreux provoquerait une destruction de l'hème de la MPO et induirait son inactivation irréversible (mécanisme d'autorégulation évoqué par Edwards *et al.*, 1987).

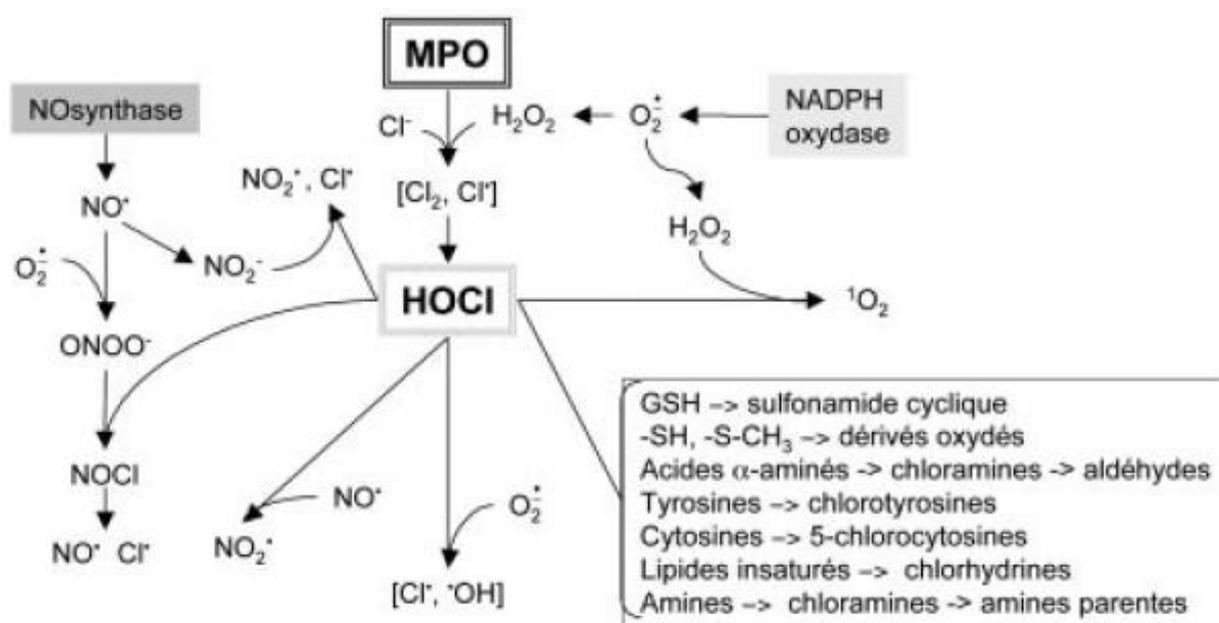
D'autres auteurs (Abu-Soud et Hazen, 2000, Podrez *et al.*, 2000, Edwards *et al.*, 1987 et Serteyn *et al.*, 2003) citent également le pH, la concentration en H_2O_2 (dépendante de la production d' O_2^\bullet), la concentration en Cl^- et les concentrations en réducteurs comme régulateurs de l'activité enzymatique de la MPO. Abu-Soud et Hazen (2000) s'attardent sur l'effet de la concentration en monoxyde d'azote NO^\bullet . Ce dernier réduit le Cd II en MPO ou le Cd I en Cd II (il joue le rôle du DH sur la Figure 26 présentée ci-dessus) et permet ainsi une augmentation de l'activité peroxydase de la MPO. En revanche, le NO^\bullet peut réagir avec la MPO native et former une MPO nitrosée (MPO-Fe(III)-NO), inactive.

Selon Kettle *et al.* (2007), une partie de la régulation de l'activité enzymatique de la MPO se fait par l'anion superoxyde. L'anion superoxyde réagit avec le composé II pour donner une redonner l'enzyme native et du peroxyde d'hydrogène. MPO_n peut à son tour réagir avec l'anion superoxyde donner le composé III inactif. Enfin, le composé I peut réagir avec l'anion superoxyde pour donner le composé II (Figure 26).

5.6 Espèces produites dérivées de l'acide hypochloreux

L'acide hypochloreux produit par la MPO à partir du peroxyde d'hydrogène est un oxydant fort, bactéricide et pouvant agir sur de nombreuses molécules (Figure 27, Serteyn *et al.*, 2003).

Figure 27. Produits formés à partir de HOCl (d'après Serteyn *et al.*, 2003).



a. Oxydation des thiols et du glutathion

Parmi les thiols (-SH) qui sont les premiers à être oxydés en sulfoxydes par HOCl, le glutathion sous forme réduite GSH (γ-glutamylcysteinylglycine) est jusqu'à présent, le substrat le plus réactif vis-à-vis de HOCl. Winterbourn et Brennan (1997) ont montré que la réaction entre le GSH et HOCl aboutit à la formation de trois produits stables :

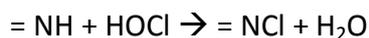
- Le glutathion sous forme oxydée (noté GSSG) ;
- GSO₂SG Glutathion thiosulphonate ;
- GSO₂HN Glutathion sulfonamide cyclique.

La formation de sulfoxydes perturbe le fonctionnement des récepteurs, des protéines kinases et certains facteurs de transcription. Le glutathion est considéré comme un tampon de l'état redox des cellules. En effet, le rapport GSH/GSSG témoigne de l'environnement réducteur ou oxydant des cellules et caractérise leur statut oxydant (Valko *et al.*, 2007).

Ces réactions sont cependant limitées grâce à l'action anti-oxydante de la glutathion peroxydase.

b. Réaction avec les amines (Babior, 2000 et Serteyn *et al.*, 2003)

Toutes les amines que l'on trouve dans les milieux biologiques peuvent réagir avec HOCl pour former des chloramines :



Les chloramines sont des espèces très oxydantes dont le degré de toxicité dépend de leur liposolubilité. La chloramine (NH₂Cl) formée à partir de l'ammonium est très liposoluble et plus toxique que l'acide hypochloreux mais moins toxiques que la chloramine putrescine (H₂N(CH₂)₄NHCl) par exemple.

La taurine (HSO₃-CH₂-CH₂-NH₂) peut également subir une réaction avec HOCl pour donner une taurine chloramine (HSO₃-CH₂-CH₂-NHCl) qui possède très peu voire pas de toxicité. C'est ainsi que cette réaction protège le neutrophile des dégradations causées par HOCl.

Enfin, la réaction avec les acides aminés produits des chloramines qui vont être transformées en aldéhydes, une autre famille de molécules très réactives tout en libérant du dioxyde de carbone CO₂.

c. Autres réactions

HOCl forme lentement et de manière spécifique des dérivés chlorés avec les résidus tyrosyles des protéines, les lipides insaturés, le cholestérol et les cytosines des acides nucléiques (Winterbourn et Kettle, 2000).

La réaction de HOCl (ou directement de la MPO) avec les nitrites (NO₂⁻) et le peroxydite (NO₃⁻) donne des espèces nitrantes comme NO[°] et NO₂[°]. L'anion superoxyde peut réagir aussi avec HOCl pour donner le radical hydroxyle OH[°]. Toutes ces espèces ont déjà été étudiées précédemment dans ce travail.

Par réaction de H_2O_2 avec HOCl, la MPO serait à l'origine de la formation d'oxygène singulet 1O_2 qui est très énergétique et capable d'oxyder la majorité des substrats organiques (et par exemple, de débiter une lipoperoxydation des lipides membranaires selon Hampton *et al.* (1998) mais son importance *in vivo* reste discutée (Serteyn *et al.*, 2003 et Klebanoff, 2005).

5.7 Rôles de la MPO au sein du neutrophile

a. L'action bénéfique principale : la MPO, une enzyme antimicrobienne

i. *Des preuves de son action antimicrobienne*

De nombreux micro-organismes sont tués par l'action de la MPO (Klebanoff, 1968 et Hampton *et al.*, 1998). L'activité bactéricide de la MPO serait principalement due à HOCl, présent en quantité suffisante dans le phagosome pour être responsable de la mort des micro-organismes même si, selon Hampton (1988), nous manquons de preuves directes de son action sur les micro-organismes.

Quelques études confirment le rôle bactéricide de la MPO (Hampton *et al.*, 1998 et Klebanoff, 2003) :

- Beaucoup moins d'espèces de micro-organismes sont tués par des neutrophiles extraits du sang de patients déficients en MPO par rapport à ceux extraits du sang de patients sains ;
- La présence d'inhibiteurs de la MPO (azide, cyanide, acide salicylhydroxamic) détériore la capacité des neutrophiles à détruire les micro-organismes mais ils n'ont pas ou peu d'effet sur les neutrophiles déficients en MPO ;
- Les neutroplastés (neutrophiles sans noyaux et dont la majorité des granules sont absents mais qui sont capables de réaliser une flambée respiratoire) phagocytent mais ne sont pas capables d'éliminer les micro-organismes sauf si ces-derniers ont été enrobés de MPO au

préalable. La flambée respiratoire n'est donc pas suffisante et la MPO est nécessaire pour éliminer les micro-organismes phagocytés.

ii. *Mécanisme de l'action antimicrobienne*

Cette activité antimicrobienne est tout d'abord permise par la présence, dans les neutrophiles, des produits provenant de la flambée respiratoire.

En effet, comme nous le rappellent Serteyn *et al.* (2003), après avoir été phagocytés par le neutrophile, les microorganismes se trouvent dans les phagolysosomes où ils sont détruits par des enzymes protéolytiques et par l'action oxydante des ERO que nous avons détaillés dans ce travail.

Au sein de la membrane plasmique du neutrophile et dans les granules spécifiques (secondaires), on assiste à l'activation de la NADPH oxydase qui aboutit à la formation d'anion superoxyde $O_2^{\circ-}$. Ce dernier va ensuite former du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Enfin, les granules spécifiques fusionnent avec les granules azurophiles pour libérer leur contenu dans le cytoplasme où la MPO est alors à l'origine de la production de nouvelles ERO comme nous venons de l'expliquer (Klebanoff, 2005 et Serteyn *et al.*, 2003).

La MPO ainsi libérée est au contact direct des micro-organismes phagocytés. Lorsque le micro-organisme phagocyté est une bactérie, la MPO se fixe sur les structures polysaccharidiques de la bactérie. Elle est ainsi activée et produit de l' $HOCl$ et ses dérivés qui vont provoquer des nitrations, des chlorations et des oxydations des composés bactériens (hèmes, amines, thiols, lipides insaturés, centres Fe-S, bases nucléiques...). La perméabilité membranaire est modifiée par la formation de chlorhydrines et d'amines chlorées (Serteyn *et al.*, 2003) ce qui participe à la destruction des micro-organismes.

Selon Rosen et Klebanoff (1985), c'est en oxydant les centres Fe-S des protéines participant à la chaîne respiratoire des bactéries que le système antimicrobien de la MPO et ses dérivés perturbe nettement le fonctionnement de la chaîne respiratoire et entraîne la mort de la bactérie.

iii. *Substituts à l'ion Cl*

Klebanoff (2005) affirme que le trio MPO-H₂O₂-halogène constitue un puissant système antimicrobien. En effet, dans ce travail nous avons parlé de l'ion chlorure comme principal co-agent de la MPO. Mais de nombreux auteurs dont Klebanoff (2005) nous rappellent que la MPO peut aussi agir avec l'ion bromure ou l'ion iodure. L'ion chlorure est présent en concentrations nettement supérieures à ce qu'il faut pour que le système fonctionne correctement. C'est pourquoi il est quasiment le seul à être utilisé. Cependant, l'ion iodure se révèle plus efficace mais présent à des concentrations beaucoup trop faible pour pouvoir réagir. Enfin, l'ion bromure se situe, en termes de concentration et d'efficacité, dans une position intermédiaire.

Ce même auteur (Klebanoff, 1993) affirme que les nitrites peuvent se substituer aux halogènes dans le système antimicrobien. Cependant, cette observation faite *in vitro* reste discutée *in vivo* car les concentrations en nitrite seraient trop faibles pour permettre une activité antimicrobienne du système MPO-H₂O₂-nitrite.

b. Les systèmes antimicrobiens en absence de MPO

La production d'ERO et d'espèces nitrantes comme expliqué précédemment dans ce travail est valable au sein du neutrophile et l'action oxydante des ERO et nitrosante des dérivés nitrés peuvent suffire parfois à tuer les micro-organismes phagocytés (Klebanof, 2005) notamment par la production de peroxy-nitrite via la NO synthase des neutrophiles.

De plus, l'acidité présente à l'intérieur du phagosome (même si Segal *et al.* (1981) et d'autres auteurs rapportent d'abord une élévation du pH) ainsi que l'action d'autres protéines (défensines, lactoferrines...) des granules et de protéases participeraient à l'action antimicrobienne du neutrophile (Klebanoff, 2005).

Klebanoff (2005) rappelle une étude effectuée par son équipe en 1978 qui montre que *in vitro*, le potentiel bactéricide sans MPO (avec seulement des protéines cationiques) est présent mais beaucoup moins efficace. En effet, un mélange de protéines cationiques des granules à 50 µg/mL possède une légère activité bactéricide (contre des staphylocoques) après deux heures

d'incubation. Une solution de MPO concentrée à 2 µg/mL se révèle fortement bactéricide dès sept minutes d'incubation (sept minute est la première mesure effectuée dans l'étude).

Par ailleurs, il est intéressant de noter que la NADPH oxydase (la sous unité gp91^{phox} plus précisément, grâce à son Histidine 115 de l'extrémité N-terminale) jouerait le rôle de canal H⁺ et participerait à l'acidification du milieu (Henderson, 2000).

c. La composante anti-oxydante de la MPO

La plupart du peroxyde d'hydrogène produit dans le neutrophile est consommé par la myéloperoxydase et ne peut donc plus donner de radical hydroxyle par la réaction de Fenton si du fer libre se trouve prêt à réagir. Cependant, comme nous venons de le voir, la réaction de la MPO avec l'anion superoxyde génère elle-même ce radical et d'autres produits oxydants ce qui modère fortement ce rôle d'antioxydant que certains auteurs lui attribuent (Hampton *et al.*, 1998).

d. Autres actions bénéfiques de la MPO

Le système MPO aurait un rôle dans la progression des tumeurs en stabilisant l'infiltration tissulaire des cellules tumorales. De plus, la MPO serait capable d'inactiver la thyroxine et les œstrogènes sur les sites inflammatoires. Cependant ces informations sont controversées et les rôles « annexes » de la MPO restent encore à établir (Klebanoff , 2005).

e. L'action délétère : La MPO peut se révéler cytotoxique

Lorsque la MPO reste à l'intérieur des neutrophiles, il est raisonnable d'admettre que son action est tournée vers les micro-organismes phagocytés. Selon Serteyn *et al.* (2003), dans les conditions physiologiques, Eiserich et son équipe ont montré que environ 10 à 15 % de la MPO se trouve dans le milieu extracellulaire. Hors, lors d'une inflammation incontrôlée qui induit une dégranulation massive des neutrophiles, la MPO peut être relarguée en quantité importante. Il est alors légitime de penser que cette enzyme bénéfique lorsqu'elle est bactéricide, peut devenir délétère. La MPO peut également être déversée dans le milieu extra cellulaire lorsque les neutrophiles sont adhérents à des structures trop grandes pour être phagocytées : ils dégranulent alors dans le liquide extra cellulaire. Présente en grande quantité dans les neutrophiles, la MPO est

majoritairement impliqué dans les pathologies de type inflammatoire. En effet, l'afflux massif de neutrophile comme décrit au 0 5.3 b lors de phénomènes inflammatoires, engendre une concentration élevée en MPO dans les tissu concerné.

C'est pourquoi la MPO est impliquée dans de nombreuses pathologies inflammatoires comme le syndrome de détresse respiratoire aiguë, les fibroses pulmonaires, les maladies inflammatoires rénales comme les glomérulonéphrites ou les néphrites interstitielles, les pathologies cardiaques comme l'ischémie et la reperfusion, les phénomènes arthrosiques et les arthrites, les MICI etc... (Van Antwerpen et Nève, 2006). Klebanoff (2005) cite également l'implication de la MPO dans la carcinogénèse : la MPO peut catalyser la transformation de certains pro-carcinogènes en carcinogènes (cf III 3.1), dans l'athérosclérose par l'oxydation des LDL (Carr *et al.*,2000) (cf III b i) et dans maladies neurodégénératives comme Parkinson ou Alzheimer chez l'Homme.

De plus, la MPO est cytotoxique pour les cellules endothéliales (participant ainsi à la mise en place de pathologies vasculaires) et les fibroblastes car ces deux types cellulaires sont capables d'internaliser la MPO circulante ou relarguée dans l'environnement cellulaire qui peut alors agir au sein même de ces cellules et s'y révéler cytotoxique.

f. Les déficits en MPO

Selon Hampton *et al.* (1998), un Homme sur quatre mille serait atteint d'un déficit en MPO. Cependant, il semblerait que cette déficience ne soit pas à l'origine d'une augmentation des atteintes infectieuses chez ces individus (contrairement à la maladie granulomateuse chronique (ou CGD pour chronic granulomatous disease en anglais), maladie dans laquelle la NADPH oxydase est déficiente). En effet, nous avons vu au 0 5.7 b qu'il existe des systèmes de défenses anti-microbiennes MPO-indépendants. Cependant, les neutrophiles déficients en MPO consomment plus d'oxygène ce qui a pour conséquence une augmentation de la production d'ERO qui agissent alors en tant qu'agents antimicrobiens.

Nauseef (1999) remarque que chez certains patients souffrant de diabète sucré, et chez qui il a été diagnostiqué un déficit en MPO, on peut trouver une candidose digestive. Hampton *et al.* (1998) avaient noté une augmentation de la susceptibilité à une infection par *Candida* chez les

patients déficients en MPO. Par ailleurs, Nauseef (1999 et 2004) décrit quatre génotypes pouvant aboutir à un déficit en MPO ou à une activité enzymatique réduite. En effet, la production finale d'apoproMPO pour la mutation R569W, de proMPO pour la mutation Y173C et G501S ou de sous unités matures mais non fonctionnelles pour la mutation M251T conduit à une activité enzymatique nulle pour la première, inférieure à la normale pour les secondes et très inférieure à la normale pour la dernière.

Godeken *et al.* (2007) ont mis en évidence chez deux patients souffrant de déficit en MPO des anomalies sur des acides aminés situés dans l'environnement proche de l'hème. Ils ont montré que l'hème était bien incorporé lors de la maturation de la MPO mais que les liaisons covalentes étaient modifiées ce qui compromet l'activité de la MPO mature.

5.8 La MPO : un marqueur de l'inflammation ?

Des concentrations élevées en MPO dans les liquides biologiques et au sein des tissus est le signe d'une activation importante ou excessive des neutrophiles. Depuis quelques années, la MPO est utilisée comme un marqueur de l'intensité de l'inflammation dans de nombreuses pathologies (Serteyn *et al.*, 2003).

Lors d'un exercice physique intense, la dégranulation massive des neutrophiles provoque une augmentation de la concentration plasmatique en MPO. Serteyn *et al.* (2010) ont montré qu'une course d'endurance de 120 kilomètres provoque une augmentation significative de la concentration plasmatique en MPO (entre autres paramètres mesurés) des chevaux participants.

Amazanda *et al.* (2011) ont analysé, avec diverses techniques, l'expression du gène codant la MPO dans les cellules de foie de rats sains et traitées au carbone tétrachloride CCl_4 ou irradiées et dans les cellules de foie humain atteint. Ils ont montré que l'expression du gène codant la MPO est nulle dans les cellules de foie des rats sains et est augmentée dans les cellules de foie humain atteint et dans les cellules de foie des rats traités au CCl_4 (multipliée par 2,8 24h après l'administration de CCl_4) ou irradiées (multipliée par 3,3 3h après l'irradiation). L'augmentation de l'expression de la MPO a lieu dans les granules azurophiles (contenant de l'élastase). L'augmentation de l'expression du gène codant la MPO dans les foies pathologiques des rats et

des humains étudiés seraient due à un recrutement des granulocytes neutrophiles azurophiles par le processus inflammatoire.

Le dosage de la MPO peut ainsi servir comme marqueur du stress oxydant mais il ne s'agit pas du dosage le plus disponible et pratiqué (Cf III 2.)

La majorité des ERO produites lors de stress oxydant peuvent se révéler toxiques à l'échelle moléculaire, cellulaire et de l'organisme. Les lésions provoquées peuvent passer inaperçu ou provoquer des lésions irréversibles. Ainsi, il existe une étroite relation entre le stress oxydant et certaines pathologies si bien qu'il est parfois difficile de savoir si le stress oxydant est la cause ou la conséquence des pathologies dans lequel il est impliqué.

III. Le stress oxydant et quelques pathologies associées

Le stress oxydant est incriminé dans les processus de vieillissement cellulaire et dans de nombreuses autres pathologies (Andreyev *et al.*, 2005). La Figure 28 ci-dessous donne un aperçu des pathologies liées au stress oxydant rencontrées en médecine humaine. Nous n'allons pas détailler de façon exhaustive toutes les pathologies intéressant les espèces canine et féline mais nous allons choisir des échantillons de pathologies afin de comprendre la place du stress oxydant dans la physiopathologie de certaines affections. N'oublions pas que, comme expliqué au 0 5.7 e iii, la MPO est au centre des pathologies inflammatoires.

Figure 28. Liens entre les maladies humaines et le stress oxydant (D'après Favier, 2006).

Maladies dues à une production insuffisante de radicaux libres	Maladies où le stress oxydant est la cause primordiale	Maladies où le stress oxydant fait partie des facteurs déclencheurs	Maladies entraînant un stress oxydant secondaire
<ul style="list-style-type: none"> • Agranulomatose septique • Psoriasis 	<ul style="list-style-type: none"> • Cancers • Autoimmunité • Cataracte • Dégénérescence maculaire • Sclérose latérale amyotrophique • Photo-veillissement cutané • Photosensibilisation • Irradiation • Intoxications : CCl₄, Cd, Fe, alcool, • Hémochromatose 	<ul style="list-style-type: none"> • Maladie d'Alzheimer • Stérilités masculines • Maladies virales : EBV, HVB • Rhumatismes • Athérome • Asthme • Insuffisance respiratoire 	<ul style="list-style-type: none"> • Diabète • Insuffisance rénale • Mucoviscidose • Sida • Choc septique • Infarctus du myocarde • Ischémies/reperfusion • Parkinson • Brûlures • Thalassémie • Greffes d'organes Traitements : <ul style="list-style-type: none"> • Anticancéreux • PUVA thérapie • Oxygène hyperbare

1. Le stress oxydant au centre de nombreuses pathologies

1.1 Notion de dose de stress oxydant

De nombreux auteurs comme Favier (2006), Tissier (2011) ou encore Valko *et al.* (2007) décrivent un lien entre la « dose » de stress oxydant et les dommages cellulaires causés. En effet, un stress oxydant dit « léger » entraîne une prolifération cellulaire accrue, un stress oxydant « moyen » provoque une apoptose cellulaire, un stress oxydant « fort » induit une nécrose cellulaire et enfin un stress oxydant « majeur » est responsable de modifications membranaires à l'origine de lyses cellulaires.

1.2 Les lésions moléculaires et cellulaires du stress oxydant

Nous avons vu, pour chaque ERO, les actions spécifiques sur les composés cellulaires. Des lésions cellulaires et moléculaires moins spécifiques et communes à tous les ERO et au stress oxydant en général sont également connues et à l'origine de nombreuses pathologies. Nous allons ici faire un résumé de l'action qu'ont l'ensemble des ERO sur les composés cellulaires.

a. Lésions sur l'ADN

Les lésions des ERO sur l'ADN des cellules sont principalement provoquées par le radical hydroxyle et ont été énoncées au 0 4.5 b. Le monoxyde d'azote peut également participer à une fragmentation de l'ADN (cf 0 2.3 b). Les dommages oxydatifs de l'ADN peuvent aboutir à une mutagénèse, une perturbation des processus de réplication, de transcription et de traduction provoquant un arrêt des synthèses et pouvant mener à la mort cellulaire (Lenzi, 2011). Le stress oxydant accélère et amplifie toutes les lésions spontanées produites sur l'ADN (Tissier, 2011).

La mutagénèse intervient quand les procédés de réparation de l'ADN n'ont pas le temps d'agir et que l'ADN cellulaire se réplique avec les erreurs (provoquées en partie par le stress oxydant). Plus le degré de stress oxydant est élevé, plus les phénomènes de mutagénèse dépassent les processus de réparation (Tissier, 2011). Toujours selon Tissier (2011), les ERO et autres « dérivés toxiques de l'oxygène » impacteraient l'ADN dix à cent mille fois par jour.

b. Altérations des lipides

Comme nous l'avons détaillé au 0 4.5 a, la peroxydation des lipides (détaillée au 0 4.4) provoque des dommages lipidiques importants ayant de graves conséquences cellulaires (atteintes vasculaires, dégradation de la transmission des signaux membranaires, etc...)

Il est important de noter que la peroxydation lipidique des constituants membranaires des érythrocytes a de lourdes conséquences et peut mener à une hémolyse oxydative grave. En effet, les érythrocytes traversent des milieux riches en substances oxydantes et transportent, par leur fonction, du dioxygène. Ils sont donc facilement exposés à l'attaque des ERO et leur membrane se

trouve fragilisée par la peroxydation des lipides qui la constituent. Une hémolyse dite oxydative se produit alors pouvant participer à un processus d'anémie. C'est le cas par exemple lors d'un exercice physique intense (Gallo *et al.*, 2013).

c. Lésions des protéines

Les ERO radicalaires et non radicalaires altèrent l'extrémité des chaînes protéiques de façon réversible ou irréversible (altérations détaillées par Fedorova *et al.* (2009): carbonylations, oxydations, pontages...) provoquant une dégradation de l'activité protéique pouvant aller jusqu'à une perte complète de fonction ou une agrégation protéique. Les dysfonctionnements sont nombreux (Tissier, 2011) :

- Récepteurs cellulaires ;
- Anticorps ;
- Signaux de transduction ;
- Fonctions de régulation ;
- Transport protéique ;
- Activité enzymatique.

Lors de l'altération des protéines fixées à des transporteurs contenant des métaux de transition, ceux-ci sont libérés ce qui renforce les effets néfastes du radical hydroxyle OH^\bullet .

Les protéines altérées peuvent être, par exemple, à l'origine de réactions auto-immunes ou s'accumuler entre les cellules et s'agréger avec les lipides pour former des dépôts de lipofuscine. Ces dépôts sont caractéristiques des tissus âgés.

L'oxydation des protéines se fait notamment par l'addition de groupes carbonyles qui peuvent réagir avec des fonctions amines pour former des liaisons imines (-HC=N-). Lorsque deux tyrosines proches sont oxydées, il peut se former une liaison dityrosine. Ces deux processus participent au phénomène d'agrégation protéique observé (Durand *et al.*, 2013).

d. Les cibles glucidiques du stress oxydant

Les ERO agissent essentiellement sur le glucose et sur les protéoglycanes (présents en grande quantité dans les cartilages).

L'oxydation du glucose ou glycosoxydation s'effectue par deux mécanismes qui aboutissent tous deux à la formation de produits finaux de glycosylation (PFG) (Lenzi, 2011):

- Oxydation *stricto sensu* du glucose en dérivés carbonyles qui donnent des PFG en réagissant avec une protéine ;
- Glycosylation non enzymatique des protéines (ou « réaction de Maillard »): formation d'une liaison covalente entre un ose et des groupements aminés libres d'une protéine aboutissant à la formation de PFG après attaque de cette protéine glyquée par des EOR (OH^\bullet et NO_3^- surtout).

1.3 Stress oxydant et pathologies chez les animaux de rente (Durand *et al.*, 2013)

Il a été montré que le stress oxydant était à l'origine de nombreuses pathologies chez les animaux de rente (rétention placentaire, mammites chez la vache laitière). Ce stress serait maximum lors de périodes clefs de la vie des animaux : gestation, mise-bas et période néonatale mais aussi périodes de finition ou de forte production. D'autres facteurs comme les états infectieux ou inflammatoires, des conditions environnementales particulières (froid, chaleur intense, confinement) sont également à l'origine d'une production accrue d'ERO. A titre d'exemple, il a été montré qu'un stress oxydant intense avant le vêlage multiplie par deux le risque de mammite post-partum.

Toutes ces altérations provoquées par le stress oxydant sont à l'origine de nombreuses pathologies. C'est pourquoi, l'évaluation du stress oxydant apparait comme une nécessité.

2. L'évaluation du stress oxydant

2.1 L'exploration du stress oxydant est intéressante mais difficile

Le stress oxydant étant impliqué dans de nombreuses pathologies, son évaluation est indiscutablement intéressante. Pouvoir caractériser le stress oxydant permet de pouvoir suivre le statut oxydant d'un Homme, d'un cheval ou d'un chien sportif par exemple, ou de détecter précocement un état oxydatif anormal lors de consultations de médecine préventive.

Bien que l'évaluation du stress oxydant apparaisse comme une nécessité, elle demeure compliquée comme nous l'explique Favier (2003). En effet, les méthodes utilisées sont peu standardisées et les techniques employées sont très diverses. De plus, les espèces radicalaires sont fugaces et instables ce qui les rend difficiles à isoler et doser. Enfin, leur présence est souvent restreinte à un tissu en particulier voire un petit nombre de cellules dans un tissu sain rendant leur dosage ardu.

Il faut donc envisager de doser des molécules biologiquement stables produites par l'action des espèces radicalaires. Le marqueur idéal réunirait les conditions suivantes : il serait détectable même à faibles concentrations, posséderait une structure chimique qui lui est propre, aurait une demi-vie longue et sa production serait augmentée (ou diminuée) exclusivement en cas de stress oxydant (Powers *et al.*, 2010). Malheureusement, aucun des marqueurs mis en évidence jusqu'à ce jour ne présente ces capacités.

2.2 Présentation des différentes méthodes d'évaluation

a. Les ERO sont des marqueurs directs du stress oxydant

Doser directement les ERO produits par le stress oxydant permet d'avoir une idée précise de l'intensité de ce dernier. Comme nous l'explique Lenzi (2011), la principale méthode utilisée est la méthode de résonance paramagnétique électronique qui détecte les électrons non appariés au sein d'une molécule. Son principe est complexe mais globalement, il s'agit d'une technique qui permet l'obtention de spectres d'absorptions caractéristiques pour chaque radical considéré. Mais les radicaux libres étant des espèces peu stables, réactives et à durée de vie réduite, ils restent

difficilement identifiables même avec cette technique. On a alors recours « au spin trapping » qui permet de piéger les radicaux libres pour les transformer en radicaux plus stables (Tissier, 2011).

Bien qu'il s'agisse d'une technique fiable, elle demeure onéreuse et demande un équipement spécifique et complexe à utiliser.

Nous pouvons également citer la technique de chimioluminescence qui est non invasive et qui permet un suivi continu (Tissier, 2011).

b. Les produits d'oxydation sont des marqueurs indirects du stress oxydant

Une autre façon d'évaluer le stress oxydant est de mesurer la production des radicaux libres (et ainsi d'avoir une idée du statut pro-oxydant) par le dosage de marqueurs biologiquement stables, produits par l'action des espèces radicalaires. Lorsqu'ils sont présents en quantité plus importante que les quantités physiologiques dans la circulation ou au sein d'un tissu, ils sont alors les témoins d'un stress oxydant se produisant en amont. Ces marqueurs peuvent être spécifiques des cibles visées par les radicaux libres (par exemple la 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine ou 8OHdG est spécifique des lésions provoquées sur l'ADN et le malondialdéhyde est spécifique de la peroxydation lipidique).

i. *Marqueurs de l'oxydation des lipides*

La technique de résonance paramagnétique électronique peut être utilisée pour évaluer la fluidité membranaire. Le principe est simple : on introduit des radicaux stables au sein des membranes et on suit leur comportement. Si des ERO (et principalement le radical hydroxyle) ont dégradé les membranes, la fluidité s'en trouve réduite et le déplacement des radicaux stables introduits sera diminué (Palmieri et Sblendorio, 2007).

Le malondialdéhyde (MDA), produit lors de la peroxydation lipidique, est étudié depuis les années 1960 comme marqueur du stress oxydant (Tissier, 2011). Il peut être dosé par réaction avec l'acide thiobarbiturique (TBAR) mais bien que peu onéreuse, cette technique est peu spécifique. D'autres techniques comme la colorimétrie, la chromatographie gazeuse ou liquide

haute performance, l'électrophorèse capillaire... permettent de doser le MDA mais ce sont, pour la plupart, des techniques coûteuses et nécessitant un personnel qualifié. La concentration en MDA serait augmentée, selon Dalle-Donne *et al.* (2006) :

- Dans le plasma d'Hommes souffrant de diabète sucré ;
- Dans le plasma de femmes atteintes de pré éclampsie ;
- Dans le plasma et l'air expiré de patients asthmatiques ;
- Dans le tissu cérébral d'individus atteints de la maladie de Parkinson ;
- Dans les lésions d'athérosclérose présentes chez des patients diabétiques.

Les isoprostanes sont issues de la peroxydation lipidique mais chaque isoprostane est spécifique du lipide oxydé au départ (Lenzi, 2011). Le dosage des isoprostanes s'effectue dans le sang et dans les urines chez l'Homme même s'ils sont présents à faible concentration. Les techniques de dosage les plus fiables font appel à la chromatographie liquide haute performance ou gazeuse. Leur dosage est fiable et sensible mais coûteux et complexe (Powers *et al.*, 2010). Les isoprostanes semblent être de bons marqueurs lors de phénomène inflammatoire aigu ou chronique, lors de lésions d'ischémie-reperfusion, lors de diabète et d'athérosclérose (Dalle-Donne *et al.*, 2006).

Enfin, l'éthane et le pentane sont deux produits volatiles de la peroxydation lipidique présents dans l'air expiré par l'individu qui peuvent être facilement dosés par chromatographie gazeuse ou spectroscopie laser mais cette méthode est peu applicable chez l'animal et très peu utilisée (nombreux artéfacts dus à une contamination par les gaz atmosphériques) (Tissier, 2011).

ii. Marqueurs de l'oxydation des protéines

Lorsque les acides aminés constituant une protéine sont oxydés, ils peuvent former un groupement carbonyle que l'on peut rechercher (réaction avec du 2,4-dinitrophenylhydrazine) mais il s'agit d'une méthode peu spécifique. Les carbonyles présentent l'avantage d'être stables ce

qui rend leur méthode de dosage plus aisée. Elles s'accumulent lors de vieillissement cellulaire, de lésions d'ischémie-reperfusion, d'inflammation chronique et de nombreuses autres maladies (diabète, insuffisance rénale...) (Dalle-Donne *et al.*, 2006).

La mesure du rapport GSH/GSSG permet d'avoir une idée du statut redox de la cellule. Lorsqu'il est faible, la quantité de GSSG est donc plus importante que celle de GSH ce qui se produit lors de stress oxydant. Ces dosages s'effectuent selon différentes techniques : enzymocolorimétrie, chromatographie liquide haute performance, réactions chimiques puis colorimétrie... Certains auteurs ont établi des liens entre certaines maladies et la diminution du GSH et du rapport GSH/GSSH ou la diminution du GSH et du GSSH lors de diabète sucré par exemple (Palmieri et Sblendorio, 2007).

iii. *Marqueurs de l'oxydation de l'ADN*

Lorsqu'une guanine d'un nucléotide est hydroxylée en 8-hydroxy-2'-deoxyguanine, le nucléotide obtenu est la 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine ou 8OHdG est non fonctionnel et excisé entièrement. La 8OHdG se retrouve dans les urines et le plasma et peut être dosée par des techniques de chromatographie (complexes et présentant de nombreux artéfacts) (Lenzi, 2011 et Powers *et al.*, 2010). Elle est le témoin de dommages oxydatifs irréparables causés sur l'ADN par le stress oxydant (Tissier, 2011 et Palmieri et Sblendorio, 2007).

c. Les antioxydants sont des marqueurs indirects du stress oxydant

Lors de stress oxydant, les défenses antioxydantes de l'organisme sont diminuées voire extrêmement réduites car dépassées par l'action prooxydante des composés produits. De nombreux antioxydants sont dosables : la vitamine E, les enzymes SOD, la Glutathion peroxydase, la catalase, la paraoxonase 1...

La vitamine E protège les membranes en stoppant la chaîne de lipoperoxydation par réaction avec un radical LOO°, en piégeant les radicaux superoxydes et hydroxyles (Lenzi, 2011). Le dosage de la vitamine E est complexe : traitement spécifique de l'échantillon, extraction puis identification et quantification par des techniques de chromatographie liquide de haute performance (Tissier, 2011).

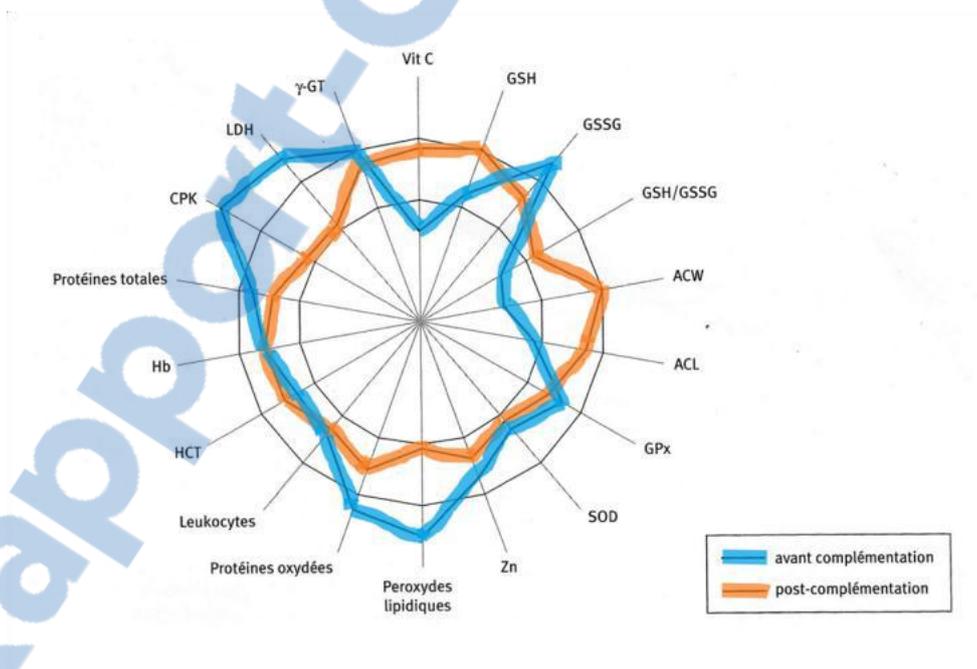
Les techniques de dosage des antioxydants sont généralement complexes et manquent de spécificité.

D'autres techniques existent pour évaluer la capacité antioxydante globale : le plasma prélevé est mis en présence d'ERO ce qui a pour but de tester les défenses antioxydantes. On peut citer par exemple la technique TRAP (Total Radical Trapping Antioxidant Parameter).

d. Réalisation du profil de stress oxydant : Oxidative Stress Profiling

En dosant une grande quantité de marqueurs sur différents prélèvements (air, urine, sang...), les laboratoires proposant la technique d'Oxidative Stress Profiling donnent les résultats sous forme de diagramme en présentant les valeurs usuelles pour chaque marqueur dosé (cf Figure 29 pour un exemple). Bien qu'intéressante, il s'agit d'une méthode très onéreuse et pas encore disponible pour l'espèce canine.

Figure 29. Profil oxydatif chez un cheval après un effort standardisé avant complémentation et après complémentation en antioxydants. Les deux cercles concentriques regroupent les valeurs usuelles (D'après Lenzi, 2011).



e. Mesure de l'activation des neutrophiles

Lors d'un processus inflammatoire, les neutrophiles sont activés et les produits de cette activation peuvent être libérés dans le torrent sanguin. Ainsi, les concentrations plasmatiques en MPO et en élastase se révèlent être de bons témoins de l'état oxydatif de l'organisme. Leur dosage s'effectue par des tests immunologiques développés par des laboratoires ou spectrophotométriques qui demeurent très coûteux pour pouvoir être utilisé en routine sur des chiens de sport par exemple.

2.3 Les limites des techniques d'évaluation du stress oxydant

Les équipements nécessaires à la réalisation de ces dosages et/ou les réactifs nécessaires sont coûteux et nécessitent parfois un personnel qualifié. Les intervalles de référence ne sont pas encore déterminés parfaitement car plusieurs techniques sont utilisables pour chaque marqueur et les résultats sont variables d'un laboratoire à un autre. Certaines techniques manquent de spécificité et de fiabilité. C'est pourquoi, bien que nombreuses, les méthodes de caractérisation du stress oxydant restent décevantes et peu utilisables en pratique.

3. Détails sur quelques pathologies en relation avec le stress oxydant

3.1 Mutagénèse et cancérogénèse

Valko *et al.* (2007) nous expliquent que les ERO et, plus généralement, le stress oxydant est directement lié aux processus de cancérogénèse par les lésions de l'ADN qu'ils provoquent (notamment le radical hydroxyle, cf 4.5 b), l'activation des procarcinogènes en carcinogènes (réalisable également par la MPO selon Klebanoff (2005)), l'amplification de signaux prolifératifs et l'inhibition de certains gènes suppresseurs de tumeurs.

Il est intéressant de noter qu'une mutation sur le gène codant la MPO (ayant pour conséquence un remplacement d'un nucléotide G en un nucléotide A sur la paire de base 463) provoque une moindre expression du gène et une moindre synthèse de la MPO. Chez les patients atteints de cette mutation, on a observé une diminution du risque des cancers des poumons, du larynx, de la vessie et de l'hépatoblastome (Klebanoff, 2005).

La lipoperoxydation peut entraîner la formation d'aldéhyde et notamment de malondialdéhyde, agent mutagène pour les bactéries et les cellules des mammifères et carcinogènes chez le rat. Le produit majeur de la lipoperoxydation reste l'hydroxynonenal qui est moins mutagène mais qui reste très toxique (Valko *et al.*, 2007).

Paradoxalement, lorsque la cancérogénèse est avancée, les radicaux libres interviennent au sein des lymphocytes NK (Natural Killer) dans la lutte anti-cancéreuse en induisant un sénescence précoce puis une apoptose des cellules tumorales (Valko *et al.*, 2006).

3.2 Le vieillissement cellulaire

a. Théorie radicalaire

Barouki (2006) nous rappelle que c'est Harman en 1956 qui énonce pour la première fois la théorie radicalaire du vieillissement selon laquelle le vieillissement peut s'expliquer par l'accumulation de molécules oxydées aboutissant à des mutations sur l'ADN, à des lésions protéiques (carbonylation, dénaturation et agrégation), à des oxydations lipidiques et à l'augmentation des produits terminaux de glycation avancée (cf III 3.4). L'ensemble des fonctions physiologiques sont dégradées et les organismes se trouvent plus sensibles aux pathologies.

Chez un nématode (*C. elegans*), l'absence du complexe II (mutation *mev-1*) au sein de la chaîne respiratoire mitochondriale entraîne une surproduction d'anion superoxyde et d'ERO qui en dérivent ce qui diminue de 30% la durée de vie du nématode. L'addition de composés antioxydants (ayant une activité identique à celle de la superoxyde dismutase par exemple) permet de recouvrir une durée de vie égale à celle du lot témoin (Melov *et al.*, 2000).

La mitochondrie a été désignée comme responsable du vieillissement cellulaire car elle est source des ERO mais est également leur cible préférentielle subissant ainsi toutes leurs actions délétères. Elles accumulent les mutations sur l'ADN mitochondrial ce qui altère leur morphologie, leur fonctionnement et empêche leur renouvellement (Bulteau *et al.*, 2006).

Au sein d'un organisme âgé, le taux de mutations est plus élevé. Le fonctionnement des phosphorylations oxydatives est altéré au sein des mitochondries ce qui entraîne une

surproduction d'ERO. Ces derniers agissent sur l'ADN mitochondrial et provoquent des mutations ce qui enclenche un cercle vicieux et participe au vieillissement cellulaire.

b. La restriction calorique

Chez l'Homme, des études ont été menées dans une population japonaise (sur l'île d'Okinawa) dont l'espérance de vie est plus élevée qu'ailleurs. La restriction calorique serait à l'origine de cette longévité (Barouki, 2006). Chez d'autres espèces, selon Carrière *et al.* (2006), la restriction calorique aurait également un effet bénéfique sur la durée de vie du nématode *C. elegans*. La faible quantité de substrat énergétique entraînerait une diminution de la quantité de NADH, H⁺ et FADH₂ permettant une moindre production d'anion superoxyde et de ses dérivés. De plus, Barouki (2006) cite l'action des protéines découplantes (qui est cependant discutée) qui agissent lors de stress oxydant en réduisant le gradient de protons de la membrane interne mitochondriale et ainsi diminue les fuites électroniques et la production d'ERO comme expliqué au 0 1.3.

3.3 Sénescence et sénilité – affections neurodégénératives

L'implication du stress oxydant (et notamment du système impliquant la MPO) dans des maladies neurodégénératives humaines comme la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson est communément admise. Si le cerveau est si sensible au stress oxydant c'est parce qu'il s'agit d'un tissu riche en acide gras polyinsaturés, sujets à la peroxydation lipidique. De plus, chez l'Homme (mais pas chez le chien), certaines aires du cerveau sont constituées de tissus riches en fer ce qui augmente la probabilité de production d'ERO (Tissier, 2011).

Le vieillissement cérébral physiologique associé à la diminution des capacités cognitives porte le nom de sénescence. Lorsque, chez le chien, celle-ci devient pathologique et lorsqu'on est en présence de dysfonctionnements cognitifs (perte d'énergie, détérioration de la qualité des relations avec le propriétaire, comportements compulsifs, etc...), on parle alors de sénilité. Selon Jungbluth (2008), la sénilité s'accompagne de l'accumulation cérébrale d'un peptide amyloïde β possédant la même séquence d'acides aminés que le peptide incriminé dans la maladie d'Alzheimer chez l'Homme. Ce peptide serait neurotoxique et à l'origine de la production de nombreuses ERO. Même si le lien de causalité n'a pas été trouvé, de nombreuses études ont

montré que le dysfonctionnement cognitif, la présence anormale de ce peptide et l'augmentation des marqueurs du stress oxydant sont corrélés dans la sénilité canine.

3.4 Le diabète et l'hyperglycémie

a. Généralités

Delattre *et al.* (1999) et Bonnefont-Rousselot *et al.* (2004) nous rappellent que diverses études ont montré que lors d'hyperglycémie, des ERO sont produites en quantité importante ainsi que des produits finaux de glycation avancée (PFG ou produits de Maillard) qui peuvent être à l'origine d'ERO par des mécanismes complexes et qui seraient impliqués dans les complications diabétiques (notamment la néphropathie diabétique).

L'hyperglycémie entraîne une surproduction d'ERO qui peuvent attaquer les cellules endothéliales et provoquer des lésions vasculaires responsables des micro-angiopathies rencontrées dans certains cas de diabète. Comme le rappellent Carriere *et al.* (2006) et Delattre *et al.* (1999), lors d'hyperglycémie, la SOD mitochondriale (SOD 2 cf 0 3.2 b) et d'autres enzymes anti-oxydantes sont surexprimées ce qui permet de limiter la production des ERO les plus délétères.

Les sujets diabétiques seraient également soumis à une oxydabilité accrue des LDL ce qui a pour conséquence une augmentation du risque d'accidents vasculaires.

Enfin, Collins *et al.* (1998) ont évalué les cassures des brins d'ADN de dix patients diabétiques et ont montré que les cassures des brins d'ADN des patients diabétiques sont significativement plus élevées que chez la population témoin conduisant à une situation similaire que lors du vieillissement cellulaire.

b. Liens entre hyperglycémie et production d'ERO

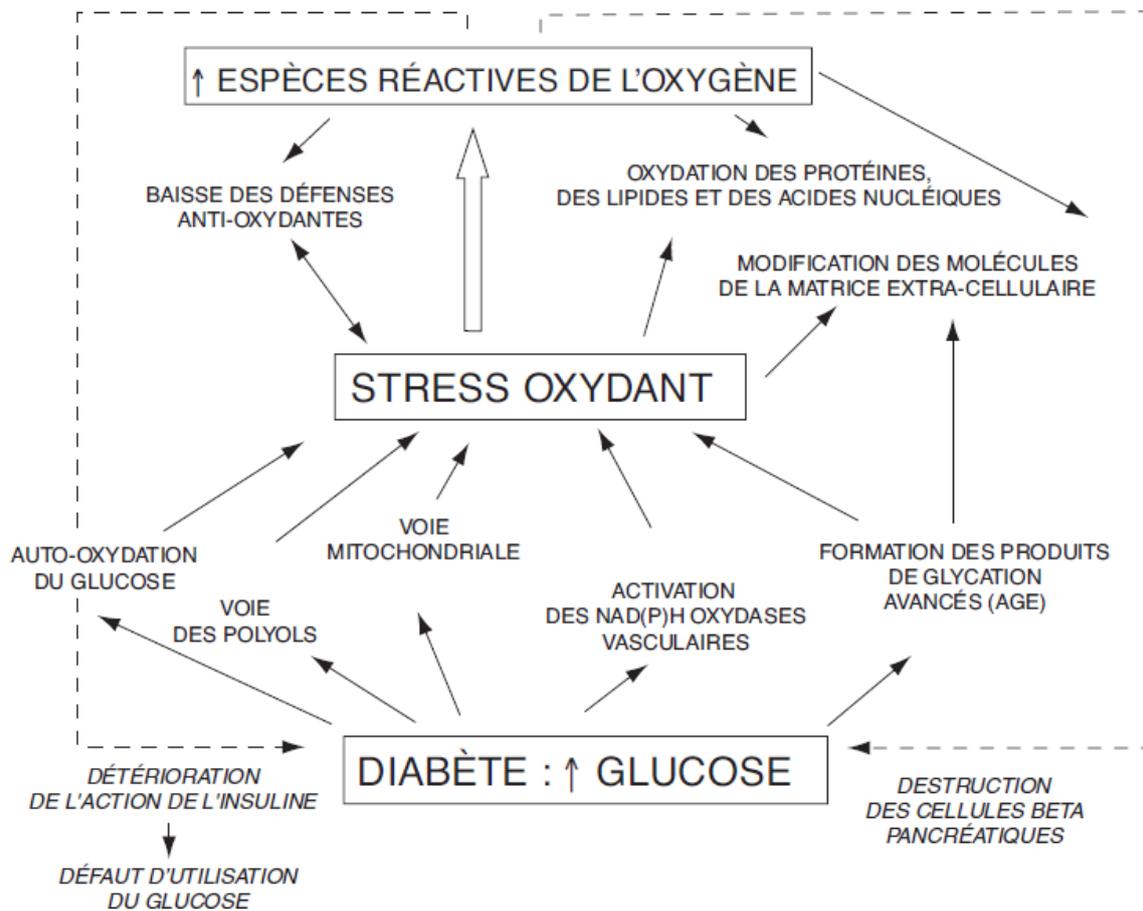
Il existe plusieurs mécanismes responsables de la surproduction d'ERO lors d'hyperglycémie :

- Auto-oxydation du glucose : le glucose peut former un radical anionique en présence de métaux de transition qui peut alors réduire le dioxygène

- débutant ainsi la formation d'ERO (anion superoxyde, peroxyde d'hydrogène, radical hydroxyle...) (Delattre *et al.*, 1999) ;
- Glycation des protéines : il s'agit de la formation d'un groupement céto au sein des protéines qui est capable de réduire l'oxygène moléculaire en anion superoxyde (Delattre *et al.*, 1999) ;
 - Voie des polyols : le glucose est réduit en sorbitol qui est oxydé en fructose. La réduction du glucose en sorbitol est catalysée par une aldose réductase qui utilise du NADPH comme cofacteur. Une hyperstimulation de cette voie entraîne donc une diminution considérable de la quantité de NADPH intracellulaire. Les enzymes nécessitant du NADPH pour fonctionner s'en trouvent alors privées. C'est le cas de la glutathion peroxydase qui ne peut alors plus jouer son rôle antioxydant. Il s'agit aussi du cas de la NO synthase étudiée au 0 2.1. La conséquence de la diminution de la production du NO[°] n'est pas très clairement identifiée mais il semblerait que le déséquilibre du métabolisme du NO[°] (beaucoup d'anion superoxyde, PFG qui piègent le NO[°] et peu de NO[°] produit) interviendrait dans les complications vasculaires rencontrées lors de diabète (Delattre *et al.*, 1999) ;
 - Une récente étude de Bravard *et al.* (2009) sur des souris diabétiques a permis de montrer qu'il existe également une voie mitochondriale : augmentation de la production d'ERO par la xanthine oxydase et le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale ;
 - L'activation des NADPH oxydases endothéliales se produit via l'activation d'une protéine kinase C (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2004).

La Figure 30 ci-dessous détaille les relations complexes entre l'hyperglycémie et la production accrue d'ERO.

Figure 30. Relation entre diabète et production d'ERO
(d'après Bonnefont-Rousselot et al., 2004).



Comme détaillé ci-dessus, l'hyperglycémie active plusieurs voies responsables d'un stress oxydant et de la surproduction d'ERO. Il est intéressant de noter que les ERO peuvent participer à l'installation du diabète en altérant l'action de l'insuline et en détruisant les cellules bêta du pancréas (Bonnefont-Rousselot *et al.*, 2004).

3.5 Cataractes

L'analyse de Vinson (2006) sur le lien entre le stress oxydant et les cataractes est très complète. Il existe trois types de cataractes qui peuvent être reliés au stress oxydant :

- La cataracte nucléaire qui atteint le centre du cristallin, est principalement due au vieillissement de l'organisme ;
- La cataracte corticale qui s'étend de l'extérieur du cristallin au centre du cristallin, est le plus souvent observée chez des patients atteints de diabète ;
- La cataracte subcapsulaire qui s'initie à l'arrière du cristallin, sous la capsule, atteint les patients diabétique ou sous l'emprise de stéroïdes.

Chez l'Homme, de nombreux facteurs de risques d'apparition de la cataracte ont été découverts (le sexe, l'âge, le poids, la consommation d'alcool ou de tabac, le diabète...). L'âge reste le plus important. En effet selon les auteurs, le cristallin aurait de moins en moins de défenses anti-oxydantes pour lutter contre le stress oxydant et ces dernières se révèlent de moins en moins efficaces.

Il a été montré que même chez des sujets avec une forte concentration en antioxydants (vitamine C) dans l'organisme, une supplémentation alimentaire réduit significativement le risque d'apparition de la cataracte.

La cataracte nucléaire est associée à une diminution de la teneur en glutathion au centre du cristallin avec des modifications notables des protéines. Le glutathion GSH est oxydé en GSSG mais seulement en région nucléaire (la concentration en GSH est normale dans la zone corticale du cristallin). Une oxydation des protéines (et surtout celles portant un groupe thiol -SH) est également mise en évidence dans le noyau des cristallins des patients atteints de la cataracte nucléaire.

De plus, comme nous venons de le voir dans le cas du diabète, l'hyperglycémie entraîne une surproduction d'anion superoxyde ce qui exacerbe les effets du stress oxydant. La lipoperoxydation intervient également dans la physiopathologie des cataractes.

3.6 Maladies inflammatoires

a. Stress oxydant et inflammation

Lorsqu'un phénomène inflammatoire survient, trois phases se succèdent comme expliqué au 0 5.3 b. Une surproduction d'ERO survient lors de l'inflammation car :

- Il y a stimulation de l'expression d'enzymes constitutives comme les NOS endothéliales et neuronales, la XOR, certaines NOX et COX1 ;
- Il y a activation des enzymes inductibles comme NOX2, NOSi et COX2.

Selon Jungbluth (2008), les mécanismes à l'origine de la surproduction d'ERO sont initiés par des cytokines produites lors de l'inflammation et les cellules phagocytaires en sont les principales productrices même si les cellules endothéliales, les fibroblastes et les chondrocytes peuvent également produire des ERO. De plus, il a été montré que les ERO interviennent dans la régulation de l'inflammation par la stimulation de la synthèse de molécules d'adhérence et de médiateurs de l'inflammation.

Cette surproduction d'ERO est directement liée au phénomène d'explosion oxydative décrit au 0 1.1 b v et permet la destruction des agents pathogènes phagocytés. Rappelons que la MPO est au centre des processus inflammatoires dans lesquels interviennent les neutrophiles. Cependant, elle peut être délétère pour les cellules phagocytaires et le tissu environnant lorsque les ERO traversent les membranes ou sont relâchés avec les déchets de la phagocytose (Jungbluth, 2008).

b. Maladies inflammatoires chroniques

i. *Maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI)*

Les MICI sont souvent associées à une augmentation du stress oxydant et plus précisément de la production d'ERO par les cellules intestinales (anion superoxyde notamment). La peroxydation lipidique qui s'en suit est responsable de l'altération de certaines fonctions de l'épithélium intestinal. Aussi, une diminution des capacités anti-oxydantes a été remarquée (SOD, glutathion peroxydase...). Cependant, nous ne savons pas si le stress oxydant mis en évidence lors de MICI est la cause ou la conséquence de l'inflammation (Reimund, 2002).

D'autres études ont montré que la production d'ERO est effectivement augmentée lors de MICI mais que les ERO sont éliminés rapidement, avant même que la lipoperoxydation n'ait lieu. Les défenses anti-oxydantes sont donc suffisamment efficaces lors de MICI pour limiter les altérations moléculaires (Tuzun *et al.*, 2002).

ii. *Maladies rénales (implication de la MPO)*

L'oxydation moléculaire provoquée par les ERO (protéines, lipides et acides nucléiques) s'effectue également au sein des tubules et glomérules rénaux (Tissier, 2011).

L'acide hypochloreux produit par le système enzymatique dans lequel intervient la MPO aboutit à la formation de protéines et lipides chlorés ce qui entraîne un dysfonctionnement des tubules et glomérules rénaux. Plusieurs observations selon Klebanoff *et al.* (2005) ont poussé à impliquer la MPO dans la physiopathologie des atteintes rénales :

- Une présence conjointe de la MPO et des protéines chlorées (suite à l'action de l'acide hypochloreux) au sein de la membrane basale des glomérules et dans les podocytes lors de glomérulonéphrite ;
- La présence de protéines chlorées dans les cellules mononuclées dans le tissu interstitiel et dans l'épithélium des tubules ;

- La MPO induit et exacerbe la formation d'auto-anticorps dans les glomérulonéphrites nécrisantes (Beauvillain *et al.*, 2012) ;
- Lors de lésions rénales dues à une hyperlipidémie chez le rat, on retrouve des peptides chlorés (modifié par HOCl) dans les urines.

iii. *L'arthrose*

Maneesh et son équipe (2005) ont montré que plusieurs marqueurs du stress oxydant sont présents en grande quantité chez des patients souffrant d'arthrose.

L'arthrose est un phénomène inflammatoire articulaire au cours duquel des ERO sont formées à partir des cellules inflammatoires présentes, des synoviocytes activés, des cellules endothéliales et des chondrocytes. Selon Jungbluth (2008), les ERO sont essentiellement produits par la NADPH oxydase et les NOS inductible et endothéliales. On assiste alors à la dégradation du collagène et des protéoglycanes, à l'augmentation de la synthèse des métalloprotéases (néoformation, activation des métalloprotéases inactives et inhibition des inhibiteurs de leur synthèse) et à l'apoptose des chondrocytes signant la mort du cartilage.

c. Maladies inflammatoires aiguës

Zazzo (2002) résume les implications du stress oxydant dans la physiopathologie des maladies inflammatoires aiguës. Il traite notamment des situations de SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome) comme le choc septique, le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA), les brûlures étendues, les polytraumatisés, les insuffisances rénales aiguës et les situations d'ischémie-reperfusion.

Lors de SDRA, les dommages subis par l'endothélium des capillaires pulmonaires sont le résultat d'une activation massive des neutrophiles au sein du site inflammatoire et de la production excessive d'ERO (Babior, 2000).

Les ERO libérées en masse dans ces situations sont à l'origine de modifications vasculaires. Ils entraînent une augmentation de la perméabilité vasculaire et favorisent la formation de microthromboses participant ainsi à la CIVD (Coagulation intra vasculaire disséminée) qui peut

apparaître en cas de SIRS. En effet, les fortes productions d'ERO sont associées à des productions de microparticules pro-coagulantes qui initient les processus de CIVD (Morel *et al.*, 2006).

En général, l'administration de micro nutriments antioxydants comme la vitamine C, vitamine E, sélénium et de la N-acétylcystéine à des doses dépendantes de la pathologie rencontrée, participe à l'amélioration des lésions, prévient les complications (insuffisance cardiaque par exemple) et raccourcit la durée du séjour dans le service de réanimation des patients étudiés (Zazzo, 2002).

3.7 Les pathologies vasculaires et cardiaques

a. L'insuffisance cardiaque (d'après Tsutsui, 2001)

Des études ont montré que le stress oxydant était accru lors de pathologies cardiaques et plus précisément lors d'insuffisance cardiaque.

Une production chronique d'ERO au sein de la mitochondrie des cellules cardiaques provoque des dégâts sur l'ADN mitochondrial et l'accumulation de mutations induit des dommages cellulaires aboutissant à des remodelages cardiaques importants. Ces processus interviendraient dans certaines pathologies cardiaques comme les cardiomyopathies hypertrophiques, les cardiomyopathies dilatées, les blocs de conduction ou encore les infarctus chez l'Homme.

b. Pathologies vasculaires

i. *L'athérosclérose*

Il s'agit d'une pathologie qui affecte essentiellement l'espèce humaine. En effet, le chien est peu sensible à l'athérosclérose car son métabolisme des lipoprotéines est différent de celui qui se produit chez l'Homme. Nous ne nous attarderons pas dessus mais il faut savoir que les ERO et le processus de stress oxydant sont directement impliqués dans la pathogénie de cette maladie.

Les lipoprotéines (LDL notamment) oxydées par les neutrophiles activés sont reconnues et phagocytées par les macrophages. La MPO et ses dérivés participent activement à ces oxydations (Daugherty *et al.*, 1994). Les LDL oxydées s'accumulent dans le macrophage et forment une cellule

spumeuse ce qui constitue l'initiation de la formation des plaques d'athérome (Babior, 2000). Une surproduction d'ERO (due à une hypertension, une hypercholestérolémie, un diabète, au tabagisme, etc...) intervient dans l'activation des cellules impliquées dans l'athérosclérose, dans la formation et dans la progression de la lésion (on pourra citer l'intervention de la NADPH oxydase vasculaire par exemple) (Beaudeau *et al.*, 2006).

ii. *Ischémie-reperfusion*

Lors d'une rupture, d'une torsion, d'une occlusion ou d'une obstruction vasculaire le flux sanguin est stoppé : c'est l'ischémie. Lorsqu'une ischémie survient, l'apport d'oxygène aux tissus atteints est fortement diminué voire absent et plus l'ischémie dure longtemps, plus les lésions seront graves et irréversibles (Tissier, 2011). Selon Babior (2000), les lésions observées se créent essentiellement lors de la phase de reperfusion. Le processus d'ischémie-reperfusion a beaucoup été étudié dans des cas d'infarctus du myocarde chez l'Homme et les lésions observées ont été attribuées aux ERO (et principalement aux radicaux libres) libérés par les neutrophiles activés sur le site lésionnel. Selon Babior (2000), après une ischémie, on détecte des radicaux libres en concentration importante dans les tissus reperfusés et ce, dès la première minute de reperfusion.

Selon Tissier (2011), la production d'ERO est essentiellement mitochondriale pendant la première phase de reperfusion. Ensuite, elle provient surtout des neutrophiles activés qui produisent des ERO par l'intermédiaire de la MPO comme expliqué précédemment.

De plus, Tissier (2011) nous rappelle que lors de la phase d'ischémie, l'ATP ne peut pas être produite par le métabolisme aérobie et l'AMP s'accumule et est dégradée en inosine puis en hypoxanthine. Parallèlement, la xanthine déshydrogénase (présentée au 0 a ii) est convertie en xanthine oxydase. Lorsque la reperfusion a lieu, la xanthine oxydase catalyse l'oxydation de la xanthine en hypoxanthine puis en acide urique ce qui forme des anions superoxydes (comme expliqué au 0 a ii) provoquant des lésions oxydatives immédiates ou différées par la conversion de l'anion superoxyde en autres ERO. On assiste notamment à une extension du territoire ischémié et à des arythmies cardiaques lorsque le processus concerne le myocarde (Jungbluth, 2008). Il est intéressant de noter qu'en 1985, Chambers *et al.* incriminaient déjà la xanthine oxydase comme responsable des lésions myocardiques lors d'ischémie du myocarde.

Jungbluth (2008) détaille de façon quasi-complète les phénomènes d'ischémie-reperfusion. C'est ainsi qu'on apprend que l'ischémie entraîne une faillite énergétique au sein des cellules et le manque d'ATP ne permet plus un transport acceptable des ions ce qui provoque un déséquilibre ionique. Cette perturbation de l'homéostasie ionique entraîne une acidose intracellulaire pouvant aboutir à une acidose extra cellulaire, une turgescence des cellules et l'entrée passive d'eau. De plus, selon Cook *et al.* (2012), certains ERO et plus précisément les produits dérivés de la MPO (HOCl) entraîne l'inhibition de la pompe Ca^{2+} ATPase par oxydation des groupements thiols et ainsi empêchent la séquestration du Ca^{2+} dans le *reticulum* endoplasmique ce qui provoque une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} et l'activation d'enzymes :

- Les endonucélases conduisent à la fragmentation de l'ADN ;
- Les protéases conduisent à la conversion de la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase ;
- Les phospholipases qui hydrolysent les phospholipides et initient l'agrégation plaquettaire.

L'échantillon des pathologies provoquées par le stress oxydant ou dont le stress oxydant est la conséquence détaillé dans la partie précédente nous donne une idée de la gravité des conséquences que peut avoir le stress oxydant sur l'organisme.

CONCLUSION

L'équilibre entre les composés oxydants dérivés de l'oxygène et les défenses antioxydantes présentes dans l'organisme donne lieu à une harmonie subtile permettant aux ERO d'exercer leur rôle physiologique (signalisation cellulaire notamment) sans provoquer de dégâts collatéraux sur les cellules. Cet équilibre peut se rompre suite par exemple à un effort physique intense suscitant alors de graves dommages cellulaires dus aux ERO dont la dangerosité dépend de leur nature et de leur lieu de production. Même si elle demeure difficile à démontrer, l'implication du stress oxydant dans de nombreuses pathologies, notamment inflammatoires, est indiscutable et communément admise. La MPO joue un rôle majeur dans la production d'ERO lors de l'inflammation. Cependant, le lien entre le stress oxydant et les pathologies qu'on lui associe est complexe à déterminer. En effet, il est difficile de savoir si le stress oxydant est l'origine ou la répercussion des pathologies auxquelles il est lié. Le stress oxydant est impliqué dans le vieillissement cellulaire ce qui intéresse notamment l'industrie cosmétologique qui cherche à interrompre les processus de vieillissement cutané en agissant sur les phénomènes oxydatifs qui se produisent dans les cellules de la peau. Le chien est le meilleur modèle d'étude du stress oxydant et de nombreuses études ont été menées chez des chiens de traîneaux (l'effort d'endurance en altitude regroupe toutes les conditions qui exacerbent les phénomènes oxydatifs). L'évaluation du stress oxydant n'est pas aisée du fait des propriétés intrinsèques des ERO et car les techniques développées jusqu'à ce jour ne sont ni standardisées ni optimisées pour une utilisation quasi quotidienne qui serait par ailleurs intéressante en médecine préventive. Lorsque les ERO ont provoqué des dégâts cellulaires, il n'y a aucun moyen thérapeutique d'action. C'est pourquoi, la lutte contre le stress oxydant est essentiellement préventive avec des suppléments nutritionnelles en antioxydants. D'autres techniques se sont avérées efficaces : la thérapie génique par transfert de gènes antioxydants et le transfert de protéines ciblées. Le nombre de publications concernant le stress oxydant ne cesse d'augmenter depuis ces dix dernières années (environ 10 000 articles publiés en 2004 contre près de 25 000 en 2013, le chiffre augmentant d'année en année).

BIBLIOGRAPHIE

- ABU-SOUD H.M, HAZEN S.L. Nitric oxide modulates the catalytic activity of myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**, 5425-5430.
- ALBERTS B, BRAY D, HOPKIN K *et al.* (2009). *Essential Cell Biology*. 3rd ed. Garland, 860 p.
- ALDERTON W.K, COOPER C.E, KNOWLES R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.*, 2001, **357**, 593-615.
- ANDREYEV A.Y, KUSHNAREVA Y.E, STARKOV A.A. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry*, 2005, **70**, 246-264.
- ARNHOLD J. Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. *Biochemistry (Moscow)*, 2004, **69**, 4-9.
- AUGUSTO O, BONINI M.G, AMANSO A.M, LINARES E, SANTOS C.C.X, DE MENEZES S.L. Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology. *Free Radical Biol. Med.*, 2002, **32**, 841-859.
- BABIOR B.M. The respiratory burst of phagocytes. *J. Clin. Invest.*, 1984, **73**, 599-601.
- BABIOR B.M. Phagocytes and oxidative stress. *Am. J. Med*, 2000, **109**, 33-44.
- BAILEY D.M, KLEGER G.R, HOLZGRAEFE M, BALLMER P.E, BARTSCH P. Pathophysiological significance of peroxidative stress, neuronal damage, and membrane permeability in acute mountain sickness. *J. Appl. Physiol.*, 2005, **96**, 1459-1463.
- BAROUKI R. Stress oxydant et vieillissement, *Med. Sci.*, 2006, **22**, 266-272.
- BEAUDEUX J.L, DELATTRE J, THEROND P, BONNEFONT-ROUSSELOT D, LEGRAND A, PEYNET J. Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose. *Immunol. Biol. Spec.*, 2006, **21**, 144-150.

- BEAUVILLAIN C, JEANNIN P, DELNESTE Y, RENIER G, SUBRA J.F, CHEVAILLER A. Autoanticorps anticytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ANCA) : cibles antigéniques, méthodes diagnostiques. *EMC Biologie médicale*, 2012, **7**, 1-14.
- BERRY C.E, HARE J.J. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J. Physiol.*, 2004, **555**, 589-606.
- BONNEFONT-ROUSSELOT D, BEAUDEUX J.L, THEROND P, PERYNET J, LEGRAND A, DELATTRE J. Diabète sucré, stress oxydant et produits de glycation avancée. *Ann. Pharm. Fr.*, 2004, **62**, 147-157.
- BORREGAARD N, COWLAND J. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*, 1997, **89**, 3503-3521.
- BRAVARD A, BONNARD C, FAVIER R, DURAND A, VIDAL H, RIEUSSET J. Implication de la xanthine oxydase dans la production de ROS musculaire induite par l'hyperglycémie. *Diabetes & metabolism*, 2009, **35**, A86.
- BROGIONI S, STAMPLER J, FURTMULLER P.G, FEIS A, OBINGER C, SMULEVICH G. The role of sulfonium linkage in the stabilization of the ferrous form of myeloperoxidase: a comparison with lactoperoxidase. *Biochim. Biophys. Acta*, 2008, **1784**, 843-849.
- BULTEAU A.L, SZWEDA L.I, FRIGUET B. Mitochondrial protein oxidation and degradation in response to oxidative stress and aging. *Exp. Gerontol.*, 2006, **41**, 653-657.
- CADENAS E, DAVIES K.J.A. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Free Radical Biol. Med.*, 2000, **29**, 222-230.
- CARR A, McCALL M.R, FREI B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species-reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.*, 2000, **20**, 1716-1723.
- CARRIERE A, GALINIER A, FERNANDEZ Y, CARMONA M.C, PENICAUD L, CASTEILLA L. Les espèces actives de l'oxygène: le yin et le yang de la mitochondrie. *Med. Sci.*, 2006, **22**, 47-53.

- CASTRO R, PIAZZON M.C, NOYA M, LEIRO J.M, LAMAS J. Isolation and molecular cloning of a fish myeloperoxidase. *Mol. Immunol.*, 2008, **45**, 428-437.
- CECH P, LEHRER R.I. Phagolysosomal pH of human neutrophils. *Blood*, 1984, **63**, 88-91.
- CHAMBERS D.E, PARKS D.A, PATTERSON G, ROY R, McCORD J.M, YOSHIDA S *et al.* Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1985, **17**, 145-152.
- CHANCE B, SIES H, BOVERIS A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.*, 1979, **59**, 527-605.
- CILLARD J. Physiopathologie du Stress Oxydant, faculté de pharmacie, université de Rennes. EA 1274 « Mouvement-Sport-Santé », Communication personnelle, 2011.
- COLLINS A.R, RASLOVA K, SOMOROVSKA M, PETROVSKA H, ONDRUSOVA A, VOHNOUT B *et al.* DNA damage in diabetes: correlation with a clinical marker. *Free Radical Biol. Med.*, 1998, **25**, 373-377.
- COMMONER B, TOWNSEND J, PAKE GE. Free radicals in biological materials. *Nature*, 1954, **174**, 689-691.
- COOK N.L, VIOLA H.M, SHAROV V.S, HOOL L.C, SCHONEICH C, DAVIES M.J. Myeloperoxidase-derived oxidants inhibit sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase activity and perturb Ca²⁺ homeostasis in human coronary artery endothelial cells. *Free Radical Biol. Med.*, 2012, **52**, 951-961.
- DALLE-DONNE I, ROSSI R, COLOMBO R, GIUSTARINI D, MILZANI A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin. Chem.*, 2006, **52**, 601-623.
- DAUGHERTY A, DUNN J.L, RATERI D.L, HEINECKE J.W. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J. Clin. Invest.*, 1994, **94**, 437-444.
- DEBY-DUPONT G, DEBY C, LAMY M. Données actuelles sur la toxicité de l'oxygène. *Réanimation*, 2002, **11**, 28-39.

- DELATTRE J, BONNEFONT-ROUSSELOT D, BORDAS-FONFREDE M, JAUDON M.C. Diabète sucré et stress oxydant. *Ann. Biol. Clin.*, 1999, **57**, 437-444.
- DEREE J, LALL R, MELBOSTAD H, GRANT M, HOYT D.B, COIMBRA R. Neutrophil degranulation and the effects of phosphodiesterase inhibition. *J. Surg. Res*, 2006, **133**, 22-28.
- DRAHOTA Z, CHOWDHURY S.K.R, FLORYK D, MRACEK T, WILHELM J, RAUCHOVA H *et al.* Glycerophosphate-dependent hydrogen peroxide production by brown adipose tissue mitochondria and its activation by ferricyanide. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 2002, **34**, 105-113.
- DROGE W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.*, 2002, **82**, 47-95.
- DURAND D, DAMON M, GOBERT M. Le stress oxydant chez les animaux de rente: principes généraux. *Cah. Nutr. Diét.*, 2013, in press.
- EDWARDS S.W, NURCOMBE H.L, HART C.A. Oxidative inactivation of myeloperoxidase released from neutrophils. *Biochem. J.*, 1987, **245**, 925-930.
- FANG F.C. Mechanisms of Nitric Oxide-related Antimicrobial Activity. *J. Clin. Invest*, 1997, **99**, 2818-2825.
- FAVIER A. Le stress oxydant, intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 2003, n°**269-270**, 108-115.
- FAURSCHOU M, BORREGAARD N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.*, 2003, **5**, 1317-1327.
- FEDOROVA M, KULEVA N, HOFFMANN R. Reversible and irreversible modifications of skeletal muscle proteins in a rat model of acute oxidative stress. *BBA – Mol. Basis Dis.*, 2009, **1792**, 1185-1193.
- FISHER-WELLMAN K, BLOOMER R.J. Acute exercise and oxidative stress : a 30 year history. *Dynam. Med.*, 2009, **8**, 1-25.

FRIDOVICH I. Superoxide anion radical ($O_2^{\bullet-}$), superoxide dismutases, and related matters. *J. Biol. Chem.*, 1997, **272**, 18515–18517.

FURTMULLER P.G, ZEDERBAUER M, JANTSCHKO W, HELM J, BOGNER M, JAKOPITSCH C *et al.* Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2006, **445**, 199-213.

GALLO G, MARTINO G, CARINO A. Spinning, oxidative damage and hemolysis in athletes. *Free radicals and antioxidants*, 2013, in press.

GARDES-ALBERT M, BONNEFONT-ROUSSELOT D, ABEDINZADEH Z, JORE D. Espèces réactives de l'oxygène : Comment l'oxygène peut-il devenir toxique. *L'actualité chimique*, 2003, n°**269-270**, 91-96.

GARDES-ALBERT M. Aspects physico-chimiques des espèces réactives de l'oxygène. *Ann. Pharm. Fr.*, 2006, **64**, 365-372.

GALLAND F. Hématopoïèse. In : Téléchargements, Cours L2, biologie intégrée [en ligne]. Marseille (Fr) : Faculté des sciences de Luminy. [http://biologie.univ-mrs.fr/upload/p76/L2_FG_h_mato.pdf] (Consulté le 16 mars 2013).

GERSCHMAN R, GILBERT D.L, NYE S.W, DWYER P, FENN WO. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science*, 1954, **119**, 623-626.

GODBER B.L.J, DOEL J.J, SAPKOTA G.P, BLAKE D.R, STEVENS C.R, EISENTHAL R. *et al.* Reduction of nitrite to nitric oxide catalysed by xanthine oxidoreductase. *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**, 7757-7763.

GOEDKEN M, MC CORMICK S, LEIDAL K.G, SUZUKI K, KAMEOKA Y, ASTREN J *et al.* Impact of two novel mutations on the structure and function of human myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.*, 2007, **38**, 27996-28003.

GRANDJEAN D, RENARD N, DHOTE F, OUABDESSELAM M, AUBERT L, BIGARD X *et al.* Modèle d'étude du stress oxydatif cellulaire – le chien de travail en environnement extrême. *Le nouveau praticien vétérinaire*, 2005, **121**, 37-40.

- HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.*, 1984, **219**, 1-14.
- HALLIWELL B, CHIRICO S. Lipid peroxidation: its mechanisms, measurement and significance. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1993, **57**, 715-725.
- HAMPTON M.B, KETTLE A.J, WINTERBOURN C.C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase and bacterial killing. *Blood*, 1998, **92**, 3007-3017.
- HANSSON M, OLSSON I, NAUSEEF W.M. Biosynthesis, processing and sorting of human myeloperoxidase. *Biochem. Biophys.*, 2005, **445**, 214-224.
- HARMAN D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.*, 1956, **11**, 298-300.
- HARRISON J.E, SCHULTZ J. Studies on the chlorinating activity of Myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.*, 1976, **251**, 1371-1374.
- HARRISON R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radical Biol. Med.*, 2002, **33**, 774-797.
- HENDERSON L.M. NADPH oxidase subunit gp91phox: a proton pathway. *Protoplasma*, 2001, **217**, 37-42.
- HILLE R, NISHINO T. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *FASEB J*, 1995, **9**, 995-1003.
- HIRSCH J.G, COHN Z.A. Degranulation of polymorphonuclear leucocytes following phagocytosis of microorganisms. *J. Exp. Med.*, 1960, **112**, 1005-1014.
- JUNGBLUTH G. Les espèces réactives de l'oxygène et leurs principales implications dans la physiopathologie canine. Thèse Méd. Vét., Lyon, 2008, n°14.
- KETTLE A.J, ANDERSON R.F, HAMPTON M.B, WINTERBOURN C.C. Reactions of superoxide with myeloperoxidase. *Biochem.*, 2007, **46**, 4888-4897.

KLEBANOFF S.J. Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxide anti-bacterial system. *J. Bacteriol.*, 1968, **95**, 2131-2138.

KLEBANOFF S.J. Reactive nitrogen intermediates and antimicrobial activity: Role of nitrite. *Free Radical Biol. Med.*, 1993, **14**, 351-360.

KLEBANOFF S.J. Myeloperoxidase: friend and foe. *J. Leukocyte Biol.*, 2005, **77**, 598-625.

KOEFFLER H.P, RANYARD J, PERTCHECK M. Myeloperoxidase: its structure and expression during myeloid differentiation. *Blood*, 1985, **65**, 484-491.

KOOTER I.M, MOGUILEVSKY N, BOLLEN A, VAN DER VEEN L.A, OTTO C, DEKKER H.L *et al.* The sulfonium ion linkage in myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.*, 1999, **274** (n°38), 26794-26802.

KOPPENOL WH. The Haber-Weiss cycle – 70 years later. *Redox Reports*, 2001, **6**, 229-234.

LENZI F. Contribution à l'étude du stress oxydant cellulaire chez le chien de traineau en course de sprint. Thèse Méd. Vét., Lyon, 2011.

LOFFREDO L. Chronic granulomatous disease. *Internal and emergency Med.*, 2011, **6**, 125-128.

MAGHZAL G.J, KRAUSE K.H, STOCKER R, JAQUET V. Detection of reactive oxygen species derived from the family of NOX NADPH oxidases. *Free radical Biol. Med.*, 2012, **53**, 1903-1918.

MANEESH M, JAYALEKSHMI H, SUMA T, CHATTERJEE S, CHAKRABARTI A, SINGH T.A. Evidence for oxidative stress in osteoarthritis. *Indian J Clin. Biochem.*, 2005, **20**, 129-130.

MELOV S, RAVENSCROFT J, MALIK S, GILL M.S, WALKER D.W, CLAYTON P.E *et al.* Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics. *Science*, 2000, **289**, 1567-1569.

MIGDAL C, SERRES M. Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Médecine/Sciences*, 2011, **27**, 405-412.

MOREL N, MOREL O, DELABRANCHE X, JESEL L, SZTARK F, DABADIE P *et al.* Microparticules circulantes au cours des traumatismes graves et des sepsis: un élément de couplage inflammation – thrombose. *Ann. Fr. Anesth.*, 2006, **25**, 955-966.

- MULLER FL, LIU Y, VAN REMMEN H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.*, 2004, **279**, 49064-49073.
- NAUSEEF W.M. Quality control in the endoplasmic reticulum: lessons from hereditary myeloperoxidase. *J. Lab. Clin. Med.*, 1999, **134**, 215-221.
- NAUSEEF W.M. Lessons from MPO deficiency about functionally important structural features. *J. infect. Dis.*, 2004, **57**, S4-S5.
- NAUSEEF W.M. Biological roles for the NOX Family NADPH Oxidases, *J. Biol. Chem.*, 2008, **283**, 16961-16965.
- ONO T, TSURUTA R, FUJITA M, AKI H.S, KUTSUNA S, KAWAMURA Y *et al.* Xanthine oxidase is one of the major sources of superoxide anion radicals in blood after reperfusion in rats with forebrain ischemia/reperfusion. *Brain Res.*, 2009, **1305**, 158-167.
- PALMIERI B, SBLENDORIO V. Oxidative stress tests: overview on reliability and use. *Eur. Rev.r Med. Pharmacol. Sci.*, 2007, **11**, 309-342.
- PODREZ E.A, ABU-SOUD H.M, HAZEN S. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. *Free Radical Biol. Med.*, 2000, **28**, 1717-1725.
- PORTER T.D, COON M.J. Cytochrome P450: Multiplicity of isoforms, substrates and catalytic and regulatory mechanisms. *J. Biol. Chem.*, 1991, **266**, 13469-13472
- POWERS S.K, SMUDER A.J, KAVAZIS A.N, HUDSON M.B. Experimental guidelines for studies designed to investigate te impact of antioxidant supplementation on exercise performance. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.*, 2010, **20**, 2-14.
- REIMUND J.M. Stress oxydant au cours des syndromes inflammatoires chroniques. *Nutrition clinique et métabolisme*, 2002, **26**, 275-284.
- ROSEN H, KLEBANOFF S.J. Oxidation of microbial iron sulfur centers by the myeloperoxidase-H₂O₂-halide antimicrobial system. *Infect. Immun.*, 1985, **47**, 613-618.

SAINT-ONGE M. Le neutrophile humain. Mémoire de maîtrise, Québec, 2005.

SEGAL A.W, GEISOW M, GARCIA R, HARPER A, MILLER R. The respiratory burst of phagocytic cells is associated with a rise in vacuolar pH. *Nature*, 1981, **290**, 406-409.

SERTEYN D, GRULKE S, FRANCK T, MOUITHYS-MICKALAD A, DEBY-DUPONT G. La myeloperoxydase des neutrophiles, une enzyme de defense aux capacités oxydantes. *Ann. Med. Vet.*, 2003, **147**, 79-93.

SERTEYN D, SANDERSEN C, LEJEUNE J.P, DE LA REBIERE DE POUYADE G, MOUITHYS-MICKALAD A, NIESTEN A *et al.* Effect of a 120 km endurance race on plasma and muscular neutrophil elastase and myeloperoxidase concentrations in horses. *Equine Vet. J.*, 2010, **42**, 275-279.

STARKOV A.A. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2008, **1147**, 37-52.

THEROND P. Stress oxydant : dommages créés aux biomolécules (lipides, protéines, ADN) par le stress oxydant. *Ann. Pharm. Fr.*, 2006, **64**, 383-389.

TISSIER M. Contribution à l'étude du stress oxydant chez le chien de cross canin. Thèse Méd. Vét., Lyon, 2011.

TSUTSUI H. Oxidative stress in heart failure: the role of mitochondria. *Internal Med.*, 2001, **40**, 1177-1182.

TURRENS J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.*, 2003, **552**, 335-344.

TUZUN A, ERDIL A, INAL V, AYDIN A, BAGCI S, YESILOVA Z *et al.* Oxidative stress and antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease. *Clin. Biochem.*, 2002, **35**, 569-572.

VALKO M, MORRIS H, CRONIN M.T.D. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.*, 2005, **12**, 1161-1208.

VALKO M, RHODES C.J, MONCOL J, IZAKOVIC M.M, MAZUR M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. interactions*, 2006, **160**, 1-40.

VALKO M, LEIBFRITZ D, MONCOL J, CRONIN M.T.D, MAZUR M, TELSER J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell. B.*, 2007, **39**, 44-84.

VAN ANTWERPEN P et NÈVE J. Contribution à l'Etude du Pouvoir Antioxydant de Divers Agents d'Intérêt Thérapeutique: Ciblage du Système Myéloperoxydase/Peroxyde d'hydrogène/Chlorure. Thèse de doctorat en sciences pharmaceutiques, Bruxelles, 2006.

VINSON J.A. Oxidative stress in cataracts. *Pathophysiology*, 2006, **13**, 151–162.

WEST BC, ROSENTHAL A.S, GELB N.A, KIMBALL H.R. Separation and characterization of human neutrophil granules. *Am. J. Pathol*, 1974, **77**, 41-62.

WINTERBOURN C.C, BRENNAN S.O. Characterization of the oxidation products of the reaction between reduced glutathione and hypochlorous acid. *Biochem. J.*, 1997, **326**, 87-92.

WINTERBOURN C.C, KETTLE A.J. Biomarkers of myeloperoxidase-derived hypochlorous acid. *Free Radical Biol. Med.*, 2000, **29**, 403-409.

YIN H, XU L, PORTER N.A. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chem. Rev.*, 2011, **111**, 5944-5972.

ZELKO I.N, MARIANI T.J, FOLZ R.J. Superoxide dismutase multigene family : a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD 2) and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution and expression. *Free radical Biol. Med.*, 2002, **33**, 337-349.

ZABUCCHI G, SORANZO M.R, MENEGAZZI R, BERTONCIN P, NARDON E, PATRIARCA P. Uptake of human eosinophil peroxidase and myeloperoxidase by cells involved in the inflammatory process. *J. Histochem. Cytochem.*, 1989, **37**, 499-508.

ZAZZO J.F. Stress oxydant au cours des états inflammatoires aiguës et des états d'agression: implications pour la pratique clinique. *Nutrition clinique et métabolique*, 2002, **16**, 268-274.

ZOCCARATO F, CAVALLINI L, ALEXANDRE A. Respiration-dependent removal of exogenous H₂O₂ in brain mitochondria: inhibition by Ca²⁺. *J. Biol. Chem*, 2004, **279**, 4166–4174.

ORIGINE ET CONSÉQUENCES DU STRESS OXYDANT

MONGENS Magali

Résumé

Depuis sa découverte en 1772 par Scheele, le dioxygène est au centre de nombreuses controverses. A la fois indispensable à la vie et toxique, il est à l'origine du stress oxydant. Diverses réactions entre l'oxygène et la matière organique (notamment des réactions de réduction) produisent des espèces réactives de l'oxygène (ERO) dont font partie les radicaux libres. Pour lutter contre les ERO, l'organisme dispose de défenses antioxydantes qui peuvent être vite dépassées. La rupture de cet équilibre plonge l'organisme dans un état appelé stress oxydant. Lors d'un tel état, les ERO peuvent causer de nombreux dégâts cellulaires et sont impliqués dans beaucoup de pathologies et plus particulièrement les phénomènes inflammatoires. Lors d'une inflammation, l'afflux de neutrophiles sur le site concerné peut conduire à une dégranulation en masse et à la libération des enzymes contenues dans les granules comme la myéloperoxydase. Cette dernière est à l'origine de la formation de nombreux ERO *in situ*, permettant une activité antimicrobienne mais pouvant causer aussi de graves dégâts cellulaires.

L'évaluation du stress oxydant est difficilement réalisable car nous ne disposons pas encore de techniques de dosage simples, fiables et pouvant être employées quotidiennement ou quasi-quotidiennement. Il s'agit d'un domaine de recherche largement exploité de nos jours et il est intéressant de constater que le chien est le meilleur modèle d'étude pour le stress oxydant. Ce travail de synthèse résume les mécanismes de production des ERO et leur implication dans certaines pathologies intéressant l'espèce canine.

Mots clés : STRESS OXYDANT / INFLAMMATION / ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE / ERO / OXYGÈNE / DIOXYGENE / RADICAUX LIBRES / MYELOPEROXYDASE / PATHOLOGIE

Jury :

Président : Pr.

Directeur : Pr. D GRANDJEAN

Assesseur : M. L DESQUILBET

Invité : D CLERO

ORIGIN AND CONSEQUENCES OF OXIDATIVE STRESS

MONGENS Magali

Summary

Since its discovery in 1772 by Scheele, dioxygen is a controversial matter. Both essential for life and toxic, it causes oxidative stress. Numerous reactions between oxygen and organic material (especially reduction reactions) lead to the production of reactive oxygen species (ROS) which include free radicals. To fight against ROS, organism has anti-oxidant defenses which can be overload in some situations. The rupture of this balance cause oxidative stress. At this stage, ROS can provoke a high number of cellular damage and are involved in different pathologies, mainly inflammatory diseases. During inflammation, neutrophils invasion on site can provoke a massive degranulation, and the release of enzymes as myeloperoxidase usually contain in neutrophils granules. Myeloperoxidase can form ROS on site, which allow normal anti-microbial activity, but can promote dangerous cells damage when release out from the granules.

Oxidative stress assessment is still difficult to realise because we lack of simple, reliable, and daily available test. This field of research is widely explored today, and dog seems to be one of the best models in the animal world to investigate this phenomena. This synthesis work summarise mechanisms of ROS production, and their involvement in pathologies affecting canine specie.

Keywords: OXIDATIVE STRESS / INFLAMMATION / REACTIVE OXYGEN SPECIES / ROS / OXYGEN / DIOXYGEN / FREE RADICALS / MYELOPEROXIDASE / PATHOLOGY

Jury :

President : Pr.

Director : Pr. D GRANDJEAN

Assessor : M. L DESQUILBET

Guest : D CLERO